

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica
LAQQA – LABORATÓRIO DE QUIMIOMETRIA EM QUÍMICA ANALÍTICA**



UNICAMP

**Desenvolvimento de metodologias analíticas multivariadas
empregando espectroscopia Raman de baixa resolução amplificada por
superfície**

Tese de Doutorado

**Aluno: Diórginis Bueno Montrazi Ribeiro
Orientador: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi
Co-orientador: Prof. Dr. Cesar Mello**

Campinas – SP, Set/2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

R354d	<p>Ribeiro, Diórginis Bueno Montrazi. Desenvolvimento de metodologias analíticas multivariadas empregando espectroscopia Raman de baixa resolução amplificada por superfície / Diórginis Bueno Montrazi Ribeiro. – Campinas, SP: [s.n], 2009.</p> <p>Orientador: Ronei Jesus Poppi. Co-orientador: Cesar Alexandre de Mello.</p> <p>Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Espectroscopia de Raman. 2. Calibração multivariada. 3. Pesticidas. 4. Hormônio tireoestimulante. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Mello, Cesar Alexandre de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.</p>
-------	---

Título em inglês: Development of multivariate analytical methodologies employing low resolution surface enhanced Raman spectroscopy

Palavras-chaves em inglês: Raman spectroscopy, Multivariate calibration, Pesticides, Thyroid-stimulating hormone

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi (orientador), Prof. Dr. Fabio Augusto (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Maria Izabel Marette Silveira Bueno (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto (DQ-UFU), Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho (DQ-UFSCar)

Data de defesa: 02/09/2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus tios Paulo Henrique e Tuca, minha noiva Samanta e a minha mãezinha Esmerinda

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por mais esta oportunidade e mais uma vitória conquistada.
- Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa para realização deste trabalho.
- À UNICAMP e UNIFRAN por fornecer toda a estrutura física e tecnológica para realização deste trabalho
- Agradeço ao meu orientador professor doutor Ronei Jesus Poppi pela paciência e também pela excelente orientação ao longo deste trabalho.
- Agradeço também ao meu co-orientador professor doutor Cesar Mello pela brilhante participação neste trabalho.
- Agradeço aos alunos e ex – alunos (Danilo, Guilherme, Werickson, Luís, Laura, Júlio, Trevisan, Patrícia, Paulo Henrique, Jez, Waldomiro, Renato, Gilmare, Alessandra) do grupo LAQQA pelo incentivo.
- Agradeço ao Biomédico, da Universidade de Franca (UNIFRAN), Marcos Aurélio Stoppa pelo fornecimento das amostras de plasma humano utilizadas neste trabalho.
- Agradeço aos meus familiares por todo apoio e incentivo ao longo desta caminhada.
- Agradeço também as pessoas que não foram citadas, mas que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

RESUMO

Nesta tese metodologias analíticas foram desenvolvidas empregando espectroscopia Raman de baixa resolução amplificada por superfície (SERS) e calibração multivariada baseada no método dos mínimos quadrados parciais (PLS) para determinação dos pesticidas endosulfan e metamidofós (e misturas deles) em água, e do hormônio tireoestimulante (TSH) em plasma. Para a construção dos modelos de calibração dos pesticidas, um total de 70 e 30 amostras compuseram os conjuntos de calibração e validação, respectivamente, sendo a divisão realizada pelo algoritmo de Kennard-Stone. Já na construção dos modelos de calibração para a determinação quantitativa dos pesticidas nas misturas, um total de 38 e 11 amostras foram utilizadas na calibração e validação respectivamente. Para construção dos modelos de calibração para quantificação de TSH, um total de 39 mostras foram utilizadas na calibração e 14 amostras de plasma foram utilizadas na validação. As amostras também foram divididas pelo algoritmo de Kennard-Stone. Os modelos foram desenvolvidos utilizando diferentes tipos de pré-processamentos de sinais e comparados através dos erros de previsão (RMSEP). Foram utilizados como pré-processamento, o filtro de transformada de Fourier, a correção de espalhamento multiplicativa, a transformação padrão normal de variação, a ortogonalização de espectros pelo método de Gram-Schmidt, a centralização e autoescalamento dos dados. Os melhores modelos foram validados através da determinação de figuras de mérito. Foram avaliados a exatidão, sensibilidade, sensibilidade analítica, seletividade, ajuste, razão sinal/ruído, limites de detecção e quantificação. A metodologia proposta mostrou-se rápida, de baixo custo e apresentou erros abaixo de 10 µg/L para os pesticidas e abaixo de 0,8 µUI/mL para TSH, podendo facilmente ser adaptada para o monitoramento de pesticidas em águas e também em análises laboratoriais de rotina para determinação de TSH.

ABSTRACT

In this thesis analytical methodologies were developed employing low resolution surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate calibration based on partial least squares method (PLS) for determination of the pesticides endosulfan and methamidophos (and mixtures of them) in water and the thyroid stimulating hormone (TSH) in plasma. For the pesticides calibration model development, a total of 70 and 30 samples composed the calibration and validation sets, respectively, using the Kennard-Stone algorithm for samples separation. In the model development for the mixture of pesticides, a total of 38 and 11 samples were used in the calibration and validation sets, respectively. For the model development in the TSH determination, 39 samples were used in the calibration set and 14 in the validation set. Also the Kennard-Stone algorithm was used to split the samples into the two data sets. The models were developed using different pre-processing methods and compared by using the prediction errors (RMSEP). The following pre-processing were tested: Fourier transform filter, multiplicative scatter correction, standard normal variate, spectra orthogonalization by Gram-Schmidt method, mean center and autoscaling. The best models were validated by figures of merit determination. It was assessed the accuracy, sensibility, analytical sensibility, selectivity, fit, signal/noise ratio, detection and quantification limits. The proposed methodology is fast, has low cost and presented prediction errors below to 10 $\mu\text{g/L}$ for the pesticides and below to 0.8 $\mu\text{UI/mL}$ for TSH. It may easily be adapted for the pesticides monitoring in waters and also for routine laboratory analysis in TSH determination.

Sumário

Lista de Figuras	xxvii
Lista de Tabelas.....	xxiii
Prefácio.....	1
Capítulo 1 - A espectroscopia Raman e o Efeito da Amplificação por Superfície (SERS)	7
1.1. Introdução.....	9
1.2. Modelo ondulatório do espalhamento Raman.....	9
1.2.1. Origem do espectro Raman.....	12
1.3. Espectroscopia Raman amplificada por superfície.....	14
1.3.1. O Mecanismo de amplificação eletromagnético.....	15
1.3.1.1. A superfície plana do metal.....	16
1.3.2. O mecanismo químico de intensificação.....	20
1.3.2.1. Transferência de carga.....	20
Capítulo 2 – Métodos Quimiométricos	23
2.1. Introdução.....	25
2.2. Calibração cultivariada.....	25
2.3. Pré-processamento dos sinais analíticos.....	27
2.3.1. Remoção do ruído experimental: O Filtro de transformada de Fourier.....	28
2.3.2. Correção do espalhamento multiplicativo.....	29
2.3.3. Transformação padrão normal de variação.....	30
2.3.4. Ortogonalização dos espectros: o método de Gram-Schmidt.....	31
2.3.5. Dados centrados na média.....	32
2.3.6. Normalização dos espectros.....	33
2.3.7. Compressão de dados: análise de componentes principais.....	34
2.4. Validação: figuras de mérito.....	36
2.4.1. Exatidão.....	37
2.4.2. Precisão.....	38
2.4.3. Sensibilidade.....	38

2.4.4. Sensibilidade Analítica	39
2.4.5. Linearidade.....	40
2.4.6. Sinal analítico líquido.....	40
2.4.7. Razão sinal/ruído	42
2.4.8. Robustez	43
2.4.9. Limite de detecção e quantificação	43
2.4.10. Seletividade.....	44
Capítulo 3 – Obtenção do Efeito SERS	45
3.1. Instrumentação.....	47
3.2. Preparação da suspensão de nanopartículas de ouro	47
3.3. Caracterização da suspensão de nanopartículas de ouro.....	48
Capítulo 4 – Determinação de Pesticidas em Águas Utilizando o Efeito	
SERS	57
4.1. Introdução	59
4.1.1. Classificação dos pesticidas quanto à toxicidade	61
4.2. Pesticida metamidofós	62
4.3. Pesticida endosulfan	63
4.4. Métodos convencionais de análise.....	64
4.5. Atribuições das bandas vibracionais do espectro Raman do pesticida metamidofós.....	64
4.6. Atribuições das bandas do espectro Raman do pesticida endosulfan	66
4.7. Obtenção dos espectros SERS dos pesticidas em solução aquosa	69
4.8. Modelos de calibração multivariada para o pesticida metamidofós.....	70
4.8.1. Modelo de calibração utilizando a transformada de Fourier como pré-processamento.....	73
4.8.2. Modelo de calibração utilizando a correção de espalhamento	

multiplicativa como pré-processamento	75
4.8.3. Modelo de calibração utilizando o método de ortogonalização de Gram-Schmidt como pré-processamento	77
4.8.4. Comparação dos modelos para o pesticida metamidofós	79
4.9. Modelos de Calibração para o pesticida endosulfan	80
4.9.1. Modelo de calibração utilizando transformada de Fourier como pré-processamento.....	82
4.9.2. Modelo de Calibração utilizando a transformada padrão normal de variação como pré-processamento	84
4.9.3. Modelo de Calibração utilizando correção de espalhamento multiplicativa como pré-processamento	85
4.9.4. Modelo de Calibração utilização ortogonalização de Gram-Schmidt como pré-processamento.....	87
4.9.5. Comparação dos Modelos para o pesticida endosulfan	88
4.10. Modelos de calibração multivariada para misturas dos pesticidas metamidofós e endosulfan	89
4.11. Validação dos melhores modelos de Calibração.....	93
Capítulo 5 – Determinação de TSH em plasma sanguíneo utilizando SERS	103
5.1. Introdução	105
5.1.1. Hormônio Tireoestimulante (TSH).....	106
5.2. Parte experimental	107
5.3. Resultados e discussão.....	110
Conclusões.....	117
Referências Bibliográficas	121

Lista de Figuras

Figura 1.1. Esquema das transições vibracionais dos espalhamentos: Raman Stockes, Rayleigh e Raman Anti-Stockes.....	13
Figura 1.2. Vetores campo elétrico e magnético da luz incidente e refletida para <i>s</i> -polarização e <i>p</i> -polarização na superfície do metal.....	16
Figura 1.3. O processo de transferência de carga	21
Figura 2.1. Representação esquemática da seqüência de operações utilizada na aplicação do filtro de transformada de Fourier	29
Figura 2.2. Ortogonalização de vetores para remoção da fluorescência usando o método de Gram-Schmidt	32
Figura 2.3. Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do sinal analítico líquido	41
Figura 3.1. Espectro de absorção no ultravioleta-visível da suspensão de nanopartículas de ouro.....	49
Figura 3.2. Espectro de absorção no ultravioleta-visível da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 1 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L.....	50
Figura 3.3. Espectro de absorção da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 2 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L	50
Figura 3.4. Espectro de absorção da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 3 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L	51
Figura 3.5. Espectro de absorção da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 4 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L	51
Figura 3.6. Espectro de absorção da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L	52

Figura 3.7. Microscopia eletrônica de varredura da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L	53
Figura 3.8. Microscopia eletrônica de varredura da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L	53
Figura 3.9. Espectros Raman do cristal violeta	54
Figura 3.10. Espectros Raman dos cristais de violeta na presença de ouro coloidal	55
Figura 4.1. Fórmula estrutural do pesticida metamidofós.....	62
Figura 4.2. Fórmula estrutural do endosulfan.....	63
Figura 4.3. Espectro Raman do pesticida metamidofós puro	65
Figura 4.4. Estrutura molecular do pesticida metamidofós.....	66
Figura 4.5. Espectro Raman do pesticida puro endosulfan.....	67
Figura 4.6. Estrutura molecular do pesticida endosulfan.....	68
Figura 4.7. Espectros Raman SERS do metamidofós não pré-processados	71
Figura 4.8. Modelo de calibração para determinação de metamidofós	73
Figura 4.9. Espectros SERS do pesticida metamidofós após utilização do filtro com transformada de Fourier	74
Figura 4.10. Modelo de calibração para determinação de metamidofós com pré-processamento por filtro com transformada de Fourier.....	75
Figura 4.11. Espectros SERS do pesticida metamidofós com pré-processamento por MSC.	76
Figura 4.12. Modelo de calibração para determinação de metamidofós com pré-processamento por MSC.....	77
Figura 4.13. Espectros SERS de metamidofós pré-processado com ortogonalização	78

Figura 4.14. Modelo de calibração para determinação de metamidofós com pré- processamento por ortogonalização	79
Figura 4.15. Espectros Raman SERS de endosulfan não pré- processados	81
Figura 4.16. Modelo de calibração para determinação de endosulfan. (●) calibração; (▼) validação	82
Figura 4.17. Espectros SERS do pesticida endosulfan após utilização do filtro de transformada de Fourier	83
Figura 4.18. Modelo de calibração para determinação do endosulfan com transformada de Fourier como pré-processamento. (●) calibração; (▼) validação	84
Figura 4.19. Modelo de calibração para determinação de endosulfan utilizando SNV como pré-processamento. (●) calibração; (▼) validação.....	85
Figura 4.20. Espectros Raman SERS de endosulfan pré-processados com MSC	86
Figura 4.21. Modelo de calibração para determinação de endosulfan com pré- processamento por MSC. (●) calibração; (▼) validação	86
Figura 4.22. Espectros Raman SERS de endosulfan pré-processados com ortogonalização	87
Figura 4.23. Modelo de calibração para determinação de endosulfan com pré- processamento por ortogonalização. (●) calibração; (▼) validação.....	88
Figura 4.24. Espectros Raman SERS das misturas de pesticidas endosulfan e metamidofós.....	90
Figura 4.25. Valores de referência contra os previstos pelo modelo para a quantificação do pesticida endosulfan na mistura. (●) calibração; (▼) validação	91

Figura 4.26. Valores de referência contra os previstos pelo modelo para a quantificação do pesticida metamidofós na mistura. (●) calibração; (▼) validação	92
Figura 4.27. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para o pesticida endosulfan. (●) amostras de calibração, (*) amostras de validação	95
Figura 4.28. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para o pesticida metamidofós. (●) amostras de calibração, (*) amostras de validação	95
Figura 4.29. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para o pesticida endosulfan na mistura. (●) amostras de calibração, (*) amostras de validação	96
Figura 4.30. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para o pesticida metamidofós na mistura. (●) amostras de calibração, (*) amostras de validação	96
Figura 4.31. Escalar NAS contra as concentrações de referência para o endosulfan.....	97
Figura 4.32. Escalar NAS contra as concentrações de referência para o metamidofós.....	97
Figura 4.33. Escalar NAS contra as concentrações de referência para o endosulfan na mistura	98
Figura 4.34. Escalar NAS contra as concentrações de referência para o metamidofós na mistura	98
Figura 4.35. Gráfico de erros absolutos contra os valores de referência do modelo de calibração para determinação do pesticida endosulfan	99
Figura 4.36. Gráfico de erros absolutos contra os valores de referência do modelo de calibração para determinação do pesticida metamidofós	100

Figura 4.37. Gráfico de erros absolutos contra os valores de referência do modelo de calibração para determinação do pesticida endosulfan na mistura ...	100
Figura 4.38. Gráfico de erros absolutos contra os valores de referência do modelo de calibração para determinação do pesticida metamidofós na mistura	101
Figura 5.1. Espectros SERS de plasma sanguíneo sem pré-processamento.....	110
Figura 5.2. Espectros SERS de plasma sanguíneo após pré-processamento	111
Figura 5.3. Gráfico usado para a escolha no número de variáveis Latentes.....	112
Figura 5.4. Valores de referência contra previstos pelo modelo para determinação de TSH. (●) calibração; (▼) validação.....	114
Figura 5.5. Escalar NAS contra as concentrações de Referência, (○) amostras de calibração, (*) amostras de validação	115
Figura 5.6. Gráfico de erros absolutos contra as concentrações de referência...	116

Lista de Tabelas

Tabela 4.1. Classificação toxicológica de pesticidas	61
Tabela 4.2. Atribuição das bandas Raman para o pesticida metamidofós	66
Tabela 4.3. Atribuição das bandas Raman para o pesticida endosulfan	68
Tabela 4.4. Soluções preparadas das diferentes concentrações das misturas de pesticidas	70
Tabela 4.5. Valores dos erros calculados pelos modelos de calibração para quantificação de metamidofós	79
Tabela 4.6. Valores de teste F para os diferentes modelos Desenvolvidos	80
Tabela 4.7. Valores dos erros calculados pelos modelos de calibração para quantificação de endosulfan	89
Tabela 4.8. Valores dos erros calculados pelos modelos de calibração para quantificação de endosulfan nas misturas	92
Tabela 4.9. Valores dos erros calculados pelos modelos de calibração para quantificação de metamidofós nas misturas	93
Tabela 4.10. Figuras de Mérito para os modelos desenvolvidos	93
Tabela 5.1. Concentrações obtidas pelo método quimioluminescente	109
Tabela 5.2. Resultados de figuras de mérito estimadas para o modelo PLS	113

PREFÁCIO

Os equipamentos utilizados para obtenção dos espectros Raman podem ser divididos entre dispersivos e baseados em transformada de Fourier. Os equipamentos com transformada de Fourier utilizam lasers operando a 1064 nm que fazem com que pouca ou nenhuma fluorescência seja observada nas medidas, porém a intensidade Raman é pequena, o que é compensada com a utilização da vantagem das medidas multiplexadas. Esses equipamentos têm custos elevados, mas conseguem ótima resolução e relação sinal/ruído.

Porém recentemente com o desenvolvimento dos lasers de diodo e detectores de matriz de diodo de carga acoplada (CCD), equipamentos portáteis e de baixo custo tem surgido no mercado, o que pode tornar possível o desenvolvimento de aplicações com espectroscopia Raman mais simples e a um custo acessível. A desvantagem desses equipamentos mais simples é que normalmente lasers no visível são utilizados, gerando espectros com fluorescência e pouco resolvidos.

Com a possibilidade do tratamento dos dados por métodos quimiométricos, tem sido demonstrado, principalmente com a espectroscopia no infravermelho próximo, que a ausência de resolução e a presença de fortes interferências espectrais não são fatores limitantes para o desenvolvimento de metodologias de análise para determinações quantitativas. Assim pode-se pensar em metodologias analíticas com a união da espectroscopia Raman de baixa resolução e métodos quimiométricos.

A espectroscopia Raman amplificada por superfícies (SERS – do inglês, Surface Enhanced Raman Spectroscopy), desenvolvida na década de 70, é realizada pela adsorção do analito em superfícies coloidais metálicas, propiciando a amplificação no efeito Raman. Dessa forma, pode-se com essa técnica espectroscópica vibracional alcançar níveis de concentração extremamente baixos, podendo assim ser utilizada em metodologias analíticas para análise de “traços”.

Esta tese teve como objetivo utilizar técnicas quimiométricas de calibração multivariada baseada em mínimos quadrados parciais (PLS – do inglês, Partial Least Squares) para determinação de pesticidas em águas e também de

hormônio tireoestimulante (TSH – do inglês, Thyroid Stimulating Hormone) em plasma utilizando a espectroscopia Raman de baixa resolução amplificada por superfície (SERS) como resposta instrumental. O recurso de amplificação do sinal Raman foi utilizado para que se possam fazer determinações “traço” tanto para pesticidas ($\mu\text{g/mL}$) quanto para TSH ($\mu\text{UI/mL}$).

O procedimento SERS para o monitoramento de águas superficiais próximas às indústrias e lavouras é extremamente atraente, dada a simplicidade experimental dos métodos envolvidos, a possibilidade de determinações simultâneas de pesticidas de um modo extremamente rápido, além de ter a vantagem de fazer análises *in situ*, vantagem que a técnica cromatográfica ainda não possui.

Para a determinação de TSH, o procedimento SERS é também extremamente atraente dada a simplicidade experimental dos métodos envolvidos, os baixos limites de detecção possíveis de serem alcançados, a rapidez do método para se obter o resultado e, principalmente, a isenção de reagentes radioativos e não-radioativos nesta determinação.

A presente tese foi dividida em cinco capítulos, sendo que o primeiro intitulado **A Espectroscopia Raman e o Efeito da Amplificação por Superfície** apresenta a teoria da técnica empregada para determinação dos pesticidas em águas e também do TSH em plasma.

O segundo capítulo intitulado **Métodos Quimiométricos** reporta a parte teórica sobre os métodos quimiométricos (pré-processamento de sinais, métodos de quantificação e validação) utilizados no desenvolvimento dos modelos de calibração multivariada.

O terceiro capítulo intitulado **Obtenção do Efeito SERS** explica como foram produzidos e otimizados os colóides de ouro utilizados na amplificação do espalhamento Raman.

O quarto capítulo intitulado **Determinação de Pesticidas em Água utilizando o Efeito SERS** apresenta os modelos de calibração multivariada e pré-processamentos de dados utilizados para quantificação dos pesticidas Metamidofós e Endosulfan, assim como a mistura deles. A validação dos modelos

de calibração multivariada é proposta com base na determinação de figuras de mérito.

O quinto capítulo intitulado **Determinação de TSH em Plasma Sanguíneo utilizando SERS**, aborda a metodologia desenvolvida, utilizando a espectroscopia Raman de Baixa Resolução Amplificada por Superfície para quantificação do hormônio tireoideano (TSH). Também nesse caso foi realizada a validação do modelo pela determinação das figuras de mérito.

Finalmente a tese se encerra pelas **Conclusões** e apresentação das **Referências Bibliográficas** utilizadas.

CAPÍTULO 1

**A ESPECTROSCOPIA RAMAN E O EFEITO DA AMPLIFICAÇÃO
POR SUPERFÍCIE**

1.1. Introdução

A espectroscopia Raman [1-4] ocupa hoje uma posição destacada dentre as técnicas usadas na investigação da estrutura microscópica da matéria.

É sabido que as técnicas espectroscópicas de uma maneira geral, fornecem informações detalhadas sobre os níveis de energia das espécies em estudo; particularmente no caso da espectroscopia vibracional, a grande vantagem reside na maior riqueza de detalhes proporcionada pelos níveis de energia vibracionais, frente aos níveis de energia eletrônicos: enquanto os espectros eletrônicos são constituídos por bandas largas usualmente sem estrutura, os vibracionais representam a “impressão digital” da molécula.

Sem dúvida, a espectroscopia Raman detém uma série de vantagens sobre a espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) sendo que as principais são a possibilidade de obtenção de espectros de substâncias em meio aquoso e a utilização de recursos especiais, como o efeito Raman ressonante e o efeito de amplificação por superfície, que aumentam sua sensibilidade.

Mais ainda, trata-se de uma técnica de investigação qualitativa e quantitativa, que combinada com o uso de fibras óticas, permite a monitoração remota de amostras; essa possibilidade vem sendo explorada, por exemplo, no estudo de matrizes biológicas [5] na determinação de pesticidas [6] e em pesquisas biomédicas por permitir o estudo de tecidos [7] “in vivo”.

1.2. Modelo ondulatório do espalhamento Raman

Os espectros Raman são obtidos irradiando-se uma amostra com uma fonte de *laser* potente de radiação monocromática no visível ou no infravermelho próximo. Durante a irradiação, o espectro da radiação espalhada é medido em certo ângulo (geralmente 90 graus) com um espectrômetro apropriado. As intensidades das linhas Raman são, quando muito, 0,001% da intensidade da fonte; como conseqüência, sua detecção e medida são mais difíceis do que em um espectro no infravermelho.

A causa básica do espalhamento Raman é a polarização induzida na molécula pelo campo elétrico oscilante da radiação eletromagnética incidente. Este dipolo induzido espalha a radiação com ou sem alteração da energia vibracional da molécula. A polarização P induzida na molécula depende da polarizabilidade α desta molécula e do campo elétrico da radiação eletromagnética incidente E , como apresentado na equação 1.1, abaixo.

$$P = \alpha E \quad (1.1)$$

A polarizabilidade dos elétrons de uma molécula dependerá da freqüência de vibração molecular e, portanto podemos considerar como uma aproximação bastante razoável que o potencial que governa esta variação na polarizabilidade é o mesmo que governa as vibrações moleculares, isto é, o potencial do oscilador harmônico. Assim sendo, um feixe de radiação com freqüência ν_{ex} incidindo sobre uma solução de um analito tem o campo elétrico E dessa radiação descrito pela equação:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu_{\text{ext}} t) \quad (1.2)$$

onde E_0 é a amplitude da onda. Quando o campo elétrico da radiação interage com uma nuvem eletrônica de uma ligação do analito induz-se um momento dipolar P na ligação que é dado por:

$$P = \alpha E = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu_{\text{ext}} t) \quad (1.3)$$

Para ser ativa no Raman, a polarizabilidade α de uma ligação precisa variar em função da distância entre os núcleos, de acordo com a equação:

$$\alpha = \alpha_0 + (r - r_{eq}) \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \quad (1.4)$$

onde α_0 é a polarizabilidade da ligação na distância internuclear de equilíbrio r_{eq} e a separação internuclear em qualquer instante é r . A variação na separação internuclear se altera com a frequência de vibração ν_v e é dada por:

$$r - r_{eq} = r_m \cos(2\pi\nu_v t) \quad (1.5)$$

Onde r_m é a separação internuclear máxima relativa à posição de equilíbrio. Substituindo a equação 1.5 na 1.4 temos:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) r_m \cos(2\pi\nu_v t) \quad (1.6)$$

Podemos, então, obter uma expressão para o momento dipolar induzido P substituindo a equação 1.6 na equação 1.3. Assim,

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_{ext} t) + E_0 r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos(2\pi\nu_v t) \cos(2\pi\nu_{ext} t) \quad (1.7)$$

A equação 1.7 pode ser rearranjada para:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_{ext} t) + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos \left[\pi \left(\nu_{ext} - \nu_v \right) t \right] + \frac{E_0}{2} r_m \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right) \cos \left[\pi \left(\nu_{ext} + \nu_v \right) t \right] \quad (1.8)$$

O primeiro termo da equação 1.8 contém somente o termo de frequência de excitação ν_{ext} e corresponde ao espalhamento inelástico, sem troca de energia com a molécula, também chamado de espalhamento Rayleigh e ocorre na mesma frequência da radiação incidente e, portanto, não apresenta nenhuma informação sobre os níveis vibracionais da molécula em questão. Já no segundo termo, aparecem as radiações espalhadas com frequência $(\nu_{ext} - \nu_v)$, chamado de

espalhamento Raman Stokes e $(\nu_{ext} + \nu_v)$ chamado de espalhamento Raman anti-Stokes. Aqui a frequência de excitação foi modulada pela frequência vibracional da ligação. É importante notar que o espalhamento Raman exige que a polarizabilidade de uma ligação varie em função da distância, isto é, $\partial\alpha/\partial r$ na equação 1.8 precisa ser maior que zero para que as linhas Raman apareçam.

1.2.1. Origem do espectro Raman

Na espectroscopia Raman, a excitação espectral é normalmente realizada por radiação de comprimento de onda resultante dos picos de absorção do analito.

O diagrama de energia da Figura 1.1 mostra um quadro qualitativo das fontes de espalhamentos Rayleigh e Stokes [8]. A figura mostra a variação de energia na molécula quando ela interage com um fóton da fonte. O processo mostrado não é *quantizado*, assim, dependendo da frequência da radiação da fonte, a energia de uma molécula pode assumir um número infinito de *estados virtuais*, entre o estado fundamental e o primeiro estado eletrônico excitado.

Na transição mostrada à esquerda tem-se a passagem do estado fundamental para um estado virtual, cuja energia é dada por $E=h\nu_0$. Esse processo gera uma emissão Raman quando a molécula perde a energia decaindo para o primeiro nível vibracional excitado ($E=h\nu_v$). Isso gera bandas Raman Stokes. Na transição do centro da figura, tem-se a variação de energia, pela absorção do fóton, entre o estado fundamental e o estado virtual. Nesse caso, após o decaimento, volta-se ao estado fundamental. Tem-se o espalhamento Rayleigh, sem perda de energia, e como conseqüência as colisões são denominadas elásticas. Finalmente, a transição mostrada à direita apresenta a passagem entre um primeiro nível excitado vibracional e um estado virtual de maior energia. Após o decaimento, tem-se a volta para o estado fundamental, com variação na energia. Isso gera as bandas Raman anti-Stokes

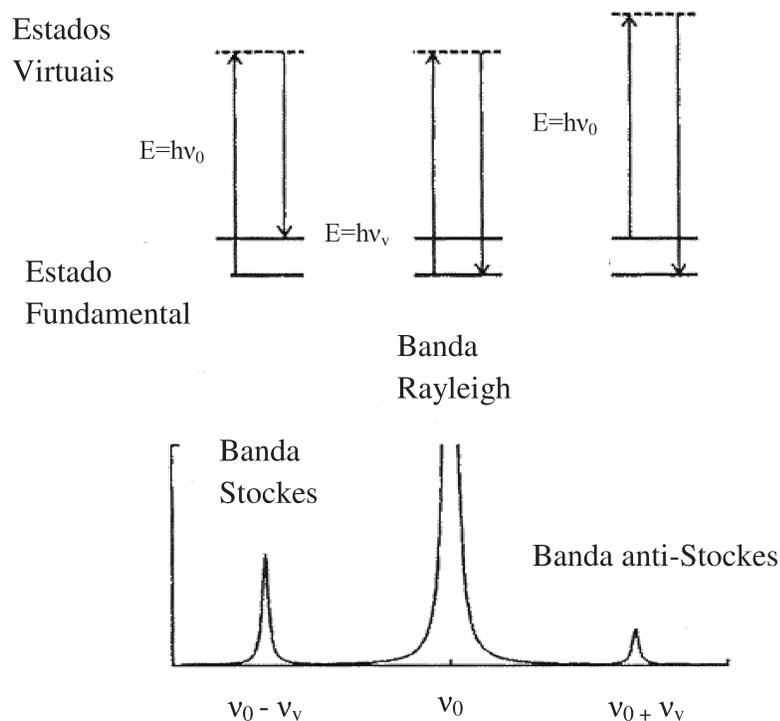


Figura 1.1. Esquema das transições vibracionais dos espalhamentos: Raman Stokes, Rayleigh e Raman Anti-Stockes.

Na espectroscopia Raman, tanto moléculas diatômicas heteronucleares como moléculas diatômicas homonucleares apresentam atividade, pois em ambos os casos ocorre variação na polarizabilidade durante a vibração. Por exemplo, a polarizabilidade da ligação dupla carbono-carbono varia significativamente durante a vibração molecular e, portanto seu espalhamento Raman é forte, já na ligação dupla carbono-oxigênio a variação da polarizabilidade não é tão intensa, pois esta ligação já possui um momento de dipolo permanente intenso. No infravermelho ocorre justamente o contrário, a absorção da ligação dupla carbono-carbono é fraca e a absorção da ligação dupla carbono-oxigênio forte. Fatos como este levaram a generalização equivocada de espécies ativas no infravermelho são inativas na espectroscopia Raman.

No espectro Raman, há simetria em relação à linha Rayleigh, uma banda do lado de freqüências mais baixas, as Stokes, e uma do lado das freqüências

mais altas, as anti-Stokes. Como a população dos estados excitados segue a distribuição de Boltzmann, deve-se esperar que as bandas anti-Stokes tenham menor intensidade do que as linhas Stokes.

1.3. Espectroscopia Raman amplificada por superfície

A espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS - do inglês Surface Enhanced Raman Spectroscopy) desenvolvida na década de 70 [9] é realizada pela adsorção do analito em superfícies coloidais metálicas ou em superfícies ásperas desse metal, propiciando a amplificação no efeito Raman [10].

No descobrimento do feito por Fleischmann, reportou-se um espectro muito intenso da piridina em uma superfície áspera de um eletrodo de prata. A intensidade do espectro foi inicialmente atribuída ao aumento no empacotamento molecular na superfície do eletrodo. Pesquisas posteriores mostraram que este aumento isolado na densidade de empacotamento não poderia provocar o enorme aumento na intensidade do espectro Raman e em 1977 duas teorias independentes foram formuladas para descrever o fenômeno.

Superfície áspera é essencial para a obtenção do efeito SERS. Neste contexto, “aspereza” significa que a superfície deve ter regiões com certa curvatura. Por exemplo, prata coloidal com um diâmetro médio de partículas de 40 nm é considerada áspera, embora cada partícula coloidal seja essencialmente lisa (microscopicamente áspera).

O efeito SERS tem sido assim explicado por duas teorias: A teoria eletromagnética, em que o campo eletromagnético do metal-superfície é amplificado pelo campo incidente devido à geração de plasmons superficiais; e a teoria química, que propõe a interação química entre analito e substrato, através do arranjo das ligações ou transferência de carga, resultando no aumento da polarizabilidade das moléculas do analito. A amplificação do espalhamento é normalmente muito alta, da ordem de 10^6 ou mais, permitindo a obtenção dos espectros Raman de substâncias químicas em um curto tempo de integração e/ou sem a subtração de “backgrounds” [11].

No desenvolvimento da metodologia SERS, alguns fatores importantes devem ser levados em consideração na obtenção do substrato ativo, como por exemplo: a efetividade na amplificação, a durabilidade e reprodutibilidade.

Dentre os materiais, incluindo metais e semicondutores, os metais prata (Ag), ouro (Au) e cobre (Cu) são os mais usados para induzir a amplificação do espectro Raman por superfície de amostras químicas. A superfície metal-substrato para ativar o SERS pode geralmente incluir as seguintes formas: sóis-coloidais, eletrodos porosos e filmes metálicos. Uma vantagem dos sóis coloidais metálicos está na sua simples preparação e manipulação. Porém, a variação da intensidade SERS com o tempo de vida do sol é o maior fator limitante na aplicação do substrato em análises. Eletrodos porosos podem ser usados para amplificar sinais Raman de uma ampla gama de analitos, mas a inclusão do aparelho eletroquímico complica as medidas do sistema. A aplicação de filmes via sol-gel, possui o potencial para contornar estas desvantagens [12], porém ainda existem problemas práticos nessa implementação que dependem da estrutura e formação do sol-gel.

1.3.1. O mecanismo de amplificação eletromagnético (EM)

No mecanismo EM, há várias propriedades que são de extrema importância no efeito SERS. Estas propriedades, na superfície, incluem a forma e tamanho (por exemplo, uma pequena irregularidade na forma das partículas metálicas, uniformidade no tamanho das nano partículas, partículas metálicas coloidais ou agregados fractais, etc.) e também a frequência dependente da função dielétrica na superfície dos materiais [13]. A intensificação do campo eletromagnético na superfície do metal é primariamente causada pelo campo elétrico local na superfície, campo este que é responsável pela excitação da radiação Raman e também pelo momento de dipolo induzido em moléculas adsorvidas sobre a superfície irregular do metal.

1.3.1.1. A superfície plana do metal

Para entender facilmente a interação da luz incidente com uma superfície, devemos analisar o esquema desta interação conforme mostrado na figura 1.2.

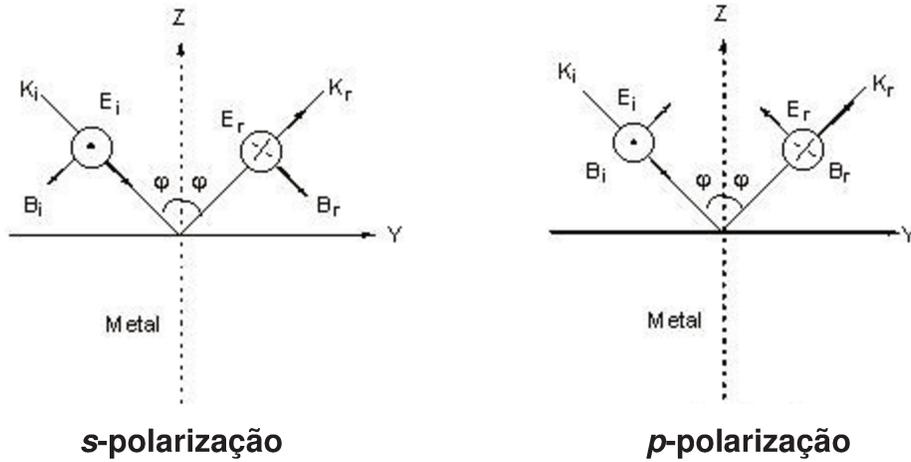


Figura 1.2. Vetores campo elétrico e magnético da luz incidente e refletida para s-polarização e p-polarização na superfície do metal.

Os vetores campo elétrico e campo magnético correspondem as denotações K_i , E_i , B_i e K_r , E_r , B_r respectivamente. Os vetores obedecem independentemente a regra da mão direita para a luz incidente e refletida.

Para uma superfície plana tem-se [14-16]:

$$E_s^{surf} = E_s^i \left(+ r_s \right) \quad (1.9)$$

$$E_{p,y}^{surf} = E_{p,y}^i \left(- r_p \right) \cos \quad (1.10)$$

$$E_{p,z}^{surf} = E_{p,z}^i \left(+ r_p \right) \sin \quad (1.11)$$

onde os índices s e p indicam as direções de p- e s-polarização, y e z denotam as componentes do campo (E) paralelo aos eixos y , z (ver figura 1.2). O sobrescrito surf simboliza as componentes primárias do campo na superfície, r_s e r_p

correspondem aos coeficientes de Fresnel na reflexão da luz. O sinal positivo ou negativo que compõe os coeficientes de Fresnel é uma consequência no deslocamento da fase pelo 0 (π) para a onda refletida.

O comportamento da refletividade é facilmente descrito usando as expressões para os coeficientes de Fresnel r_p e r_s para irradiação da luz numa superfície metálica da solução em análise em função da função dielétrica da superfície metálica [14] é dada por:

$$r_s = \frac{\cos \varphi - \sqrt{-\operatorname{sen}^2 \varphi}}{\cos \varphi + \sqrt{-\operatorname{sen}^2 \varphi}} \quad (1.12)$$

$$r_p = \frac{\varepsilon \cos \varphi - \sqrt{-\operatorname{sen}^2 \varphi}}{\varepsilon \cos \varphi + \sqrt{-\operatorname{sen}^2 \varphi}} \quad (1.13)$$

em que φ representa o ângulo incidente. Note que a função dielétrica, $\varepsilon(\omega, K)$ depende da frequência ω e do vetor onda K da luz incidente. Porém nos negligenciamos a correlação de $\varepsilon(\omega, K)$ com K .

As componentes de espalhamento do campo óptico na superfície do metal são dadas, de acordo com a polarização conforme equação 1.14,

$$\begin{aligned} E'_s &= (-r'_s) \hat{p}_x \\ E'_p &= (-r'_p) \hat{p}_y \cos \varphi + (+r'_p) \hat{p}_z \operatorname{sen} \varphi \end{aligned} \quad (1.14)$$

Em que os primeiros representam a luz espalhada. As quantias polarizadas p_x, p_y e p_z são dadas por:

$$\begin{aligned} p_x &= \alpha_{xx} E_x + \alpha_{xy} E_y + \alpha_{xz} E_z \\ p_y &= \alpha_{yx} E_x + \alpha_{yy} E_y + \alpha_{yz} E_z \\ p_z &= \alpha_{zx} E_x + \alpha_{zy} E_y + \alpha_{zz} E_z \end{aligned} \quad (1.15)$$

onde α representa a polarizabilidade. Substituindo a equação 1.15 em 1.13, obtemos as intensidades Raman para superfície [14-16], conforme as equações 1.16, 1.17, 1.18 e 1.19.

$$I_s = C\omega_{sc}^4 |\alpha_{xx} \left(+r_s \right) \left(+r'_s \right)|^2 \quad (1.16)$$

$$I_{ps} = C\omega_{sc}^4 \left| \alpha_{xy} \left(-r_p \right) \left(+r'_s \right) \cos + \alpha_{yz} \left(+r_p \right) \left(+r'_s \right) \text{sen} \right|^2 \quad (1.17)$$

$$I_{ps} = C\omega_{sc}^4 \left| \alpha_{yx} \left(+r_s \right) \left(+r'_p \right) \cos + \alpha_{zx} \left(+r_s \right) \left(-r'_p \right) \text{sen} \right|^2 \quad (1.18)$$

$$I_{ps} = C\omega_{sc}^4 \left| \begin{array}{l} \alpha_{yy} \left(-r_p \right) \cos + \alpha_{yz} \left(+r_p \right) \text{sen} \left(-r'_p \right) \cos + \\ \alpha_{zy} \left(-r_p \right) \cos + \alpha_{zz} \left(+r_p \right) \left(+r'_p \right) \text{sen} \end{array} \right|^2 \quad (1.19)$$

Através das equações descritas acima, certos aspectos da intensidade do espalhamento Raman, podem ser deduzidos para moléculas adsorvidas na superfície. Se ignorarmos o efeito do tensor polarizabilidade, a intensidade do espalhamento Raman pode ser determinada por dois fatores: pelos ângulos da radiação incidente e espalhada, e pela função dielétrica da frequência dependente $\epsilon(\omega)$. Ângulos incidentes entre 60° e 65° [17] são sugeridos para intensificar o campo óptico local da superfície, sendo assim um dos principais processos na intensificação máxima do espalhamento Raman. A dependência da função dielétrica na frequência da radiação incidente (ω) será discutida detalhadamente no parágrafo seguinte.

Assumindo o modelo do oscilador harmônico e omitindo a interação do elétron com o campo magnético do campo óptico, a função dielétrica da frequência dependente pode ser escrita da seguinte forma [18-20]:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - i\omega\gamma} \quad (1.20)$$

em que γ é o coeficiente amortecimento introduzido para permitir a perda de energia eletromagnética no interior do metal, e ω_p é a freqüência do plasmon, que depende do número e propriedades de elétrons livres em qualquer sistema.

$$\omega_p^2 = \frac{4\pi N e^2}{m \varepsilon_0} \quad (1.21)$$

Na equação 1.21, N , e e m representam respectivamente a densidade numérica, a carga e a massa dos elétrons livres do sistema. Esta formulação pode ser usada para discutir o campo elétrico local da superfície e também o espalhamento Raman através de uma superfície.

Mudando-se o comprimento de onda da radiação incidente para o vermelho, a função dielétrica ε pode ter um sinal negativo dando um extenso valor absoluto. Neste caso, r_s tende a -1, enquanto r_p aproxima-se de 1. Como resultado, a componente tangencial do campo na superfície é aproximadamente zero. Este valor da componente é relativo ao cancelamento do campo incidente e do campo refletido [15]. Por essa razão, para espectroscopia de absorção no infravermelho, somente o dipolo induzido normal na superfície contribui na intensidade.

Quando a freqüência da radiação incidente está próxima à freqüência do plasmon ω_p , ocorre a ressonância entre as freqüências do plasmon e da radiação incidente. Neste caso, se omitirmos a parte imaginária da função dielétrica, o $|\varepsilon|$ será muito pequeno, por exemplo, r_s tende a 1, enquanto r_p tende a -1. Como resultado, há um aumento na componente campo s-polarização e a componente p-polarização ao longo da direção y . Em contraste, a componente p do campo normal da superfície é maciçamente atenuada.

Para espectroscopia Raman, as radiações nas regiões do visível e ultravioleta próximo são freqüentemente usadas como fonte de excitação. Portanto, a função dielétrica não é muito pequena e assim, a componente tangencial do campo local da superfície não será zero. Por essa razão, baseado na teoria EM, a intensificação máxima do campo local numa superfície plana não é mais do que dois, conduzindo para um fator máxima intensificação de 16 na intensidade do espalhamento Raman [13].

1.3.2. O Mecanismo Químico de Intensificação

Esse modelo é baseado no princípio que uma molécula adsorvida pode, sob condições específicas, interagir com a superfície do metal de maneira que provoque um enorme aumento na polarizabilidade molecular, α [21].

Há alguns fatores que influenciam e contribuem no mecanismo químico. Dentre eles podemos citar a interação da ligação química entre moléculas adsorvidas e átomos que constituem a superfície metálica, a orientação e cobertura das moléculas e a estrutura da superfície metálica. Porém, estes fatores que influenciam a intensidade SERS dependem do mecanismo de transferência de carga envolvido.

1.3.2.1. Transferência de Carga

No modelo de transferência de carga, os fótons incidentes excitam um elétron da superfície metálica para a molécula adsorvida, gerando uma molécula excitada negativamente carregada. A geometria molecular dessa molécula excitada é diferente das espécies neutras. Esta transferência de carga induz uma relaxação nuclear dentro da molécula excitada, que resulta no retorno do elétron para a superfície do metal, o aparecimento de uma molécula neutra excitada e a emissão de um fóton numa freqüência deslocada (Raman).

No espalhamento Raman, transferência de carga é um processo de excitação virtual em que o estado de transferência de carga pode estar parcialmente em ressonância com a radiação de excitação. Este processo gera uma grande contribuição na seção cruzada do espalhamento Raman do complexo molécula-metal. Este é assumido e é provavelmente o caso de vários sistemas experimentais, que é normalmente uma fraca interação envolvida no sistema substrato-molécula. Neste nível de energia molecular ocorre um entrelaçamento com a banda de condução do metal [22].

Geralmente, o processo de transferência de carga envolve os quatro passos seguintes [23] (1) um fóton é aniquilado, então um elétron é excitado de um doador (2) O elétron excitado é transferido para uma molécula adsorvida ou para o próprio substrato metálico; (3) o elétron excitado volta para o doador a partir do receptor e ao mesmo tempo um fóton Raman é emitido (4), o complexo metal e molécula adsorvente estão localizados em níveis vibracionais excitados como mostrado na Figura 1.3.

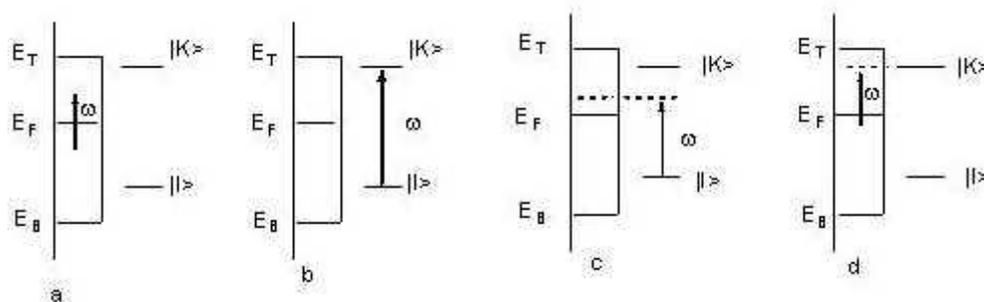


Figura 1.3. (a) O elétron é excitado no interior do metal. (b) O elétron intramolecular é excitado pela luz incidente. (c) O elétron da superfície do metal é excitado para a molécula adsorvida. (d) O elétron intramolecular é excitado para um orbital vazio do metal da superfície.

CAPÍTULO 2

MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

2.1. Introdução

A quimiometria [24] pode ser definida como uma área da química que usa métodos matemáticos, estatísticos e de lógica formal para planejar ou selecionar procedimentos ótimos de medidas e experimentos e extrai o máximo da informação química relevante, com a análise dos dados.

O termo quimiometria foi utilizado pela primeira vez por químicos, nos anos setenta, formalizando uma área de estudo de aplicação de métodos matemáticos às ciências químicas. O primeiro químico a utilizar esta expressão talvez tenha sido S. Wold (*Umea University* – Suécia), que trabalhava em métodos de reconhecimento de padrões.

A quimiometria divide-se em algumas áreas principais, muito pesquisadas e aplicadas atualmente como: processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e classificação de dados [25] calibração multivariada [26], monitoramento e modelagem de processos multivariados [27] e métodos de inteligência artificial [28].

A construção de modelos de regressão a partir de dados de primeira ordem, ou seja, dados que podem ser representados através de um vetor para cada amostra, tem sido a principal linha de pesquisa da quimiometria aplicada à química analítica. A construção desses modelos é denominada de calibração multivariada.

2.2. Calibração multivariada

A calibração multivariada [29] pode ser definida como uma série de operações que estabelecem, sob condições específicas, uma relação entre medidas instrumentais e valores para uma propriedade de interesse correspondente.

Um modelo de calibração, na verdade, é uma função matemática (f) que relaciona dois grupos de variáveis, uma delas denominada independente (\mathbf{X}) e a outra denominada dependente (\mathbf{Y}):

$$\mathbf{Y} = f(\mathbf{X}) = \mathbf{Xb} \quad (2.1)$$

Esta etapa representa a calibração e por isso o conjunto de dados empregado para essa finalidade é chamado conjunto de calibração. Os parâmetros do modelo são denominados de coeficiente de regressão (\mathbf{b}) determinados matematicamente a partir de dados experimentais.

Após construção do modelo, este deve ser validado. Nesta etapa, as variáveis independentes obtidas para outro conjunto de amostras, são utilizadas em conjunto com os coeficientes de regressão para que sejam calculados os valores previstos para a variável dependente. No conjunto de validação utilizam-se amostras cujas variáveis dependentes sejam conhecidas para que seja possível estabelecer uma comparação entre os valores previstos, calculados na etapa de validação, e os valores conhecidos previamente através de metodologia padrão, o que permitirá a avaliação sobre o desempenho do modelo de calibração proposto.

O método de calibração multivariada mais utilizado e considerado como padrão dentro da área, é o método dos mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês – *Partial Least Squares*) [30].

A base do PLS é decompor a matriz (\mathbf{X}) das variáveis independentes e a matriz (\mathbf{Y}) das variáveis dependentes, em um produto de duas matrizes menores mais uma matriz de erro, como segue:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP} + \mathbf{E} \quad (2.2)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ} + \mathbf{F} \quad (2.3)$$

em que as matrizes \mathbf{T} e \mathbf{U} são chamadas de matrizes dos escores; \mathbf{P} e \mathbf{Q} matrizes dos loadings; \mathbf{E} e \mathbf{F} as matrizes de erro de \mathbf{X} e \mathbf{Y} respectivamente. Esta decomposição é muito útil nos casos em que a matriz \mathbf{X} é mal condicionada, ou ainda, quando o número de amostras é menor que o número de variáveis

independentes visto que podemos utilizar uma matriz **T** de dimensão inferior a da matriz **X** sem perda de informação útil, eliminando ruído e colinearidade dos dados.

Efetuada a decomposição anterior, o próximo passo é ajustar uma relação linear, quando possível, entre **U** e **T**, como segue:

$$\mathbf{U} = \mathbf{bT} + \mathbf{e} \quad (2.4)$$

em que **b** é o coeficiente do ajuste, usualmente obtido com algoritmo NIPALS. Finalmente, podemos substituir **U** na equação 2.3, e obter:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{bTQ} + \mathbf{F} \quad (2.5)$$

e portanto, podemos obter os escores da matriz **Y** a partir dos escores da matriz **X** e vice-versa. Terminada a etapa de calibração pode-se fazer previsões para amostras desconhecidas. Para tanto basta obter os escores da matriz **X**, o qual pode ser transformado em concentração, através da equação 2.5.

2.3. Pré-processamento dos sinais analíticos

Outra etapa importante no desenvolvimento de um modelo de calibração é a etapa de pré-processamento. Muitas vezes os dados a serem modelados são expressos em grandezas diferentes, apresentam muitos ruídos, interferentes físicos que possam prejudicar o desempenho do modelo. Assim tratamentos são realizados nos dados antes do desenvolvimento do modelo de calibração.

2.3.1. Remoção do ruído experimental: o filtro de transformada de Fourier

A idéia básica deste tipo de filtro é aplicar-se a transformada de Fourier direta, dada pela Equação 2.6, para que se obtenha o sinal analítico representado no domínio das freqüências $F(\omega)$, ou melhor, aplicamos a transformada de Fourier direta para obter o espectro de freqüências $F(\omega)$, do sinal analítico[31].

$$F(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(\lambda) e^{i\lambda\omega} d\lambda \quad (2.6)$$

Na Equação 2.6, λ representa o domínio original do sinal analítico e $f(\lambda)$ o sinal analítico. Para espectros, λ representa os comprimentos de onda, para cromatogramas, ou fiagramas, λ representa a variável tempo e assim por diante.

Uma vez obtido o espectro de freqüências do sinal analítico, devemos cortar as freqüências altas, visto serem estas freqüências, na grande maioria dos casos, relacionadas ao ruído instrumental.

Finalmente aplicamos a transformada de Fourier inversa, dada pela Equação 2.7 e recuperamos o sinal analítico inicial, livre de ruído.

$$f(\lambda) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} F(\omega) e^{-i\lambda\omega} d\omega \quad (2.7)$$

A seqüência de operações utilizada no processo de remoção de ruído, através da transformada de Fourier, pode ser facilmente entendida se observarmos a Figura 2.1.

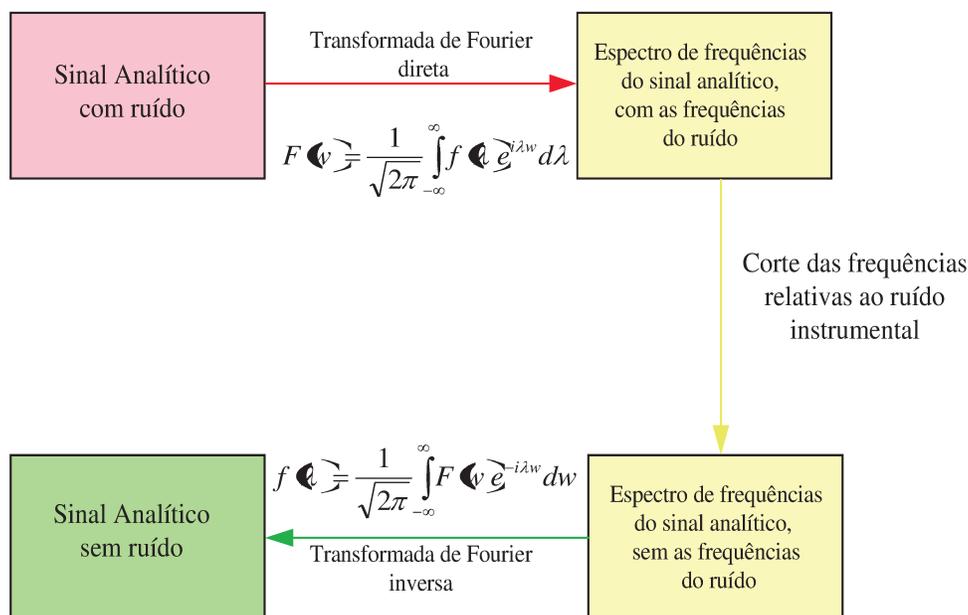


Figura 2.1. Representação esquemática da seqüência de operações utilizada na aplicação do filtro de transformada de Fourier.

2.3.2. Correção do espalhamento multiplicativo

O método de correção de espalhamento multiplicativo (MSC - do inglês, *Multiple Scattering Correction*) [32] é comumente aplicado em espectroscopia para a correção de linha base, proveniente principalmente da não homogeneidade da distribuição de partículas na matriz.

Este método assume que os comprimentos de onda da luz espalhada possuem uma dependência distinta entre a luz espalhada e a absorvida pelos constituintes da amostra. Portanto teoricamente, é possível separar estes dois sinais. Este método tenta remover o efeito do espalhamento pela linearização de cada espectro por um espectro ideal. Para efeito de cálculo, considera-se que o espectro ideal é o espectro médio do conjunto de dados para o qual deseja realizar a correção da linha base. Em seguida, utiliza-se uma regressão linear para calcular o coeficiente angular e linear do gráfico entre o espectro ideal e o espectro que vai ser corrigido. O espectro corrigido é calculado subtraindo cada

ponto do espectro pelo valor do coeficiente linear e dividindo este valor pelo coeficiente angular.

A técnica é muito simples e pode ser facilmente entendida se acompanharmos a seqüência de operações abaixo [33].

Matematicamente, e resumindo, a correção é feita da seguinte forma:

1. A partir do conjunto total de espectros, calcula-se o espectro médio \bar{x} ;
2. Faz-se a regressão linear para cada um dos k espectros (x_{ik}) do conjunto total de espectros, contra o espectro médio, sobre todos os i comprimentos de onda:

$$x_{ik} = u_k + v_k \bar{x}_i \quad (2.8)$$

3. Correção final:

$$x_{ik}^{\text{corrigido}} = \frac{x_{ik}^{\text{não corrigido}} - u_k}{v_k} \quad (2.9)$$

2.3.3. Transformação padrão normal de variação

Normalmente, os espectros Raman apresentam problemas de linha base, inclinações e algumas vezes curvaturas, devido principalmente ao espalhamento de luz. O espalhamento é fortemente dependente do comprimento de onda da luz, do tamanho das partículas, do índice de refração etc. Para minimizar este efeito, é necessário o uso de técnicas como a transformação padrão de variação (SNV – do inglês *Standard Normal Variate*) [34]. Esta técnica é aplicada para corrigir os efeitos do espalhamento multiplicativo e o tamanho da partícula, de maneira análoga à correção de espalhamento multiplicativo (MSC).

Apesar do MSC e SNV terem a mesma finalidade, ou seja, corrigir a linha base espectral, estas duas técnicas são bem diferentes. O SNV não necessita de um espectro ideal, ou seja, de um espectro médio para fazer a correção dos espectros. A correção é realizada pela normalização de cada espectro para o seu próprio desvio padrão, conforme ilustrado pelas equações 2.10 e 2.11a seguir:

Média do espectro
$$\bar{x}_i = \sum_{j=1}^p \frac{x_j}{p} \quad (2.10)$$

Espectro corrigido
$$X_{i \in VN} = \frac{(x_i - \bar{x}_i)}{\sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p (x_j - \bar{x}_i)^2}{p-1}}} \quad (2.11)$$

em que \mathbf{X} representa uma matriz com n espectros e p comprimentos de onda, \bar{x}_i é a média do vetor contendo o espectro i da matriz X .

2.3.4. Ortogonalização dos espectros: o método de Gram-Schmidt

Dados dois vetores linearmente independentes no espaço n -dimensional R^n pode-se obter um vetor ortogonal a qualquer um deles. Por exemplo, suponha que um espectro qualquer (obtido em qualquer região do espectro eletromagnético) seja um dos vetores, aqui chamado de \mathbf{u} , e o outro vetor o espectro dos interferentes, isto é, aquilo se deseja eliminar do espectro \mathbf{u} , por exemplo, espectro do solvente e cubeta, fluorescência da matriz, ruído do branco, ou seja, tudo que não for correlacionado a medida de interesse, aqui chamado de \mathbf{v} . Sabendo-se o que se deseja eliminar (\mathbf{v}) o próximo passo é projetar o espectro

u na direção do espectro v . Assim, dentro de certo limite numérico computacional, a contribuição de v em u , como representado na Figura 2.2 [35].

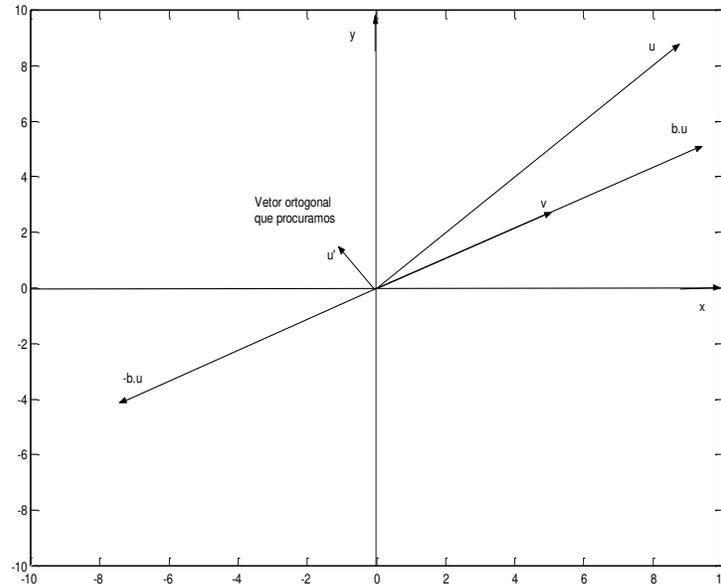


Figura 2.2. Ortogonalização de vetores para remoção da fluorescência usando o método de Gram-Schmidt.

Subtraindo o vetor u' (espectro u') do espectro u , tem-se o espectro u sem a contribuição do espectro v dos interferentes. Isto é o que é realizado pelo método de Gram-Schmidt.

2.3.5. Dados centrados na média

A centralização na média [36] consiste em fazer com que para cada variável seus valores tenham média zero. Para centrar os dados na média, obtêm-se para cada coluna o valor médio e, em seguida, subtrai-se este valor de cada variável dessa mesma coluna. Desta forma, ocorre a mudança do sistema de

coordenadas para o centro dos dados. A equação 2.12 é utilizada para centrar os dados na média.

$$x_{(j)cm} = x_{i,j} - \bar{x}_j \quad (2.12)$$

em que, $x_{(j)cm}$ corresponde ao valor centrado na média para a variável j na amostra i ; $x_{i,j}$ é o valor da variável j na amostra i e \bar{x}_j é a média das amostras na coluna calculada pela equação 2.13 .

$$\bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{i,j} \quad (2.13)$$

onde n representa o número de amostras.

2.3.6. Normalização dos espectros

A normalização [37] é usada principalmente para remover variação sistemática, geralmente associada com tamanho da amostra. Na normalização, dividem-se cada uma das variáveis de uma dada amostra i por um fator de normalização, ou seja, pela norma da amostra i , representada por $\|x_i\|$. O resultado é que todas as amostras estarão numa mesma escala.

$$x_{ij(norm)} = \frac{x_{ij}}{\|x_i\|} \quad , \quad j = 1, 2, \dots, J \quad (2.14)$$

As normais utilizadas são:

$$\|x_i\|_{\infty} = \max_{1 \leq j \leq J} |x_{ij}| \quad \text{norma sup, ou } l_{\infty}$$

$$\|x_i\|_1 = \sum_{j=1}^J |x_{ij}| \quad \text{norma } l_1$$

$$\|x_i\|_2 = \sqrt{\sum_{j=1}^J x_{ij}^2} \quad \text{norma Euclidiana ou norma } l_2$$

- Normalização pela norma sup: a resposta máxima de cada uma das amostras se torna igual a 1.
- Normalização pela norma l_1 : a área sob cada um dos espectros é unitária.
- Normalização pela norma l_2 : cada espectro terá comprimento igual a 1.

2.3.7. Compressão de dados: análise de componentes principais

Os instrumentos analíticos nos permitem medir simultaneamente, de modo rápido e eficiente uma enorme quantidade de dados de um sistema químico. Com o avanço e a chegada de computadores em laboratórios, e com o interfaceamento entre instrumentos e computadores, aliados a poderosas ferramentas matemáticas deram ao químico analítico uma grande habilidade em transformar dados em informações úteis, pois nem sempre o aumento no número de dados aumenta as informações sobre o sistema de interesse, uma vez que nem todos os dados possuem informações relevantes sobre o sistema.

Assim, é necessária a utilização de métodos matemáticos que nos permitem a compressão deste conjunto de dados obtidos do sistema em questão, em um conjunto de dados ainda muito menor, mas que possua as mesmas informações realmente úteis, para a análise e modelamento do sistema. Existe uma série de métodos destinados à compressão de dados, entretanto, o mais usado é o método fundamentado na análise dos componentes principais (PCA – do inglês, *Principal Component Analysis*) [38].

A idéia básica da análise de componentes principais é achar combinações lineares entre as variáveis independentes, de modo a reduzir a sua dimensão em um conjunto muito menor de dados, que ainda contenha as principais informações sobre o sistema em questão. Na análise de componentes principais, a matriz das variáveis independentes (os espectros) é decomposta em uma soma de matrizes

menores, que não podem mais ser reduzidas, mais uma matriz de erros, como se segue:

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1\mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2\mathbf{p}_2^T + \cdots + \mathbf{t}_k\mathbf{p}_k^T + \mathbf{E} \quad (2.15)$$

em que \mathbf{E} é uma matriz de erros \mathbf{t}_i e \mathbf{p}_i^T são os escores e loadings, respectivamente, da matriz das variáveis independentes [39].

Um conjunto de espectros pode ser matematicamente interpretado na forma de matrizes. Estes espectros, isto é, a matriz é chamada de espaço vetorial R^m . Para que esta matriz seja comprimida, devemos achar o subespaço vetorial R^n , em que $n < m$. Este subespaço, ou seja, esta nova base, onde a matriz será projetada são os autovetores ou componentes principais.

Para se obter os autovalores, devem-se achar primeiramente os autovetores da matriz, pois para cada autovalor obtido há um autovetor correspondente. O maior autovalor corresponde ao maior autovetor, o qual captura a maior parte da variância na matriz, o segundo maior autovalor, corresponde ao segundo maior autovetor, que captura o resíduo da variância a qual não faz parte da variância do primeiro autovetor. Esta variância capturada é acumulativa, no entanto vale lembrar que devemos pegar os autovetores responsáveis por 95% da variância na matriz dos espectros, sendo que devemos levar em consideração 5% para erros aleatórios [40].

Quando se projeta a matriz dos espectros nessa nova base, ou seja, nos autovetores, (esta projeção nada mais é que uma multiplicação) obtém-se a matriz reduzida chamada escores e os loadings que significam as regiões de maior importância (de maior peso) dos escores.

2.4. Validação: figuras de mérito

O bom desempenho de qualquer técnica analítica depende crucialmente de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecendo os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação [41].

A validação é um processo de averiguação da performance de um método, com o intuito de avaliar se este apresenta uma performance adequada para as condições nas quais será aplicado. O processo de validação deve ser realizado sempre que um procedimento analítico é proposto ou desenvolvido. A validação de um método estabelece, por estudos sistemáticos realizados em laboratório, que o método atende ao seu propósito e às normas impostas por órgãos de fiscalização nacionais e internacionais [42].

A validação pode ser atestada através da determinação de parâmetros conhecidos como figuras de mérito, que, dependendo de onde o método será aplicado, do seu propósito e ou do órgão de fiscalização a que estará sujeito, o número de figuras de mérito ou nível que deve ser atingido em cada uma delas, pode variar [43].

As figuras de mérito são, portanto, os indicadores quantitativos do escopo e do bom desempenho das técnicas, e são descritas na literatura especializada como [44]:

- Exatidão
- Precisão
- Sensibilidade
- Seletividade
- Linearidade
- Razão sinal/ruído
- Limite de detecção
- Limite de quantificação

- Robustez

A maneira pelas quais essas figuras de mérito devem ser determinadas é estabelecida pelos órgãos de fiscalização e encontra-se descrita em normas específicas, guias de validação e trabalhos científicos. Entretanto, a maioria dos guias, normas e trabalhos científicos, ainda são referentes à calibração univariada e são poucos os trabalhos científicos que realizam a determinação de figuras de mérito para validação de modelos de calibração multivariada [45].

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [46] e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO).

2.4.1. Exatidão

Este parâmetro se reflete à proximidade entre os valores de referência e os valores encontrados pelo modelo de calibração, e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida [47]. Em quimiometria este parâmetro é geralmente expressado como a raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão (RMSEP – do inglês *root mean square error of prediction*) [48] conforme é descrito na equação 2.16:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{(y_i - \bar{y}_i)^2}{N}} \quad (2.16)$$

em que N representa o número de amostras utilizadas na previsão, \bar{y}_i e y_i representam os valores de referência e os valores preditos pelo modelo de calibração.

2.4.2. Precisão

O termo precisão fornece a dispersão dos valores medidos em torno de um valor médio [49], e seu valor numérico é estimado pelo desvio padrão relativo, ou DPR, para análises de amostras contendo a mesma quantidade das espécies de interesse. O DPR é ainda conhecido como CV (coeficiente de variação), ou ainda pela sigla RSD proveniente do inglês *Relative Standard Deviation* e seu cálculo é realizado como descrito na equação 2.17, em que s é o desvio padrão descrito na equação 2.18 e \bar{x} é o valor médio do número total de medidas N descrito na equação 2.19:

$$RSD = \frac{100 \times s}{\bar{x}} \quad (2.17)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (2.18)$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad (2.19)$$

Em que x_i representa cada uma das medidas individuais.

2.4.3. Sensibilidade

Este parâmetro é a fração do sinal analítico que é devido ao aumento da concentração de um analito em particular em unidade de concentração. A sensibilidade é definida como o inverso da norma do vetor coeficientes de regressão (\mathbf{b}_k) do modelo de calibração [50].

$$SEN = \frac{1}{\|\mathbf{b}_k\|} \quad (2.20)$$

em que \mathbf{b}_k é o vetor dos coeficientes de regressão estimados pelo PLS.

Quando o NAS [51] é determinado, o vetor de sensibilidade líquida \mathbf{s}_k^{nas} para cada amostra do conjunto de calibração pode ser determinado a partir do vetor $\hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{nas}$ como:

$$\mathbf{s}_k^{nas} = \left\| \frac{\mathbf{x}_{A,k}^{nas}}{y} \right\| \quad (2.21)$$

Em que, o vetor de sensibilidades \mathbf{s}_k^{nas} deve ser igual para todas as amostras de calibração, $\hat{\mathbf{x}}_{A,k}^{nas}$ é o vetor de sinal analítico líquido para a espécie k, \mathbf{y} é o vetor que contém os valores de referência. O escalar $\hat{S\hat{E}N}$, pode ser determinado por:

$$\hat{S\hat{E}N} = \left\| \mathbf{s}_k^{nas} \right\| \quad (2.22)$$

2.4.4. Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica (γ) não é abordada em normas ou guias de validação. No entanto, esse parâmetro apresenta a sensibilidade do método em termos da unidade de concentração que é utilizada, sendo definida como a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do sinal de referência (δx) [52] :

$$\gamma = \frac{\hat{S\hat{E}N}}{\|\delta \mathbf{x}\|} \quad (2.23)$$

em que, $\hat{S\hat{E}N}$ é obtido através das equações (88) ou (90) e δx é o desvio padrão do sinal de referência estimado através do desvio padrão do valor de NAS para os espectros do sinal de referência.

O inverso desse parâmetro, ou seja, (δ^{-1}), permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras, que pode ser distinguida pelo método.

2.4.5. Linearidade

Em modelos de calibração multivariada uma medida quantitativa da linearidade não corresponde a uma tarefa simples, ou mesmo possível. Qualitativamente, gráficos de resíduos e dos escores contra a concentração, os quais devem ter comportamento aleatório e linear, respectivamente, podem indicar se os dados seguem ou não o comportamento linear [53].

2.4.6. Sinal analítico líquido

A validação de modelos de calibração multivariada pode ser feita com base no cálculo de parâmetros que assegurem que o modelo apresenta performance adequada e dentro dos objetivos desejados. Em calibração multivariada o conceito de Sinal Analítico Líquido [54] (NAS - do inglês *Net Analyte Signal*), exerce uma importante função na determinação de figuras de mérito. O método para o cálculo do NAS para modelos multivariados de calibração inversa foi proposto por Lorber [55].

O NAS é definido, para uma propriedade de interesse k , como sendo a parte do sinal analítico que é ortogonal às contribuições de possíveis interferentes presentes na amostra. Sua propriedade de ortogonalidade pode ser observada pela representação geométrica da Figura 2.3:

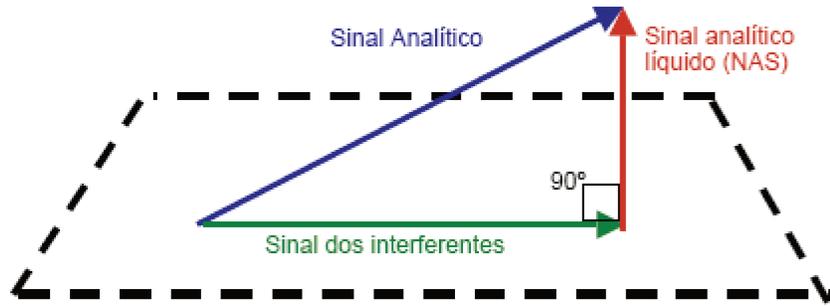


Figura 2.3. Representação geométrica da propriedade de ortogonalidade do NAS.

No cálculo do *NAS*, primeiramente a matriz \mathbf{X} é reconstruída com A variáveis latentes gerando a matriz $\hat{\mathbf{X}}_A$ (decomposta em escores e *loadings*), em seguida é determinada a matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}$, que é a matriz que contém a informação de todas as espécies presentes na amostra exceto da espécie de interesse k , descrito na equação 2.24:

$$\hat{\mathbf{X}}_{A,-k} = [\mathbf{I} - \hat{\mathbf{y}}_{A,k} \hat{\mathbf{y}}_{A,k}^+] \hat{\mathbf{X}}_A \quad (2.24)$$

em que $\hat{\mathbf{y}}_A$ é o vetor de concentrações da espécie de interesse k estimado com A variáveis latentes, $\hat{\mathbf{X}}_A$ é o vetor de respostas instrumentais de uma amostra estimado com A variáveis latentes e o índice “+” sobrescrito indica a pseudoinversa da matriz em questão. Isso faz com que a matriz $\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}$ fique livre de qualquer contribuição da espécie k . O vetor *NAS* é então obtido como:

$$\hat{\mathbf{X}}_{A,k}^{\text{nas}} = [\mathbf{I} - \hat{\mathbf{X}}_{A,-k}^T (\hat{\mathbf{X}}_{A,-k}^T)^+] \hat{\mathbf{X}}_A \quad (2.25)$$

Uma vez que $\hat{\mathbf{X}}_{A,k}^{\text{nas}}$ é livre de interferentes, é possível substituí-lo por uma representação escalar sem perda de informação. Assim temos:

$$\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}\mathbf{s} = \left\| \hat{\mathbf{X}}_{A,k}^{\text{nas}} \right\| \quad (2.26)$$

em que $\| \cdot \|$ representa a norma Euclidiana do vetor $\hat{\mathbf{X}}_{A,k}^{\text{nas}}$.

Com a possibilidade de calcular um valor escalar livre de interferentes, a partir de um vetor contendo contribuições de constituintes desconhecidos, torna-se possível a construção de uma nova forma de calibração multivariada, em que o modelo pode ser representado em uma forma univariada. Primeiro o cálculo do NAS é feito para as i amostras de calibração, em seguida o coeficiente de regressão é determinado por mínimos quadrados entre o vetor $\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}\mathbf{s}$ e o vetor de concentrações \mathbf{y} :

$$\hat{b}_{\text{nas}} = (\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}\mathbf{s}^T \mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}\mathbf{s})^{-1} \mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}\mathbf{s}^T \mathbf{y} \quad (2.27)$$

E o modelo de regressão pode, então, ser representado por:

$$\hat{\mathbf{y}} = \hat{b}_{\text{nas}} \mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}\mathbf{s} \quad (2.28)$$

Se os dados foram centrados na média, antes da determinação do coeficiente de regressão \hat{b}_{nas} , o vetor $\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}\mathbf{s}$ precisa ser corrigido de forma a evitar um erro de sinal que é introduzido pelo uso da norma Euclidiana. Esta correção pode ser feita pela multiplicação de cada elemento do vetor $\mathbf{n}\hat{\mathbf{a}}\mathbf{s}$ pelo seu sinal correspondente no vetor $(\mathbf{y} - \bar{\mathbf{y}})$, onde $\bar{\mathbf{y}}$ é a média do vetor \mathbf{y} que contém os valores de referência.

2.4.7. Razão sinal/ruído

Em calibração univariada, a razão sinal/ruído, $S/N_{k,i}$ [56], representa o quanto do sinal do analito é maior do que o ruído instrumental. No caso da

calibração multivariada, esta razão indica o quanto da intensidade do *NAS* da espécie de interesse está acima do desvio padrão do sinal de referência:

$$S/N_{k,i} = \frac{n\hat{s}_{k,i}}{\delta\mathbf{x}} \quad (2.29)$$

em que, $n\hat{s}_{k,i}$ é o valor escalar do sinal analítico líquido para a amostra *i* e $\delta\mathbf{x}$ é o desvio padrão do sinal de referência.

2.4.8. Robustez

Em processos industriais, ou mesmo em análises de bancada, existem diversas variáveis instrumentais ou ambientais, que não são possíveis de se controlar. Alguns exemplos são a umidade, temperatura, pequenas variações na quantidade dos componentes para a formação de um produto na indústria, entre outros. Para tanto, um método analítico robusto não deve ser sensível a esses tipos de variações, pois isto acarretaria na introdução de erros que podem ser significativos ao resultado. A robustez [57] em calibração multivariada, consiste em testar a performance do modelo de calibração multivariada frente a alguns tipos de variações e averiguar se estas são ou não significativas.

2.4.9. Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) [58] de um procedimento analítico expressam respectivamente, as menores quantidades da espécie de interesse que podem ser detectadas e determinadas quantitativamente. Para um conjunto de dados que apresenta comportamento homoscedástico (variância constante ao longo da faixa de trabalho, erros com previsão não correlacionados e que seguem uma distribuição normal), os LD e LQ na calibração multivariada podem ser calculados por:

$$LD = 3\delta\mathbf{x}\|\mathbf{b}_k\| = 3\delta\mathbf{x}\frac{1}{\hat{S}\hat{E}N} \quad (2.30)$$

$$LQ = 10\delta\mathbf{x}\|\mathbf{b}_k\| = 10\delta\mathbf{x}\frac{1}{\hat{S}\hat{E}N} \quad (2.31)$$

em que, $\delta\mathbf{x}$ é o desvio padrão do sinal de referência, \mathbf{b}_k é o vetor dos coeficientes de regressão do modelo PLS para a espécie k, $\hat{S}\hat{E}N$ corresponde ao valor de sensibilidade obtido através das equações 2.20 ou 2.22.

2.4.10. Seletividade

Seletividade [59] é a medida do grau de sobreposição entre o sinal da espécie de interesse e os interferentes presentes na amostra e indica a parte do sinal que é perdida por essa sobreposição. Para modelos de calibração multivariada esse parâmetro é definido como:

$$SEL = \frac{n\hat{s}_i}{\|\mathbf{x}_i\|} \quad (2.32)$$

Em que $n\hat{s}_i$ é o escalar NAS estimado para amostra 'i' e \mathbf{x}_i o vetor de dados originais. O valor de seletividade estimado a partir da expressão 2.32 informa quanto do sinal original é usado na calibração por não ser ortogonal à propriedade de interesse. Dessa forma, a seletividade calculada a partir dessa equação não se refere ao sentido geralmente empregado para o termo em química analítica, com modelos univariados, e sim a uma forma de estimar quanto do sinal é perdido por ortogonalidade.

CAPÍTULO 3

OBTENÇÃO DO EFEITO SERS

Nesta tese, o efeito SERS foi obtido pela deposição do analito em ouro coloidal. Apesar da literatura reportar a possibilidade da utilização de prata, ou mesmo cobre, não foi possível obter resultados quantitativos em colóides desses metais. Também foi avaliada a possibilidade de obter o efeito em sol-gel de ouro, mas também não foi observada amplificação significativa do sinal Raman neste caso. A seguir serão apresentados o procedimento experimental e a caracterização da suspensão de nanopartículas de ouro e espectros do efeito SERS.

3.1. Instrumentação

Os espectros Raman foram obtidos num espectrômetro Raman de baixa resolução (Raman System, Inc) com LASER diodo, laser operando no infravermelho próximo (785 nm) e detector do tipo CCD de 2048 elementos e interface gráfica desenvolvida em ambiente MATLAB™. Espectros de deslocamento Raman foram obtidos na faixa de 700 a 2.000 cm^{-1} , com tempo de integração de 60 segundos.

3.2. Preparação da suspensão de nanopartículas de ouro

Para preparação dos substratos ativos, foram usados os seguintes reagentes: Ácido Tetracloroaurico (Sigma-Aldrich, Co.), Citrato de Sódio (Merck, Co.) água deionizada Milli-Q, Cloreto de Sódio (Merck, Co.).

A suspensão de nanopartículas de ouro foi preparada de acordo com a metodologia proposta por Lee-Meisel [60].

Foram adicionados 20 mL de uma solução de ácido tetracloroaurico 1 mmol/L em um erlenmeyer de 50 mL, envolto por papel alumínio. Esta solução foi aquecida até ebulição, onde em seguida, sob agitação vigorosa, foram adicionados 2 mL de uma solução de citrato de sódio a 1%. O ouro (Au^{3+}) gradualmente se reduz a (Au^0) na presença do citrato de sódio. Neste ponto pode-

se perceber a formação de nanopartículas comprovada pela cor vermelha bem intensa da suspensão. Após mudança de cor da suspensão, o aquecimento e agitação foram paralisados.

Após o resfriamento da suspensão de nanopartículas de ouro, foram adicionadas à solução 5 mL de cloreto de sódio 0,1 mol/L, cujo papel foi aglutinar as partículas de ouro para potencializar ainda mais a intensificação do sinal Raman.

3.3. Caracterização da suspensão de nanopartículas de ouro

A suspensão de nanopartículas de ouro, preparada conforme relatada na parte experimental foi caracterizada pela espectrofotometria eletrônica de absorção no ultravioleta-visível e também pela microscopia eletrônica de varredura. Alguns testes foram realizados para escolher a melhor solução coloidal a ser utilizada nos experimentos. Dentre eles, foram-se adicionando 1 mL de cloreto de sódio 0,1 mol/L e obtendo-se os espectros UV/vis. para se ter uma idéia do tamanho e distribuição das nanopartículas de ouro. Sabe-se que quanto mais o *plasmon* de absorção das partículas de ouro é deslocado para a região do vermelho, maiores são as partículas [61]. O objetivo, no entanto, é aumentar os tamanhos das nanopartículas, com a adição da solução de cloreto de sódio, fazendo com que seus *plasmons* de absorção se desloquem para a região do vermelho para que possam entrar em ressonância com a frequência do laser do espectrômetro Raman e com isso intensificar o espalhamento Raman.

Na figura 3.1 é apresentado o espectro de absorção no UV-Vis da solução de ouro coloidal. Nota-se que a absorção do *plasmon* superficial dá origem a uma banda larga, com o máximo de absorção em torno de 527 nm. No caso deste substrato SERS ativo, teríamos intensificação do campo elétrico para radiações de comprimento de onda dentro da banda de absorção do *plasmon* (~370 e 600 nm).

O máximo de absorção no espectro UV-VIS de soluções coloidais está relacionado ao tamanho médio das partículas, enquanto que a largura da banda de absorção relaciona-se à dispersão das partículas [62].

O laser do espectrômetro Raman, utilizado para obtenção das medidas, possui comprimento de onda de 785 nm e para que o efeito SERS tenha um máximo de intensificação, solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L foi adicionada à suspensão com a finalidade de aumentar o tamanho das nanopartículas.

À medida que estas nanopartículas aumentam de tamanho, a banda de seus *plasmons* de absorção desloca-se para a região do infravermelho próximo, fazendo com que o campo elétrico das nanopartículas entre em ressonância com o campo elétrico do laser incidente aumentando significativamente o espalhamento Raman.

Nota-se, na figura 3.2, um deslocamento no *plasmon* de absorção para 700 nm após adição de 1 mL de solução de cloreto de sódio. As figuras 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 apresentam os respectivos deslocamentos de 725, 735, 740 e 745 nm.

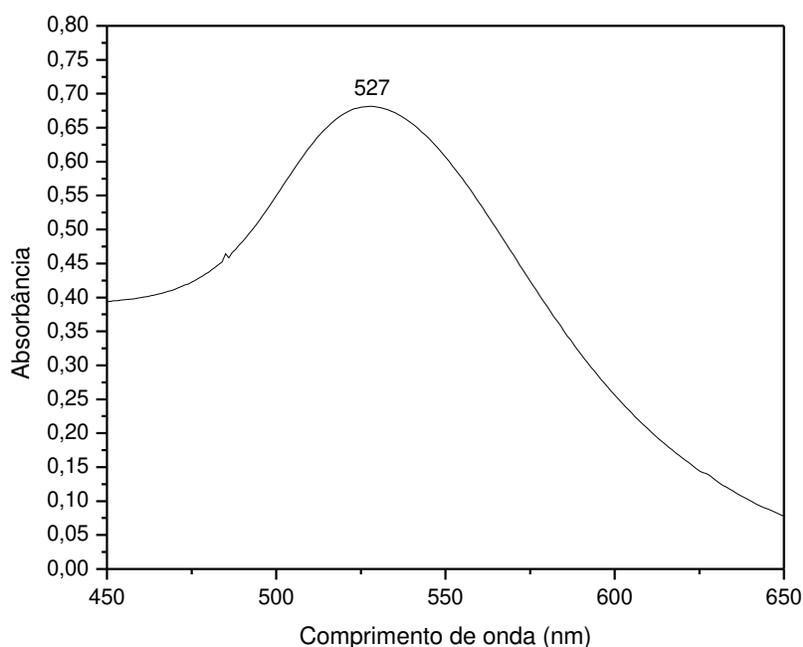


Figura 3.1. Espectro de absorção no ultravioleta-visível da suspensão de nanopartículas de ouro.

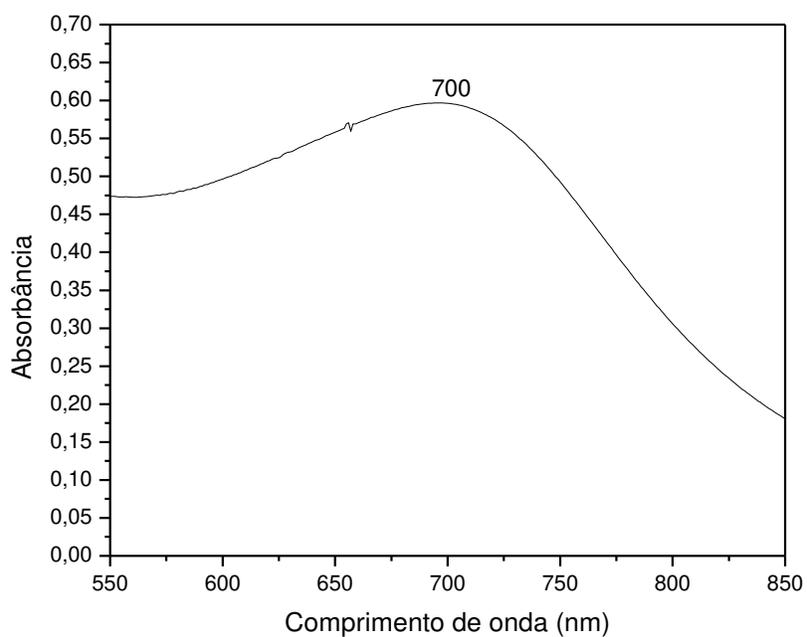


Figura 3.2. Espectro de absorção no ultravioleta-visível da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 1 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L.

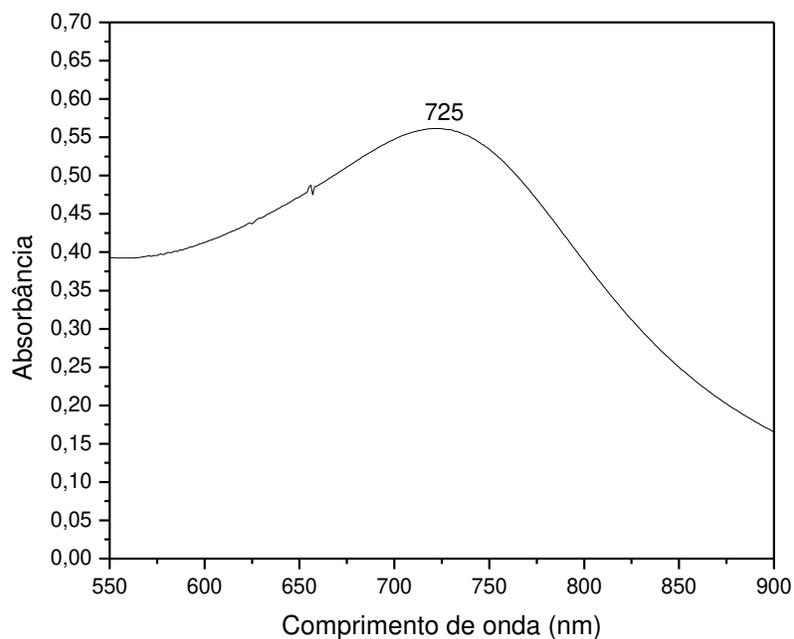


Figura 3.3. Espectro de absorção da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 2 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L.

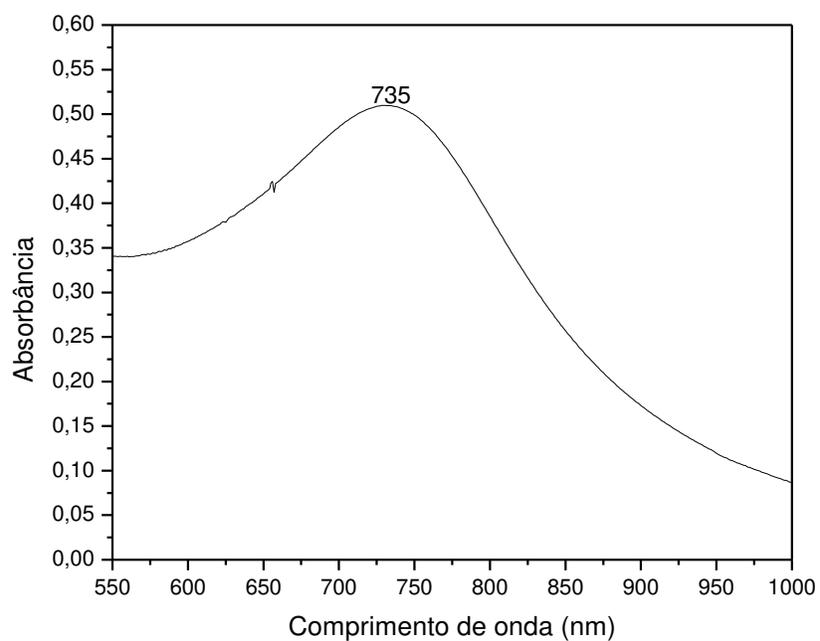


Figura 3.4. Espectro de absorção da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 3 mL solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L.

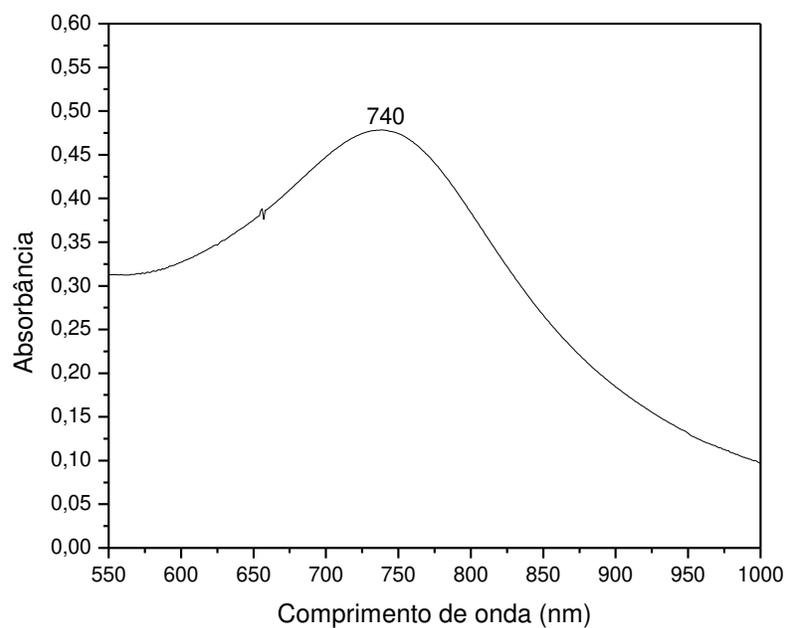


Figura 3.5. Espectro de absorção da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 4 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L.

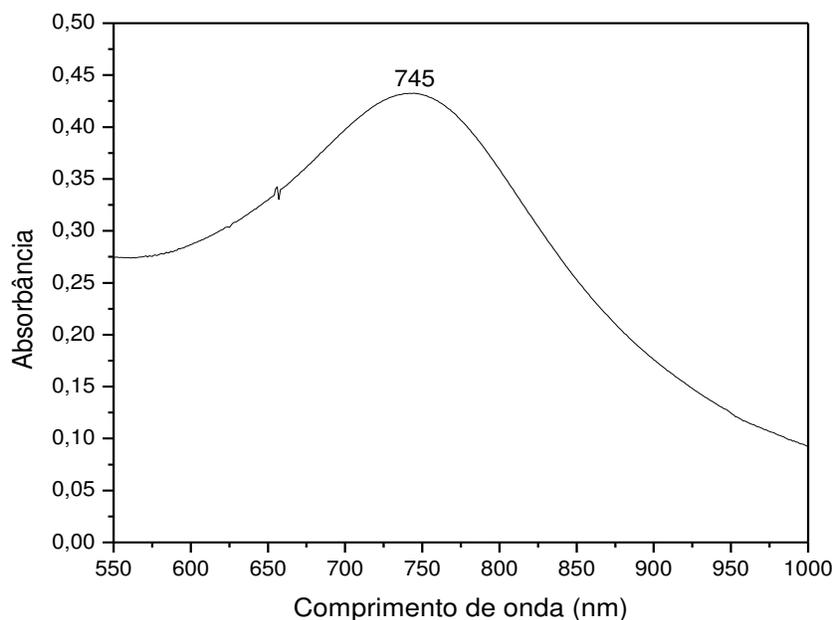


Figura 3.6. Espectro de absorção da suspensão de nanopartículas de ouro contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L.

Pode-se observar, pelos espectros apresentados, que a suspensão de nanopartículas de ouro que propiciará as melhores medidas será a solução contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L.

Também foram obtidas micrografias eletrônicas de varredura da referida suspensão, a fim de caracterizar o tamanho e homogeneidade das partículas de ouro da solução coloidal. Foi utilizado um Microscópio Eletrônico de Varredura - MEV Jeol JMS 6360-Lv com microssonda de Raios-X.

A figura 3.7 mostra uma micrografia eletrônica de varredura onde as partículas brilhantes correspondem ao ouro metálico. Aumentando a resolução da imagem (MEV), proveniente da figura 3.7, observamos na figura 3.8 a distribuição das partículas de ouro com formato esférico uniforme, com tamanho médio de 400 nm.

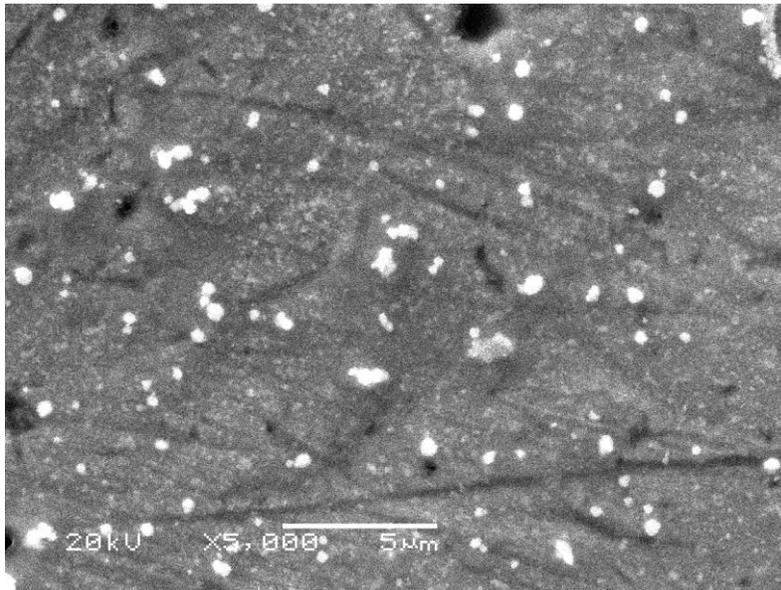


Figura 3.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da solução de ouro coloidal contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L.

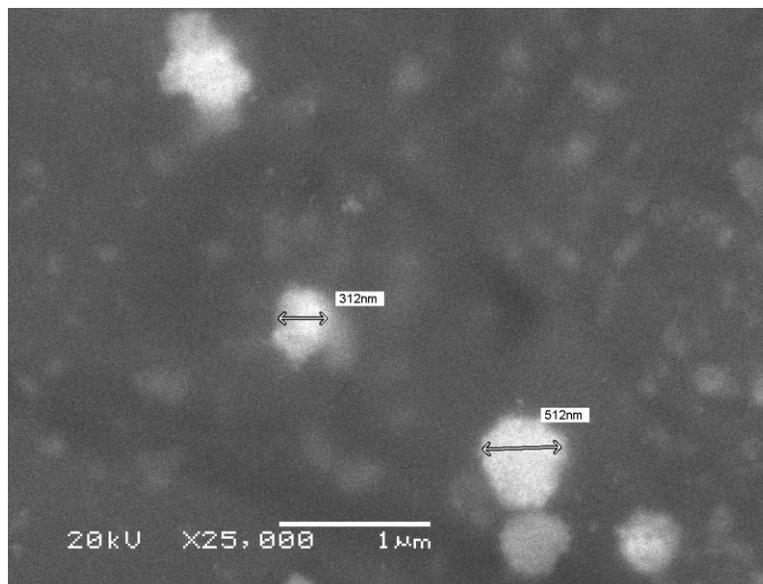


Figura 3.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da solução de ouro coloidal contendo 5 mL de solução de cloreto de sódio 0,1 mol/L/L.

Para verificar o efeito SERS, primeiramente foram obtidos espectros Raman de soluções de violeta genciana nas concentrações 1×10^{-3} , 1×10^{-4} e 1×10^{-5} mol/L. Para isso, foram adicionados em uma cubeta de quartzo, 1 mL da suspensão de nanopartículas de ouro e 1 mL das soluções de violeta genciana nas concentrações descritas acima e obtidos os espectros. Para comparação foram obtidos os espectros Raman sem o efeito SERS.

A figura 3.9 mostra os espectros Raman das soluções de violeta genciana, onde se pode observar que não há uma distinção entre os espectros, apresentando apenas ruído. Na figura 3.10 são apresentados os espectros de duas soluções de violeta genciana, onde após processamento para eliminação da fluorescência e normalização dos espectros, nota-se claramente o efeito SERS com grande amplificação do espalhamento Raman.

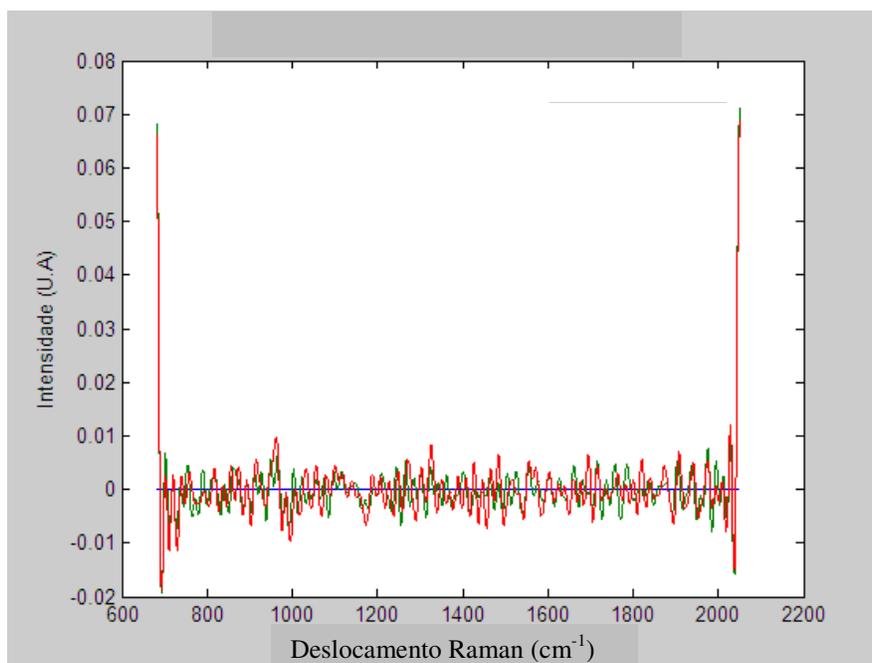


Figura 3.9. Espectros Raman de violeta genciana.

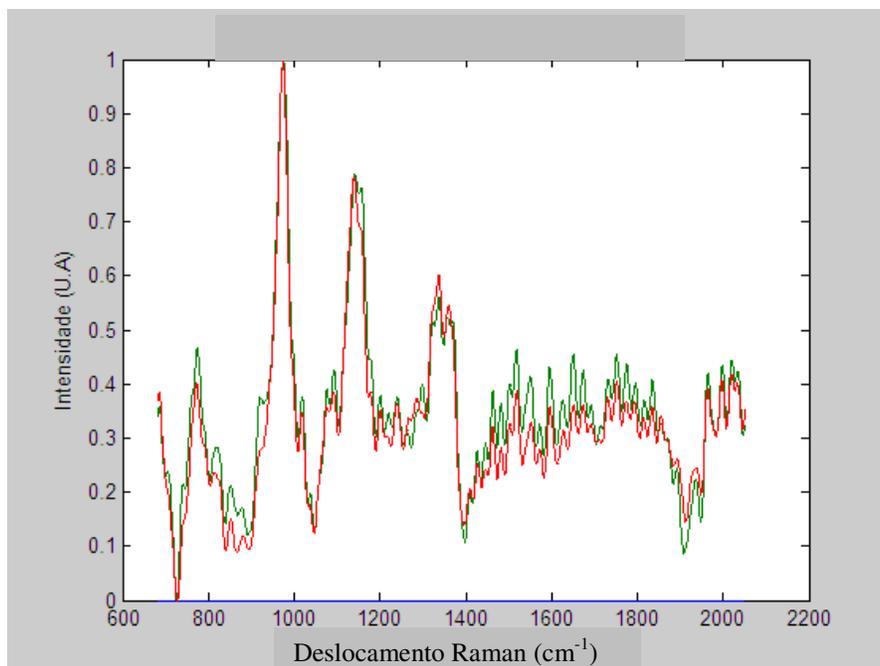


Figura 3.10. Espectros Raman de violeta genciana na presença de ouro coloidal.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUA UTILIZANDO O EFEITO SERS

4.1. Introdução

Pesticida é um termo usado para uma substância ou misturas de substâncias, sintéticas ou naturais, que servem para controlar a proliferação de insetos, fungos, bactérias, ervas daninhas, roedores e outras pestes [63].

Com a crescente necessidade de fornecer alimentos à população torna-se indispensável o controle das doenças, pragas e plantas invasoras, com a utilização de pesticidas que se destaca entre as principais formas de controle, visando assegurar maior produtividade. Os primeiros grupos utilizados como pesticidas, foram substâncias tóxicas de origem natural, tais como o piretro e a nicotina, alguns elementos inorgânicos como o mercúrio e enxofre, além da cal e alguns sais de arsênio [63].

Após a segunda guerra mundial, o número de substâncias novas e o uso extensivo dessas na agricultura aumentaram enormemente. O BHC e o DDT surgiram como uns dos mais importantes produtos químicos, sendo usados em larga escala nas lavouras para combater insetos. Com o aumento do plantio de monoculturas, ocorreu o aparecimento de várias pragas, as quais são combatidas pelo uso de pesticidas. Como resultado, diversos problemas ambientais surgem a cada momento, muitos deles praticamente irreversíveis e de extrema relevância. Como exemplo, pode-se citar as conseqüências ambientais da expansão do uso de produtos químicos orgânicos sintéticos, com ênfase naquelas substâncias cuja toxicidade chega a afetar a saúde humana, especialmente no que diz respeito ao câncer e aos defeitos congênitos, assim como o bem-estar de organismos inferiores [64].

O impacto das atividades agrícolas modernas sobre a qualidade da água subterrânea tornou-se conhecido na década de 70. Em particular, demonstrou-se a existência de altas taxas de lixiviação de nitratos e outros íons móveis em muitos solos submetidos ao plantio contínuo. Com a contaminação das águas por pesticidas, e com o crescimento geométrico da população, o suprimento de água potável e de boa qualidade nas áreas mais desenvolvidas torna-se cada vez mais difícil e de maior custo. A água potável e a não contaminação dos alimentos só

pode ser assegurada através de programas de monitoramento ambiental, que poderão minimizar o risco de poluição [65].

Estudos desenvolvidos em várias regiões do mundo têm mostrado que a porcentagem dos produtos utilizados na agricultura que atingem os ambientes aquáticos é geralmente baixa. Entretanto, como foi citado no parágrafo anterior, os pesticidas com grande mobilidade no meio ambiente têm sido detectados, não só em águas subterrâneas, mas também em águas superficiais. A concentração da maioria dos pesticidas em água é baixa em parte devido ao fato de serem geralmente pouco solúveis em água e em parte devido ao fato da sua diluição. Isto, no entanto, não exclui a possibilidade de que concentrações muito altas venham a ocorrer através da erosão dos solos, pelo descarte, lavagem de tanques e embalagens, ou mesmo depois de chuvas torrenciais, especialmente quando as áreas ao redor de um pequeno córrego tenham sido recentemente tratadas com altas doses de pesticidas. Todavia, mesmo em concentrações baixas, os pesticidas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos que podem concentrar estes produtos por até 1000 vezes. Devemos ressaltar que a preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta, principalmente, quando a água é usada para o consumo humano.

Em conseqüência de sua toxicidade, a Agência de Proteção Ambiental (EPA – do inglês, *Environmental Protection Agency*) dos Estados Unidos e a União Européia (EU – do inglês, *European Union*) incluíram os pesticidas em suas listas de prioridades. A União Européia estabeleceu em sua diretriz a Concentração Máxima Admissível (CMA) de um pesticida individual na água potável é de 0,1 µg/L, sem, no entanto, ultrapassar 0,5 µg/L quando se considera a soma total de todos os pesticidas. Limites semelhantes são adotados por outros países, como Estados Unidos e Canadá [66].

4.1.1. Classificação dos pesticidas quanto à toxicidade

Os pesticidas estão divididos em quatro classes toxicológicas para o ser humano, conforme apresentado na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Classificação toxicológica de Pesticidas

Classe I	Rótulo Vermelho	Extremamente Tóxico
Classe II	Rótulo Amarelo	Altamente Tóxico
Classe III	Rótulo Azul	Mediamente Tóxico
Classe IV	Rótulo Verde	Pouco Tóxico

Devido à grande diversidade de produtos existentes (somente no Brasil são cerca de 300 princípios ativos em 2 mil formulações comerciais diferentes), os pesticidas podem ser classificados de acordo com sua função, como por exemplo, inseticidas, herbicidas, fungicidas, algicidas, dentre outros, e também com de acordo com seu poder tóxico. Esta segunda classificação é fundamental para o conhecimento da toxicidade aguda de um determinado pesticida.

Os pesticidas podem ser classificados quanto à afinidade (aficida, ovicida, larvicida, raticida, formicida, acaricida, inseticida entre outros) e quanto ao modo de ação (ingestão, contato, microbiano e fumegante) sendo possível o enquadramento em mais de uma classe. Quanto à origem, a divisão envolve os compostos inorgânicos (compostos de mercúrio, bário, enxofre e cobre), os pesticidas de origem vegetal, bacteriana e fúngica (piretrinos, antibióticos e fitocidas), e os pesticidas orgânicos.

Os pesticidas orgânicos, que apresentam átomos de carbono em sua estrutura, constituem o maior grupo de produtos com alta atividade fisiológica. As principais classes desses compostos são os organoclorados (OCs), organofosforados (OPs) e Carbamatos [64].

Vamos nos ater neste trabalho em dois pesticidas dos mais comercializados no Brasil. O endossulfan que compõem a classe dos organoclorados e o metamidofós que compõem a classe dos organofosforados.

4.2. Pesticida Metamidofós

O pesticida de ingrediente ativo ou nome comum metamidofós, com nome químico 0,S-dimetil fosforamidotioato de fórmula molecular $C_2H_8NO_2PS$ e fórmula estrutural apresentada na figura 4.1 é comercializado no Brasil há vários anos segundo alguns diferentes nomes comerciais, entre eles: Tameron BR (Bayer), Hamidop 600 (Arysta), Metamidofos Fersol 600 (Fersol), Metafos (Milenia), Metasip (Sipcam Agro), Dinafos (Cheminova) [67].

É um pesticida acaricida organofosforado sistêmico, formulado como concentrado solúvel ou solução aquosa não concentrada, que contém 600 g do ingrediente ativo metamidofós por litro do produto comercial. Está autorizado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), do Ministério da Saúde apenas para uso em pulverização foliar nas culturas de algodão, amendoim, batata, feijão, soja, tomate e trigo, via trator, pivô central ou aplicação aérea, evitando-se, assim, maior contato de aplicadores em exposição ocupacional. Na cultura do tomate, seu uso está autorizado somente para tomate rasteiro, com fins industriais (massa de tomate, etc.), sendo seu uso proibido para tomate de mesa [67].

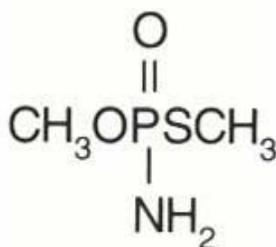


Figura 4.1. Fórmula estrutural do pesticida metamidofós

As formulações de metamidofós foram todas enquadradas pela ANVISA nas Classes toxicológicas I ou II. Do ponto de vista de sua ação tóxica, como qualquer outro organofosforado, também o metamidofós é um éster inibidor da enzima acetilcolinesterase (uma enzima vital para o funcionamento do sistema

nervoso), sendo este seu modo de ação, tanto nos insetos pragas, objetos do controle, bem como, assim, também nos demais animais (mamíferos inclusive).

Desse modo, em humanos, quando a exposição é demasiadamente elevada (aplicadores mal protegidos, sem o uso de equipamentos de proteção individual, aplicações sem observação de critérios técnicos) pode causar neuropatias, causando síndrome colinérgica, que se reflete em acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas terminações nervosas (salivação, sudorese, lacrimejamento, paralisia muscular, dificuldades respiratórias, asfixia, etc., e, eventualmente óbito). Do ponto de vista de riscos ao meio ambiente, por ser um éster solúvel em água e razoavelmente polar, o metamidofós é degradado com certa facilidade e rapidez, especialmente através da hidrólise da ligação éster. Assim, seu uso pode e deve causar ao meio ambiente apenas um efeito adverso localizado, se usado de modo correto e adequado.

4.3. Pesticida Endosulfan

Este pesticida consiste na mistura de dois estereoisômeros como ingredientes ativos, sendo 70% α -endosulfan e 30% de β -endosulfan de nomenclatura química 6,7,8,9,10,10 - hexacloro-1,5, 5a, 6, 9, 9a- hexahidro- 6, 9, metano-2,4,3-benzodioxatiepín-3-óxido de fórmula molecular $C_9H_6Cl_6O_3S$ e fórmula molecular apresentada na figura 4.2. Ele é um inseticida largamente empregado na cultura de soja, devido à sua ação eficaz no combate às pragas, não havendo produto substituto de igual eficiência [68].

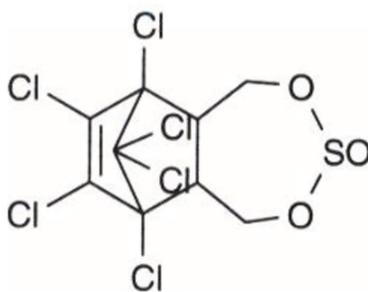


Figura 4.2. Fórmula estrutural do endosulfan

Foi introduzido no mercado em 1957 com o nome comercial Thiodan e possui registro para a aplicação em soja por meio da Portaria nº 95/85 do Ministério da Agricultura, tendo como Limite Máximo de Resíduos (LMRs) de Pesticida de 1,0 mg/kg para esta cultura [68].

4.4. Métodos convencionais de análise

Em geral, os métodos usados na análise de pesticidas em águas, exigem que se efetue previamente a extração e pré-concentração destes compostos para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*). Os métodos oficiais utilizam técnicas analíticas de extração líquido-líquido (LLE – do inglês *Liquid-Liquid Extaction*) e extração por fase sólida (SPE – do inglês, *Solid Phase Extraction*). A LLE envolve grandes quantidades de solventes caros e tóxicos, e elevados tempos de análise; já a SPE, embora apresente uma série de vantagens em relação à LLE, tem como desvantagens entupimento da coluna de separação, falta de reprodutibilidade e a não reutilização dos cartuchos [69-71].

Por este motivo, há a necessidade de se desenvolver novos métodos analíticos que permitam rápidas determinações *in situ* de pesticidas, para monitoramento contínuo de ambientes aquáticos extensos, onde se faz o uso rotineiro destes pesticidas.

4.5. Atribuições das bandas vibracionais do espectro Raman do pesticida Metamidofós

A figura 4.3 mostra o espectro Raman do pesticida metamidofós puro obtido através de um espectrômetro Raman de baixa resolução (Raman System, Inc) com LASER diodo, laser operando no infravermelho próximo (785 nm) e detector do tipo CCD de 2048 elementos.

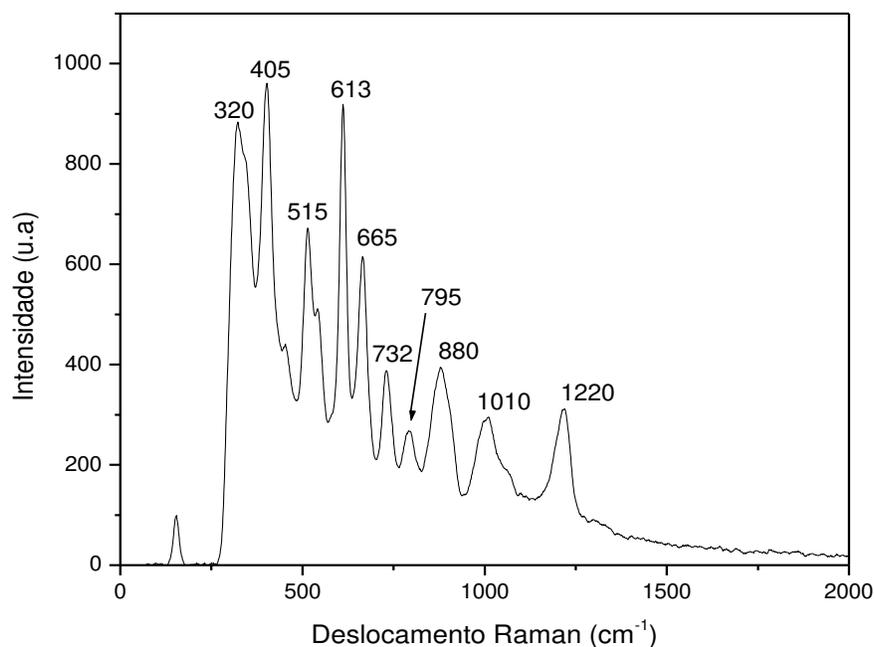


Figura 4.3. Espectro Raman do pesticida metamidofós puro.

Os 45 modos vibracionais possíveis do metamidofós foram calculados teoricamente, cuja geometria otimizada encontra-se apresentada na Figura 4.4, através do programa GAMESS (do inglês - *General Atomic and Molecular Electronic Structure System*) versão 22 de fevereiro de 2006 (R5), com cálculo DST (do inglês - *Density Functional Theory*), com funcional B3LYP e base de *Dunning cc-pVDZ* [72,73].

Pode-se observar através da tabela 4.2, que mostra as frequências teóricas e experimentais, que a diferença é bastante pequena entre eles, indicando que o espectro Raman obtido é realmente da espécie a ser analisada. Assim, com base nos modos vibracionais teóricos foi realizada a atribuição das bandas espectrais Raman.

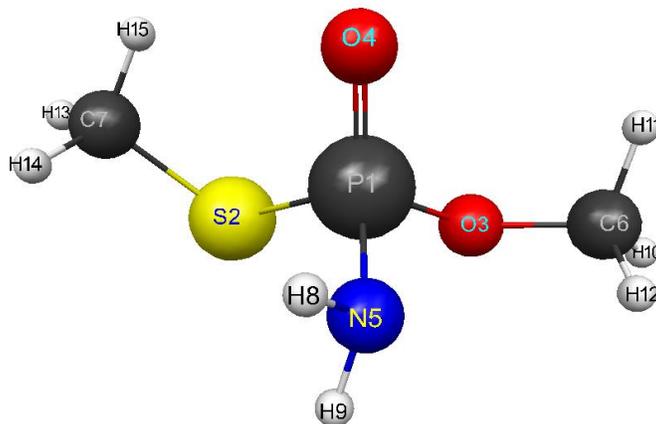


Figura 4.4. Estrutura molecular do pesticida metamidofós.

Tabela 4.2. Atribuição das bandas Raman para o pesticida metamidofós.

Frequência Teórica (cm ⁻¹)	Frequência experimental (cm ⁻¹)	Atribuição
315	320	Deformação P-O
408	405	Estiramento P-S
523	515	Estiramento P-S
601	613	Estiramento P-S
687	665	Deformação axial C-S
742	732	Estiramento P-O
780	795	Estiramento P-O
865	880	Deformação P-N
998	1010	Deformação P-O-C
1194	1220	Estiramento P=O

4.6. Atribuições das bandas do espectro Raman do pesticida Endosulfan

A figura 4.5 mostra o espectro Raman do pesticida endosulfan puro obtido através de um espectrômetro Raman de baixa resolução (Raman System, Inc) com LASER diodo, laser operando no infravermelho próximo (785 nm) e detector do tipo CCD de 2048 elementos.

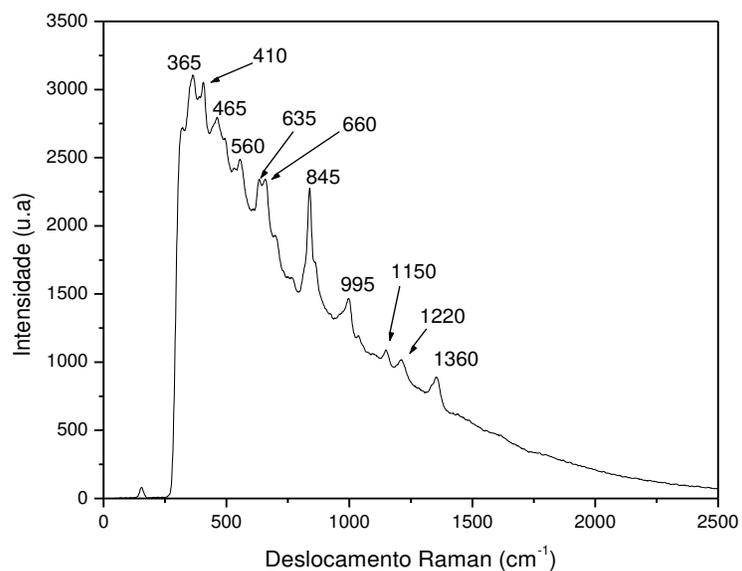


Figura 4.5. Espectro Raman do pesticida puro endosulfan

A tabela 4.3 apresenta os valores calculados, os experimentais e as atribuições das bandas do espectro Raman. Podemos observar que a diferença entre os valores teóricos e espectrais é muito pequena, mostrando assim grande concordância entre as frequências experimentais e calculadas teoricamente. Devido a essa mínima diferença os modos vibracionais teóricos foram utilizados para atribuição das bandas espectrais Raman do endosulfan.

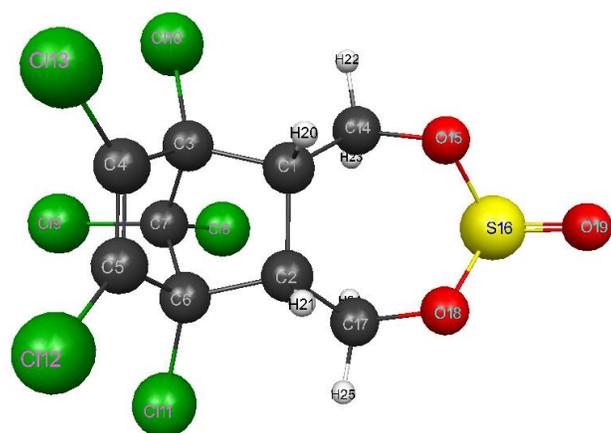


Figura 4.6. Estrutura molecular do pesticida endosulfan

Tabela 4.3. Atribuição das bandas Raman para o pesticida endosulfan.

Frequência Teórica (cm⁻¹)	Frequência experimental (cm⁻¹)	Atribuição
371	365	Estiramento C-Cl
418	410	Estiramento C-Cl
440	465	Deformações no esqueleto
555	560	Deformações no esqueleto
640	635	Deformações no esqueleto
656	660	Deformações no esqueleto
857	845	Estiramento C-H
992	995	Estiramento C-H
1148	1150	Estiramento SO ₃
1226	1220	Estiramento S=O
1370	1360	Deformação CH

4.7. Obtenção dos espectros SERS dos pesticidas em solução aquosa

Após etapa de otimização do SERS, passou-se então a utilizar este substrato para se obter espectros SERS de pesticidas metamidofós, endosulfan e também de suas misturas em água.

Os espectros Raman foram obtidos num espectrômetro Raman de baixa resolução (Raman System, Inc) com LASER diodo, laser operando no infravermelho próximo (785 nm) e detector do tipo CCD de 2048 elementos e interface gráfica desenvolvida em ambiente MATLAB™ [74]. Espectros de deslocamento Raman foram obtidos na faixa de 700 a 2.000 cm^{-1} , com tempo de integração de 60 segundos.

Os espectros SERS foram obtidos utilizando cubeta de quartzo, usando soluções aquosas padrão de pesticida metamidofós em concentrações variando de 10 $\mu\text{g/L}$ a 59,5 $\mu\text{g/L}$. No total foram preparadas 100 soluções do pesticida na faixa de concentração descrita.

Foram adicionados em cubeta, 1,0 mL de solução coloidal de ouro, 0,2 mL das soluções padrão nas concentrações descritas acima e obtidos os espectros SERS.

Os espectros SERS de endosulfan foram obtidos seguindo os mesmos passos de obtenção dos espectros SERS de metamidofós.

Os espectros SERS das misturas de endosulfan e metamidofós foram obtidos vertendo em cubeta de quartzo já contendo 1,0 mL de solução coloidal de ouro, 0,2 mL das soluções padrão das misturas. Estas misturas foram preparadas em proporções diversas de concentrações de cada pesticida totalizando 49 soluções aquosas padrão cujas concentrações estão indicadas na tabela 4.4.

Tabela 4.4. Soluções preparadas das diferentes concentrações das misturas de pesticidas.

Solução (Nº)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Endosulfan (µg/L)	25	25	25	25	25	25	25	30	30	30	30	30	30	30
Metamidofós (µg/L)	25	30	35	40	45	50	55	25	30	35	40	45	50	55
Solução (Nº)	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Endosulfan (µg/L)	35	35	35	35	35	35	35	40	40	40	40	40	40	40
Metamidofós (µg/L)	25	30	35	40	45	50	55	25	30	35	40	45	50	55
Solução (Nº)	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Endosulfan (µg/L)	45	45	45	45	45	45	45	50	50	50	50	50	50	50
Metamidofós (µg/L)	25	30	35	40	45	50	55	25	30	35	40	45	50	55
Solução (Nº)	43	44	45	46	47	48	49							
Endosulfan (µg/L)	55	55	55	55	55	55	55							
Metamidofós (µg/L)	25	30	35	40	45	50	55							

4.8. Modelos de calibração multivariada para o pesticida Metamidofós

A figura 4.7 mostra os espectros SERS do pesticida metamidofós nas concentrações variando de 10 a 59,5 µg/L, utilizando o espectrômetro Raman de baixa resolução (Raman System, Inc) com LASER diodo, laser operando no infravermelho próximo (785 nm) e detector do tipo CCD de 2048 elementos.

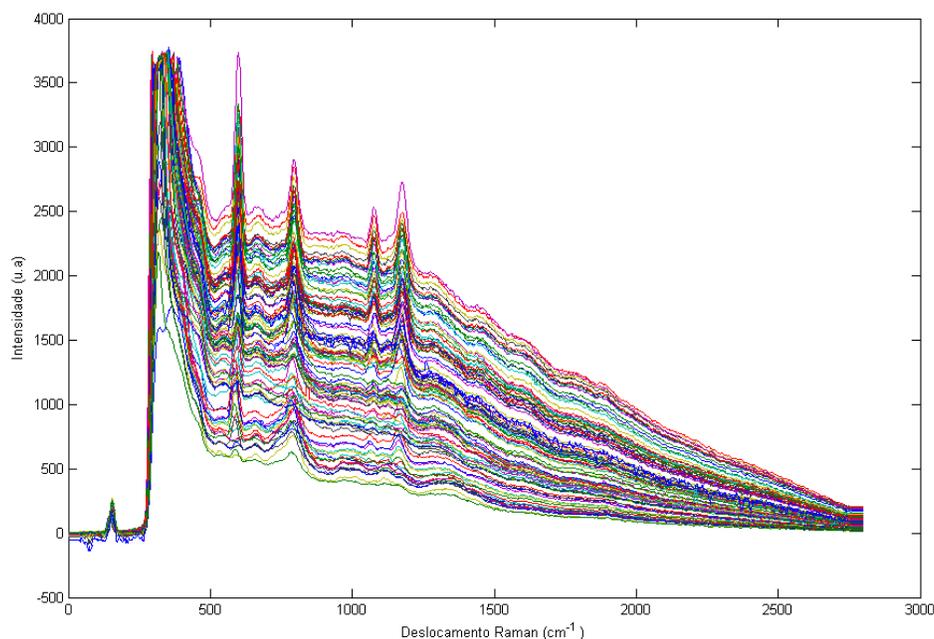


Figura 4.7. Espectros Raman SERS do metamidofós não pré-processados

Os espectros SERS de metamidofós, não pré-processados referentes à figura 4.7, foram obtidos com a finalidade de construir o modelo de calibração multivariada para determinação quantitativa do pesticida metamidofós, usando técnicas quimiométricas de calibração multivariada baseadas no método dos mínimos quadrados parciais (PLS). O modelo, *a priori*, foi construído com os dados não pré-processados para posterior comparação com modelos cujos dados foram pré-processados. Foram utilizados os seguintes pré-processamentos para avaliar, através do RMSEC (raiz quadrada do erro quadrático médio de calibração) e RMSEP (raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão) o desempenho dos seguintes pré-processamentos: transformada de Fourier (FT – do inglês, *Fourier Transformation*), correção multiplicativa do espalhamento (MSC), ortogonalização de espectros pelo método de Gram-schmidt (GS), transformação padrão normal de variação (SNV) e dados centrados na média.

Em todos os modelos desenvolvidos foram usadas 70 amostras na calibração e 30 amostras na previsão. Essa separação foi baseada no algoritmo de Kennard-Stone [75].

O método de validação cruzada foi usado para a escolha do número ótimo de variáveis latentes, isto é, o menor número de variáveis latentes que conseguem capturar a maior variância dos dados para construir o modelo de calibração para quantificação de metamidofós. A validação cruzada é um procedimento onde uma das amostras do conjunto de calibração é retirada e o modelo é desenvolvido com os restantes, usando diferentes números de variáveis latentes. Após isso, é realizada a previsão da amostra que foi retirada. Todo processo é repetido até que todas as amostras de calibração tenham sido previstas. No final é calculada a raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV – do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation*) para cada número de variáveis latentes utilizadas.

Pela análise dos valores de RMSECV para diferentes números de variáveis latentes no modelo, observou-se que a partir de 10 variáveis latentes não existia mais variação apreciável no erro. Assim esse número foi escolhido para os cálculos, capturando 99,26 % e 96,20 % da variância dos dados independentes (espectros do pesticida) e dependentes (concentrações de metamidofós), respectivamente.

Os resultados obtidos para os dados apenas centrados na média apresentaram valores da raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração (RMSEC – do inglês, *Root Mean Square Error of Calibration*) e da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP – do inglês, *Root Mean Square Error of Prediction*) de 2,50 µg/L e 3,30 µg/L respectivamente. A figura 4.8 ilustra o gráfico dos valores previstos contra os valores de referência para quantificação do pesticida metamidofós utilizando as amostras de validação.

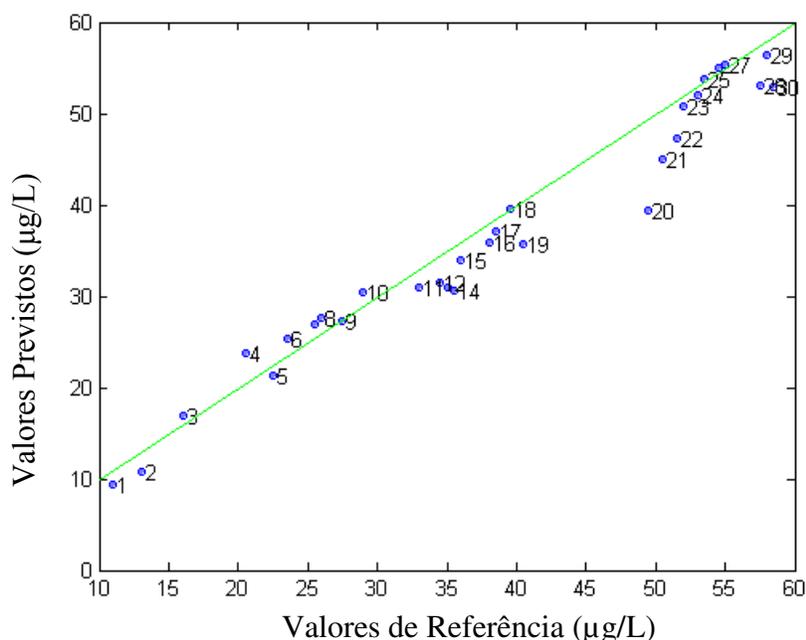


Figura 4.8. Modelo de calibração para determinação de metamidofós

4.8.1. Modelo de calibração utilizando a transformada de Fourier como pré-processamento

Os espectros SERS das soluções aquosas do pesticida metamidofós foram pré-processados aplicando a Transformada de Fourier (ver figura 4.9). Foi utilizado esse processamento para verificar se com a diminuição dos ruídos, inerentes à medida direta do espalhamento Raman, os resultados de previsão do modelo de calibração fossem melhores. Verifica-se nessa figura uma certa diminuição do ruído espectral, pela eliminação de altas frequências do espectro. Em seguida, os dados foram centrados na média e foi utilizado o método de validação cruzada para escolher o número de variáveis latentes. Os valores de RMSEC e RMSEP foram calculados para possível avaliação do desempenho do modelo.

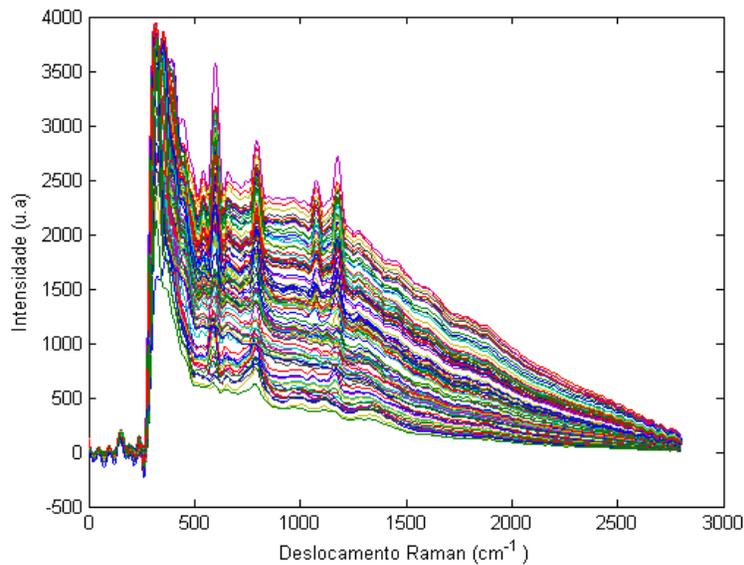


Figura 4.9. Espectros SERS do pesticida metamidofós após utilização do filtro com transformada de Fourier.

Para o modelo foram utilizadas 10 variáveis latentes as quais capturaram 99,96 % e 96,20 % da variância dos dados, como mostrado na tabela 10, e que explicaram o menor RMSECV (raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada).

Os valores de RMSEC e RMSEP calculados pelo modelo foram de 2,79 $\mu\text{g/L}$ e 3,36 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. A figura 4.10 mostra o gráfico dos valores previstos contra os valores de referência para quantificação do pesticida metamidofós utilizando as amostras de validação. Analisando-se os resultados, nota-se que os valores de previsão são até piores que os anteriormente apresentados. Uma possível explicação para isso é que a utilização do filtro acabou por eliminar informações espectrais importantes para o desenvolvimento do modelo de calibração.

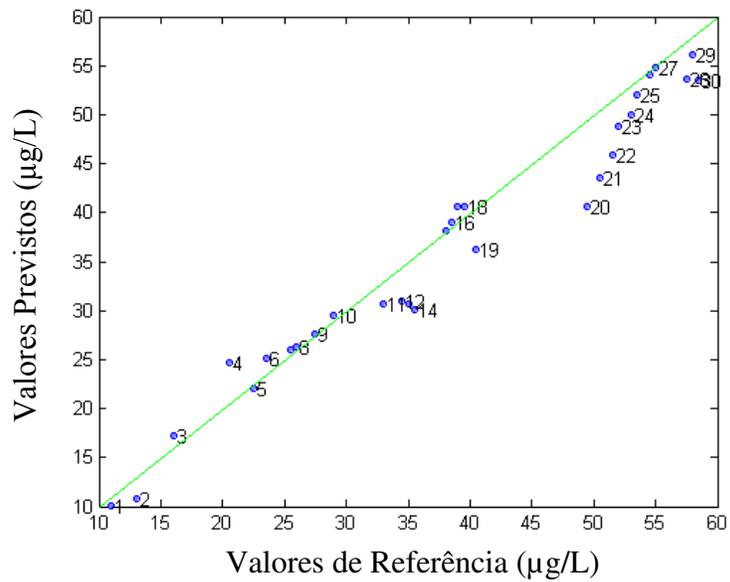


Figura 4.10. Modelo de calibração para determinação de metamidofós com pré-processamento por filtro com transformada de Fourier.

4.8.2. Modelo de calibração utilizando MSC como pré-processamento

O terceiro modelo de calibração foi construído utilizando a correção de espalhamento multiplicativo. Os espectros após esta correção estão apresentados na figura 4.11. Este pré-processamento foi aplicado para verificar o efeito de uma correção de espalhamento sobre os resultados de previsão.

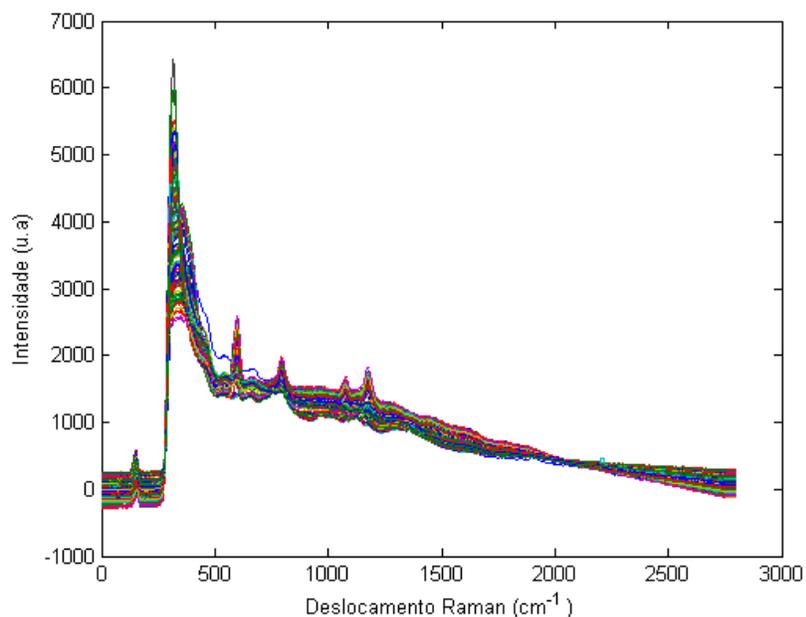


Figura 4.11. Espectros SERS do pesticida metamidofós com pré-processamento por MSC.

Após a correção de espalhamento, os dados foram centrados na média, e em seguida, foi utilizado o método de validação cruzada para escolher o número de variáveis latentes a ser empregado no modelo. Neste modelo foram utilizadas 10 variáveis latentes as quais capturaram 99,96 % e 96,20 % da variância dos dados das variáveis independentes e dependentes, respectivamente.

Os valores de RMSEC e RMSEP calculados pelo modelo foram de 2,79 $\mu\text{g/L}$ e 2,08 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. A figura 4.12. ilustra o gráfico dos valores previstos contra os valores de referência para quantificação do pesticida metamidofós utilizando as amostras de validação.

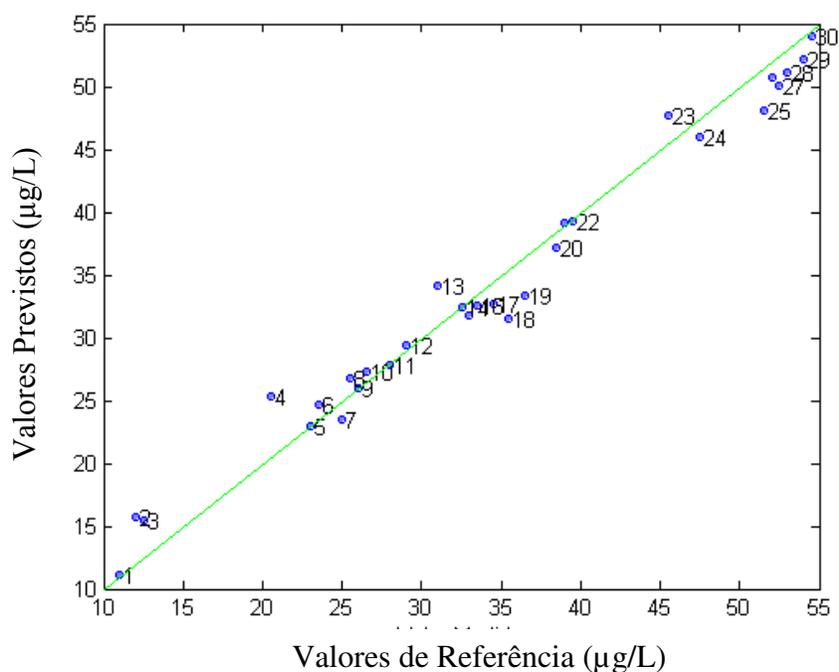


Figura 4.12. Modelo de calibração para determinação de metamidofós com pré-processamento por MSC.

Pode-se observar nesse caso que as previsões foram melhores às demais já apresentadas, uma vez que os pontos da figura 4.12. praticamente estão sob a reta verificando que os valores previstos são muito próximos aos esperados. Além disso, menores valores de RMSEP foram obtidos, confirmando a superioridade do modelo desenvolvido.

4.8.3. Modelo de calibração utilizando o método de ortogonalização de Gram-Schmidt como pré-processamento

O quarto modelo de calibração foi construído utilizando os espectros SERS do pesticida metamidofós pré-processados utilizando o método de Gram-Schmidt. Nesse caso, os espectros foram ortogonalizados em relação ao espectro SERS do branco (água). Dessa forma, pretende-se eliminar a contribuição de

efeitos que não estão correlacionados com a amostra, uma vez que estes foram eliminados. A figura 4.13. apresenta o espectro após a ortogonalização, onde se percebe que grande parte do efeito não relacionado ao Raman foi eliminado.

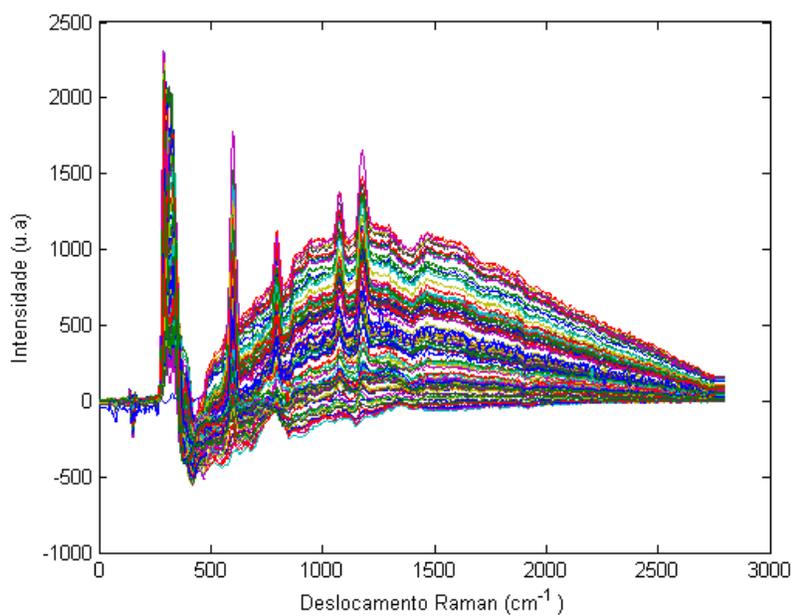


Figura 4.13. Espectros Raman SERS de metamidofós pré-processado com ortogonalização.

O método de validação cruzada também foi utilizado neste modelo para a escolha do número ótimo de variáveis latentes. Foram utilizadas 10 variáveis latentes, as quais capturaram 99,99 % e 99,50 % da variância dos dados das matrizes das variáveis independentes e dependentes, respectivamente. Os valores de RMSEC e RMSEP calculados pelo modelo, com os dados centrados na média, foram de 2,55 $\mu\text{g/L}$ e 2,73 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. A figura 4.14. ilustra o gráfico dos valores previstos contra os valores de referência para quantificação do pesticida metamidofós utilizando as amostras de validação. Nesse caso, os valores de previsão para as amostras 29 e 30 não estão adequados, contudo para as demais os resultados estão satisfatórios, com erros similares aos obtidos anteriormente. Assim a remoção da informação ortogonal aos dados não propiciou uma melhora significativa nos resultados de previsão.

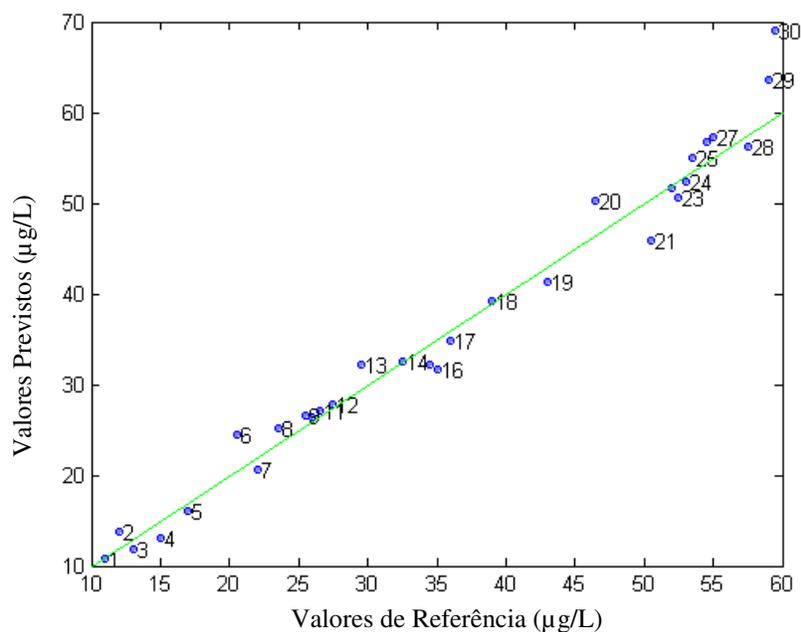


Figura 4.14. Modelo de calibração para determinação de metamidofós com pré-processamento por ortogonalização.

4.8.4. Comparação dos modelos para o pesticida Metamidofós

Também pré-processamento por SNV foi aplicado, mas os resultados foram bastante piores que os apresentados anteriormente e por isso os dados não estão apresentados.

Para um resumo geral dos resultados obtidos a tabela 4.5 apresenta os resultados de RMSEP.

Tabela 4.5. Valores dos erros calculados pelos modelos de calibração para quantificação de metamidofós.

Modelos Desenvolvidos	Tipos de pré-processamentos	RMSEP ($\mu\text{g/L}$)
1º Modelo	CM	3,30
2º Modelo	FT	3,36
3º Modelo	MSC	2,08
4º Modelo	GS	2,73
5º Modelo	SNV	4,15

Pelos resultados apresentados na tabela 4.5, nota-se claramente que os melhores pré-processamento são o MSC e GS. Para uma avaliação mais confiável desses resultados um teste F pode ser aplicado para verificar se existe diferença significativa entre os resultados num certo grau de certeza. A tabela 4.6 apresenta os valores de F calculados como a relação entre os quadrados dos RMSEP's.

Tabela 4.6. Valores de teste F para os diferentes modelos desenvolvidos.

	FT	MSC	GS	SNV
CM	1,19	2,52	1,46	1,51
FT	-	2,61	1,52	1,53
MSC	-	-	1,72	3,98
GS	-	-	-	2,31

Tomando-se o valor de F tabelado com 30,30 graus de liberdade e confiança de 95%, tem-se 1,84. Assim pode-se concluir que o pré-processamento com MSC produz melhores resultados que CM, FT e SNV, enquanto que o pré-processamento com GS produz melhores resultados que SNV.

Observando os valores dos erros de previsão, podemos concluir que a correção de espalhamento multiplicativo é o pré-processamento mais adequado para construir modelos de calibração para quantificação de metamidofós.

4.9. Modelos de calibração para o pesticida Endosulfan

A figura 4.15. mostra os espectros Raman SERS de endosulfan, obtidos através de um espectrômetro Raman de baixa resolução (Raman System, Inc) com LASER diodo, laser operando no infravermelho próximo (785 nm) e detector do tipo CCD de 2048 elementos.

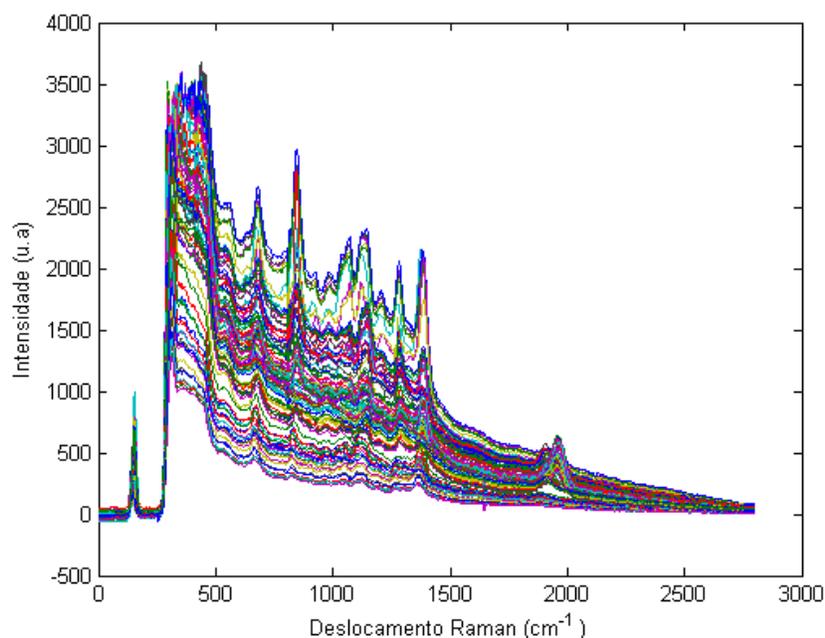


Figura 4.15. Espectros Raman SERS de endosulfan não pré-processados.

Assim como para o Metamidofós, foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada para determinação do endosulfan em água. Também os mesmos pré-processamentos foram testados e comparados para avaliação da possibilidade da quantificação utilizando o SERS.

O primeiro modelo de calibração para o pesticida endosulfan foi construído com os dados centrados na média. O método de validação cruzada também foi utilizado para a escolha do número ótimo de variáveis latentes, isto é, o menor número de variáveis latentes que conseguem capturar a maior variância dos dados para construir o modelo.

Nesse caso, foram escolhidas 10 variáveis latentes, as quais capturaram respectivamente, 99,75 % e 94,48 % da variância das variáveis independentes e dependentes.

Os valores de RMSEC e RMSEP calculados pelo modelo foram de 3,34 $\mu\text{g/L}$ e 3,27 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. A figura 4.16. ilustra os valores de referência contra os valores previstos pelo PLS.

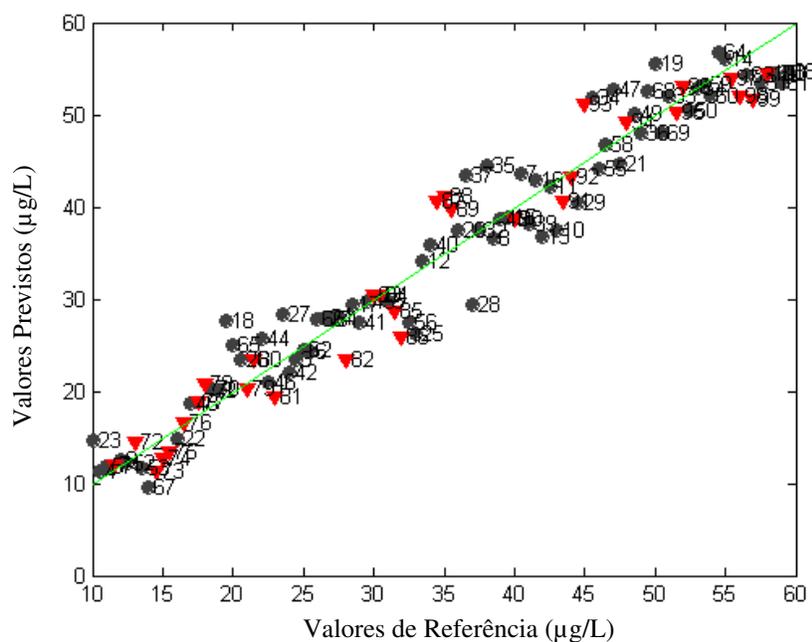


Figura 4.16. Modelo de calibração para determinação de endosulfan.

(●) calibração; (▼) validação.

4.9.1. Modelo de calibração utilizando transformada de Fourier como pré-processamento

Para construção do segundo modelo de calibração, os espectros Raman SERS de endosulfan foram pré-processados aplicando a Transformada de Fourier, na tentativa de eliminação de ruídos espectrais. Os espectros filtrados estão apresentados na figura 4.17.

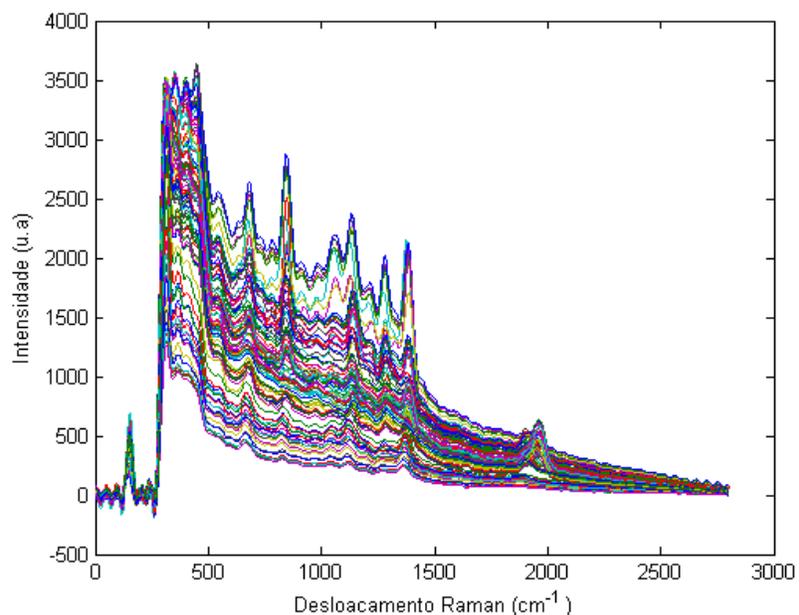


Figura 4.17. Espectros SERS do pesticida endossulfan após utilização do filtro de transformada de Fourier.

Para o modelo foram utilizadas 10 variáveis latentes as quais capturaram 99,78 % e 92,71 % das variáveis independentes e dependentes respectivamente. Os valores obtidos para RMSEC e RMSEP foram de 3,83 $\mu\text{g/L}$ e 3,56 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, com os dados centrados na média. Nesse caso, como para o pesticida anterior, a utilização do filtro não proporcionou melhora nos resultados, apresentando até valores superiores de erros. A figura 4.18. ilustra os valores de referência contra os valores previstos pelo PLS

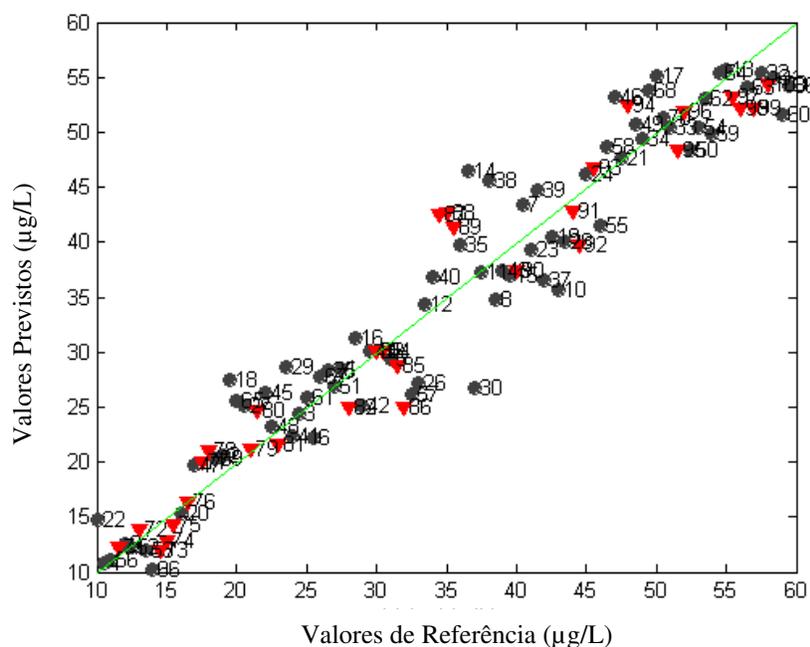


Figura 4.18. Modelo de calibração para determinação do endosulfan com transformada de Fourier como pré-processamento. (●) calibração; (▼) validação.

4.9.2. Modelo de calibração utilizando SNV como pré-processamento

Após utilização da transformada de Fourier, os dados foram pré-processados aplicando a transformação padrão normal de variação, e em seguida, centrados na média para possibilitar melhor desempenho do modelo para quantificação de endosulfan. Para desenvolvimento do modelo de calibração foi utilizado o método de validação cruzada para a escolha do número ótimo de variáveis latentes. Foram utilizadas 10 variáveis latentes e os valores de e RMSEC e RMSEP calculados pelo modelo foram de 3,05 µg/L e 2,83 µg/L respectivamente.

A figura 4.19. ilustra o modelo de calibração desenvolvido para quantificação do pesticida endosulfan. Para o pré-processamento SNV, é possível observar uma melhora significativa dos valores de previsão em relação aos anteriormente mostrados.

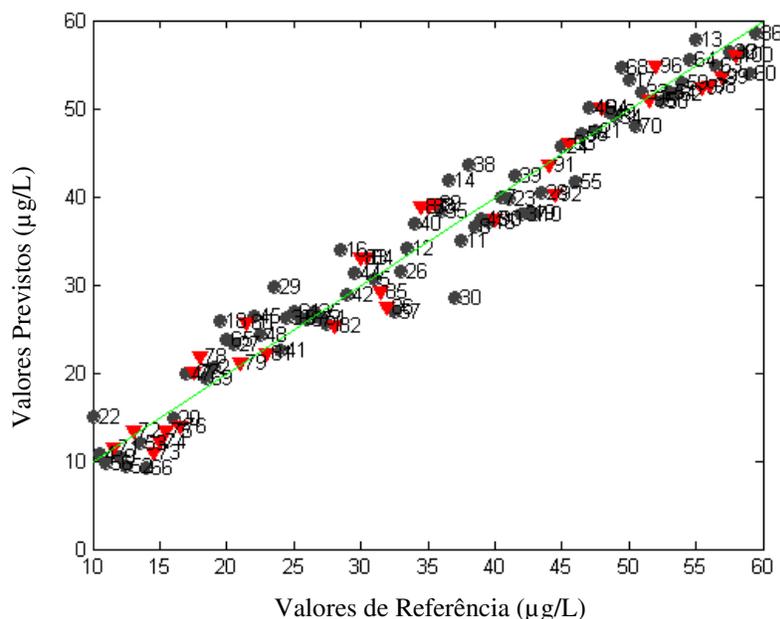


Figura 4.19. Modelo de calibração para determinação de endosulfan utilizando SNV como pré-processamento. (●) calibração; (▼) validação.

4.9.3. Modelo de calibração utilizando MSC como pré-processamento

A figura 4.20. mostra os espectros já pré-processados aos quais foram aplicados a correção multiplicativa do espalhamento com a finalidade de corrigir as linhas base espectrais. O quarto modelo de calibração foi construído após o pré-processamento. O RMSEP do modelo foi comparado com os demais RMSEPS dos modelos anteriores, para possível avaliação no desempenho dos modelos de calibração desenvolvidos.

Para esse modelo também foi utilizado o método de validação cruzada para a escolha do número ótimo de variáveis latentes. Foram utilizadas 10 variáveis latentes as quais capturaram 97,64 % de X e 96,74 % de Y da variância dos dados. Os valores dos erros de RMSEC e RMSEP calculados pelo modelo foram de 2,50 µg/L e 2,48 µg/L, respectivamente. A figura 4.21. ilustra o modelo de calibração desenvolvido para quantificação do pesticida endosulfan.

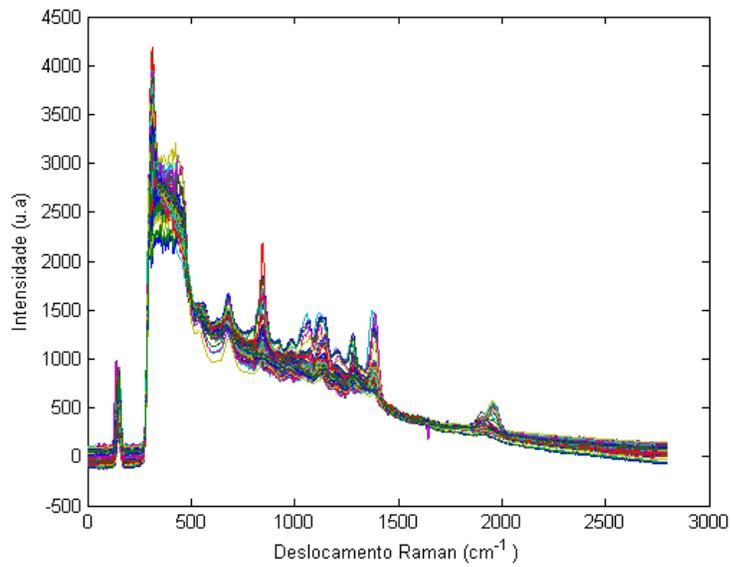


Figura 4.20. Espectros Raman SERS de endosulfan pré-processados com MSC.

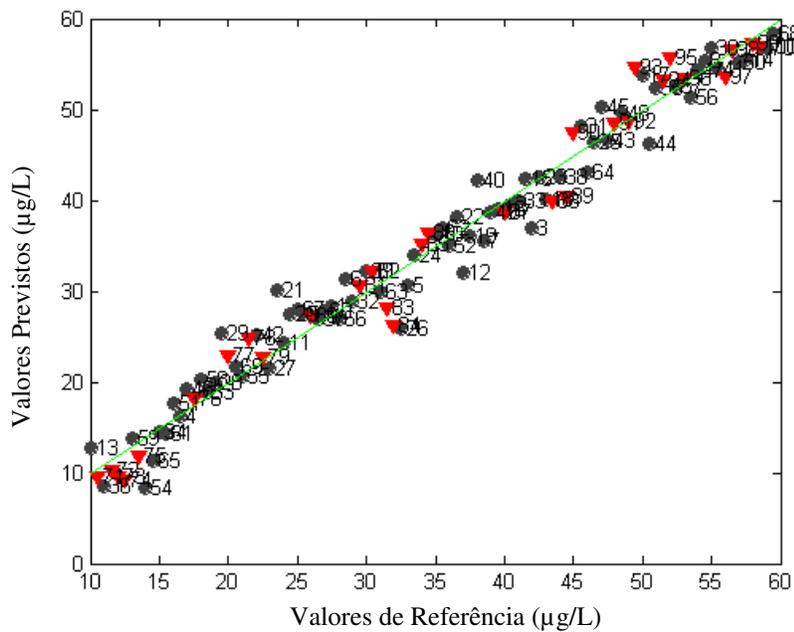


Figura 4.21. Modelo de calibração para determinação de endosulfan com pré-processamento por MSC. (●) calibração; (▼) validação.

Também nesse caso, utilizando o MSC nota-se uma sensível melhora nos resultados como para o SNV. A melhora com esses dois pré-processamentos pode ser explicada pelo fato de que eles corrigem parte do grande sinal da fluorescência que encobre os picos Raman do endosulfan.

4.9.4. Modelo de calibração utilização ortogonalização de Gram-Schmidt como pré-processamento

Os espectros SERS ortogonalizados estão apresentados na figura 4.22. Foram utilizadas 10 variáveis latentes as quais capturaram 97,01 % e 95,73 % da variância dos dados independentes e dependentes, respectivamente. Os valores dos erros de RMSEC e RMSEP calculados pelo modelo foram de 3,34 $\mu\text{g/L}$ e 3.02 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. A figura 4.23. ilustra o modelo de calibração desenvolvido para quantificação do pesticida endosulfan.

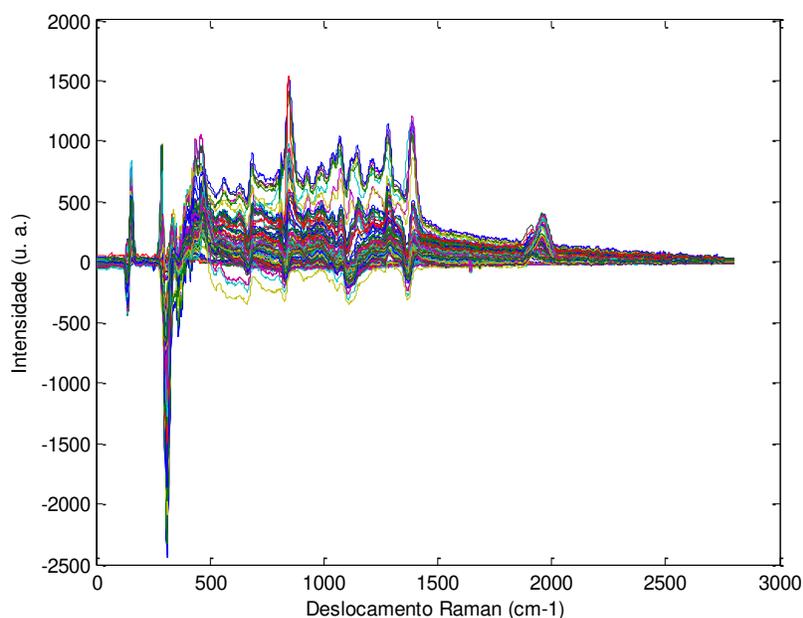


Figura 4.22. Espectros Raman SERS de endosulfan pré-processados com ortogonalização.

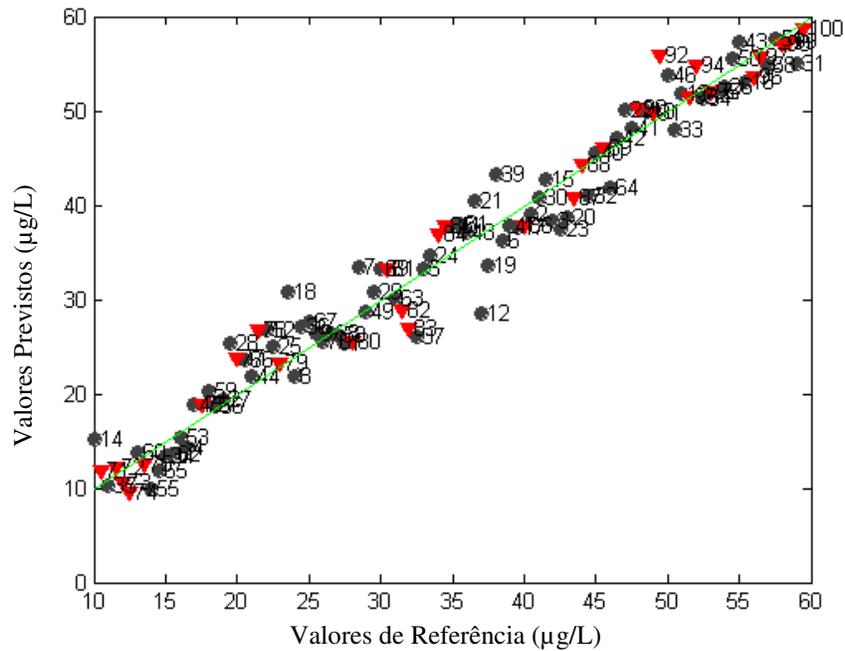


Figura 4.23. Modelo de calibração para determinação de endosulfan com pré-processamento por ortogonalização. (●) calibração; (▼) validação.

4.9.5. Comparação dos modelos para o pesticida Endosulfan

Os resultados obtidos para os diferentes modelos estão apresentados na tabela 4.7. Nesse caso nota-se que as diferenças entre os vários pré-processamentos não são muito grandes, destacando-se apenas que a utilização do MSC produz resultados com erros menores. Porém realizando-se um teste F para comparação dos RMSEP's com 95% de confiança, não são observadas diferenças significativas entre os modelos desenvolvidos.

Tabela 4.7. Valores dos erros calculados pelos modelos de calibração para quantificação de endosulfan

Modelos Desenvolvidos	Tipos de pré-processamentos	RMSEP ($\mu\text{g/L}$)
1º Modelo	CM	3,27
2º Modelo	FT	3,56
3º Modelo	SNV	2,83
4º Modelo	MSC	2,48
5º Modelo	GS	3,02

4.10. Modelos de calibração multivariada para misturas dos pesticidas Metamidofós e Endosulfan

Os espectros Raman SERS da mistura de pesticidas estão apresentados na figura 4.24. Todos os modelos de calibração foram desenvolvidos através do método dos mínimos quadrados parciais com algoritmo SMPLS, sendo que foram desenvolvidos modelos independentes para cada pesticida. Foram usadas 38 amostras na calibração e 10 amostras na previsão.

As variáveis independentes e dependentes foram centradas na média, e em seguida, o método de validação cruzada foi utilizado para obter o número ótimo de variáveis latentes para construção do modelo. Também os mesmos pré-processamentos já apresentados anteriormente foram testados e comparados para avaliação da possibilidade da quantificação dos pesticidas em misturas utilizando o SERS.

Nesse caso, os modelos para o pesticida endosulfan necessitaram de 11 variáveis latentes, que capturaram mais de 95% da informação dos dados em todos os casos. Já para o pesticida metamidofós somente por volta de 70% da informação dos dados para as variáveis dependentes puderam capturados pelo modelo.

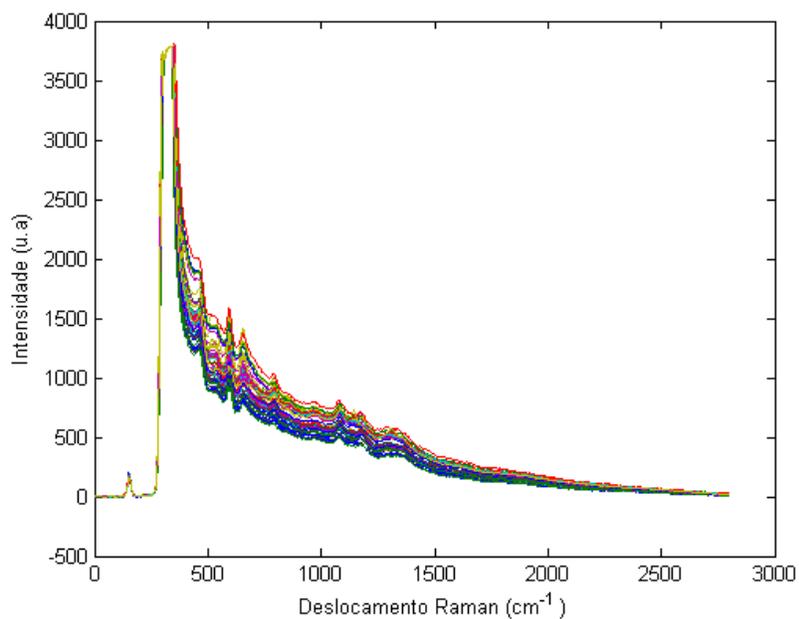


Figura 4.24. Espectros Raman SERS das misturas de pesticidas endosulfan e metamidofós.

A figura 4.25. ilustra o gráfico dos valores de referência versus os valores previstos pelo modelo de calibração desenvolvido para o pesticida endosulfan com os dados centrados na média, onde se pode observar a excelente concordância entre os valores de referência e calculados pelo modelo.

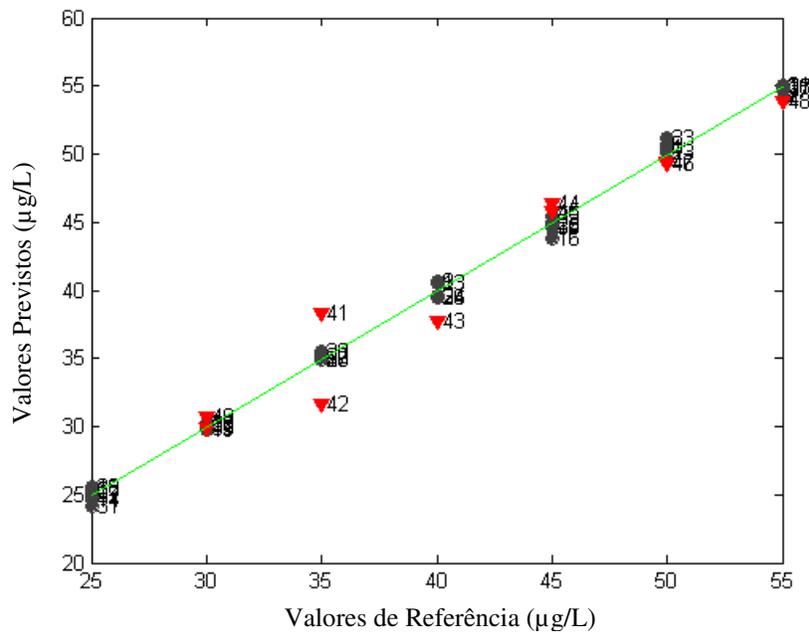


Figura 4.25. Valores de referência contra os previstos pelo modelo para a quantificação do pesticida endosulfan na mistura. (●) calibração; (▼) validação.

A figura 4.26. ilustra os valores medidos contra os valores previstos pelo modelo para o pesticida metamidofós com dados pré-processados por MSC. Pode-se verificar que os resultados apresentados são bem piores que para o endosulfan. Só pelo fato do modelo de calibração multivariada com o PLS conseguir descrever apenas 72,01% da variância nos dados das variáveis dependentes, indica que está sendo difícil o desenvolvimento da relação entre os espectros e a concentração do metamidofós. Pode-se verificar grande dispersão entre as amostras de calibração indicando algum problema com os dados. Apesar das medidas terem sido refeitas, não foi possível desenvolver modelos com melhor poder de previsão que os apresentados.

Uma possível explicação para isto é que pode estar ocorrendo algum tipo de interação entre os pesticidas e o substrato ativo que faz com que a relação deixe de ser linear. Não se pode esquecer que o PLS baseia-se nas relações lineares entre as variáveis independentes (X) e variáveis dependentes (Y). Esses

resultados são bastante diferentes dos apresentados anteriormente para metamidofós puro, endosulfan puro e endosulfan na mistura.

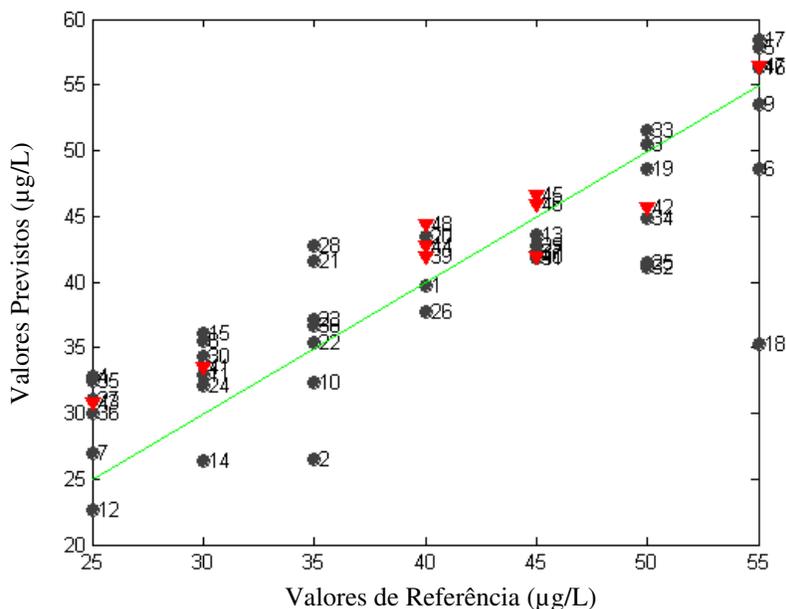


Figura 4.26. Valores de referência contra os previstos pelo modelo para a quantificação do pesticida metamidofós na mistura. (●) calibração; (▼) validação.

As tabelas 4.8 e 4.9 mostram os valores dos erros para as determinações de endosulfan e metamidofós na mistura para os diversos pré-processamentos realizados. Nota-se claramente que as previsões para o endosulfan são bastante superiores que para o metamidofós. Aplicando um teste F para comparação dos RMSEP's, verifica-se que no nível de confiança de 95%, não existe diferença significativa entre os modelos.

Tabela 4.8. Valores dos erros calculados pelos modelos de calibração para quantificação de endosulfan nas misturas

Modelos Desenvolvidos	Tipos de pré-processamentos	RMSEP (µg/L)
1º Modelo	CM	1,80
2º Modelo	FT	1,88
3º Modelo	SNV	2,13
4º Modelo	MSC	2,19
5º Modelo	GS	1,59

Tabela 4.9. Valores dos erros calculados pelos modelos de calibração para quantificação de metamidofós nas misturas

Modelos Desenvolvidos	Tipos de pré-processamentos	RMSEP (µg/L)
1º Modelo	CM	3,31
2º Modelo	FT	3,25
3º Modelo	SNV	3,27
4º Modelo	MSC	2,91
5º Modelo	GS	3,85

4.11. Validação dos melhores modelos de Calibração

Foram estimadas as figuras de mérito para os modelos desenvolvidos na determinação dos pesticidas. Foram escolhidos os modelos que apresentaram o menor valor de RMSEP para esses cálculos, apesar de que para a maioria dos casos, não houve diferença significativa entre os diferentes pré-processamentos testados. A tabela 4.10 apresenta as figuras de mérito calculadas.

Tabela 4.10. Figuras de Mérito para os modelos desenvolvidos.

Figuras de Mérito		Endosulfan	Metamidofós	Endosulfan Na Mistura	Metamidofós Na Mistura
Exatidão *	RMSEC	2,94	2,87	0,86	5,85
	RMSEP	2,48	2,08	1,80	2,91
Sensibilidade Analítica **		8,00	7,76	3,51	14,54
Inverso da Sensibilidade Analítica		0,13	0,13	0,29	0,02
Seletividade		0,0061	0,0042	0,0189	0,0013
Ajuste	Inclinação	0,95	0,97	1,00	0,73
	Intercepto	1,60	1,10	0,19	11,00
	Coef. Corr. (r²)	0,95	0,97	0,99	0,72
Ajuste NAS	Inclinação	0,044	0,042	0,093	0,095
	Intercepto	-34,00	-36,00	-40,00	-39,00
	Coef. Corr. (r²)	0,83	0,97	0,99	0,73
Razão Sinal/Ruído	Máx.	658,61	782,09	335,67	1420,30
	Mín.	338,38	316,60	224,97	884,25
Limite Detecção *		0,50	0,43	0,94	0,23
Limite Quantificação *		1,34	1,29	2,85	0,69

(*) Resultados em µg/L , (**) (µg/L)⁻¹

O ajuste dos modelos construídos foi avaliado com base nos gráficos dos valores para os parâmetros estimados pelos modelos PLS contra os valores de referência. Outra maneira de avaliar o ajuste de modelos de calibração multivariada é através dos gráficos dos valores escalares do sinal analítico líquido (NAS), determinado pela norma do vetor de sinal analítico líquido em função do valor de referência para cada parâmetro. Esta última refere-se à representação pseudo-univariada dos modelos de calibração multivariada. A inclinação, o intercepto e o coeficiente de correlação para os modelos são mostrados na Tabela 4.10. Pelos ajustes nota-se que somente para a determinação do metamidofós na mistura a correlação não está acima de 0,95, indicando que este modelo não está ajustado de maneira correta.

As Figuras 4.27., 4.28., 4.29. e 4.30. mostram os gráficos dos valores de referência contra os valores estimados. Nesse caso, o modelo linear parece se ajustar bem aos dados, porém o modelo para o metamidofós na mistura tem um pior ajuste. Essa falta de ajuste pode ser em decorrência da não interação das moléculas de metamidofós com as partículas de ouro coloidal que produzem o efeito SERS. As figuras 4.31., 4.32., 4.33. e 4.34. mostram os gráficos do escalar NAS contra a concentração, respectivamente, dos modelos de calibração para o endosulfan, metamidofós, endosulfan na mistura e metamidofós na mistura. Pode-se observar que para o NAS, novamente o ajuste para o pesticida metamidofós na mistura não é adequado.

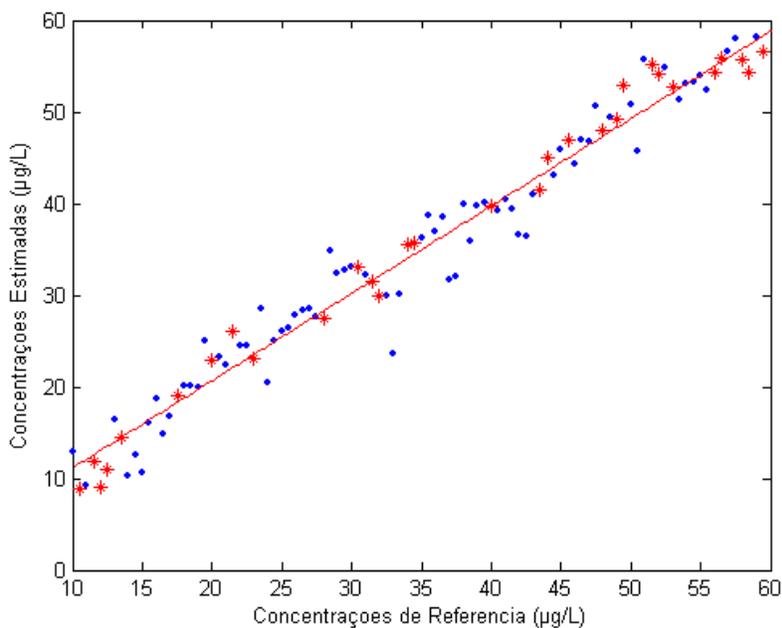


Figura 4.27. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para o pesticida endossulfan. (●) amostras de calibração, (*) amostras de validação

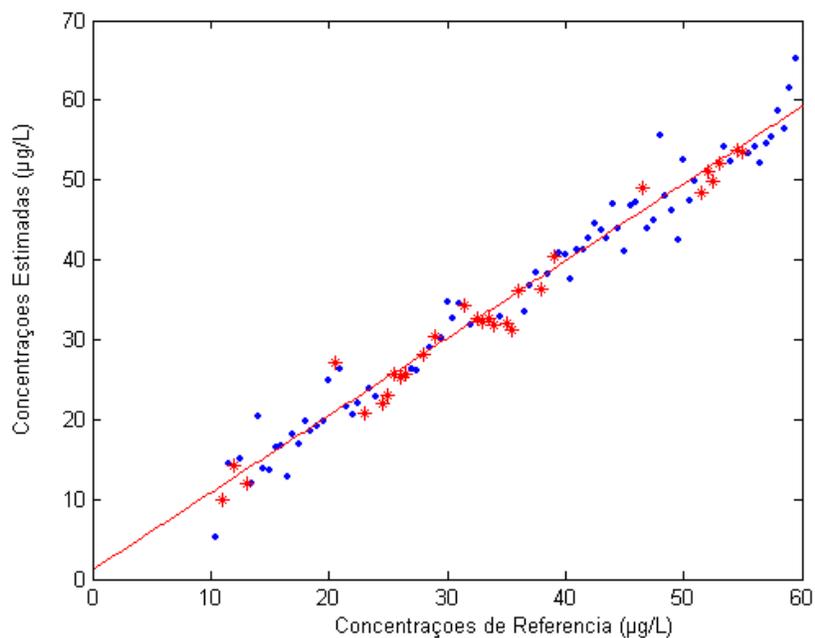


Figura 4.28. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para o pesticida metamidofós. (●) amostras de calibração, (*) amostras de validação

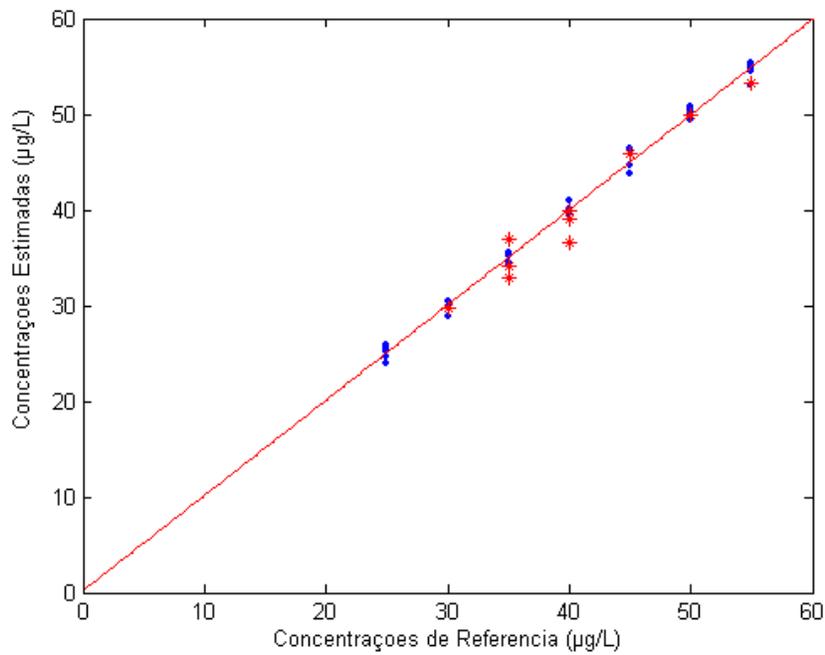


Figura 4.29. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para o pesticida endossulfan na mistura. (●) amostras de calibração, (*) amostras de validação.

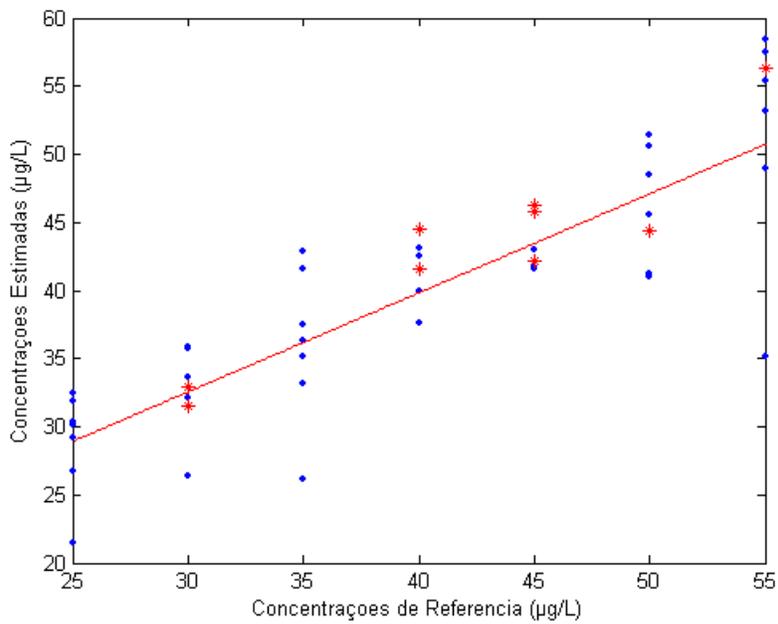


Figura 4.30. Valores de referência versus valores estimados pelo modelo PLS para o pesticida metamidofós na mistura. (●) amostras de calibração, (*) amostras de validação.

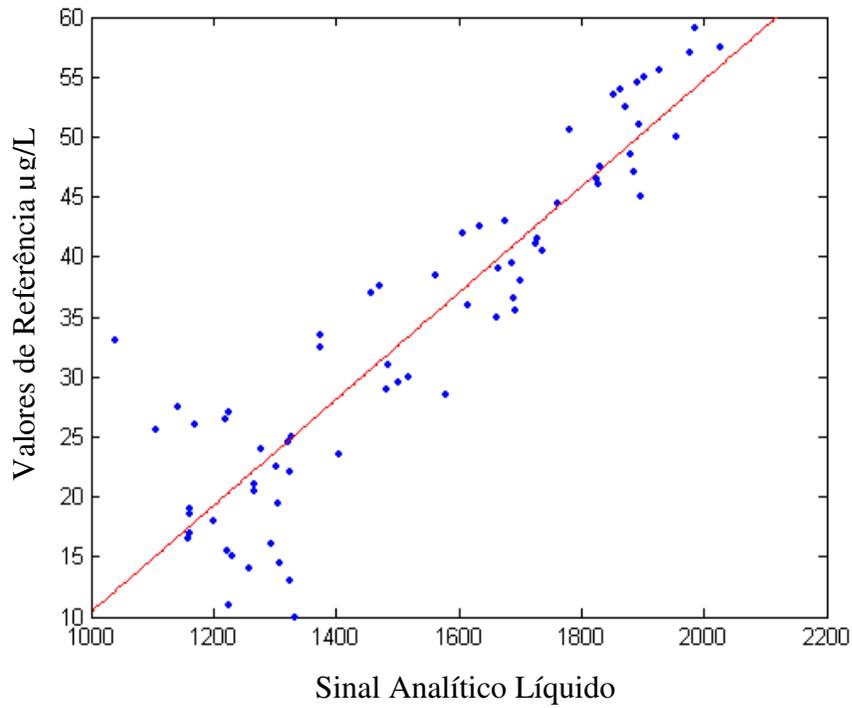


Figura 4.31. Escalar NAS contra as concentrações de referência para o endosulfan.

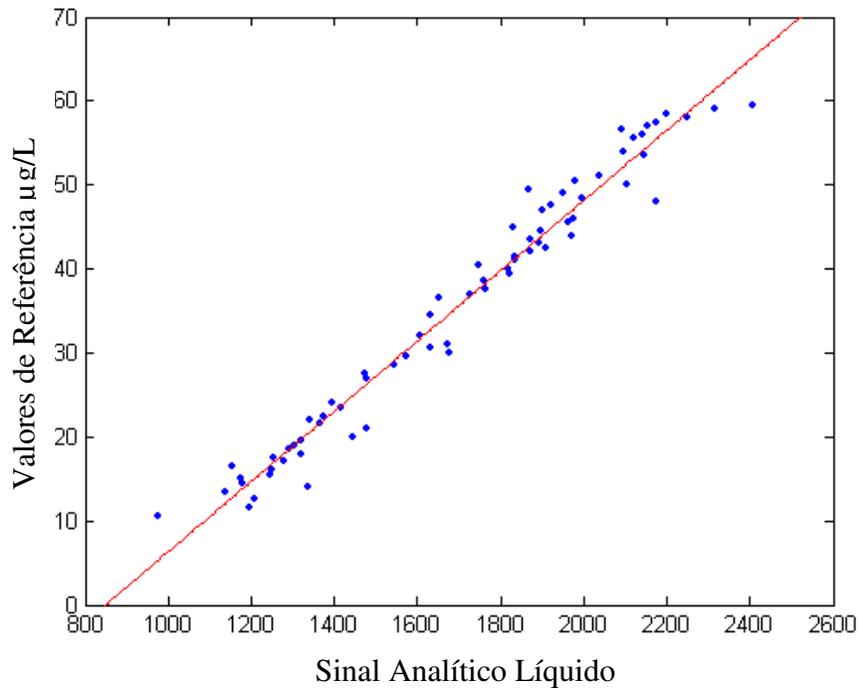


Figura 4.32. Escalar NAS contra as concentrações de referência para o metamidofós.

As Figuras 4.35., 4.36., 4.37. e 4.38. representam os resíduos da calibração validação para as amostras de endosulfan, metamidofós, endosulfan na mistura e metamidofós na mistura, respectivamente. Qualitativamente, estes gráficos podem indicar se os dados seguem ou não um comportamento linear. A distribuição aleatória desses resíduos é um indicativo de comportamento linear. A distribuição dos erros para endosulfan, metamidofós e endosulfan na mistura apresenta um comportamento aleatório, no entanto, para o metamidofós na mistura observa-se uma certa tendência.

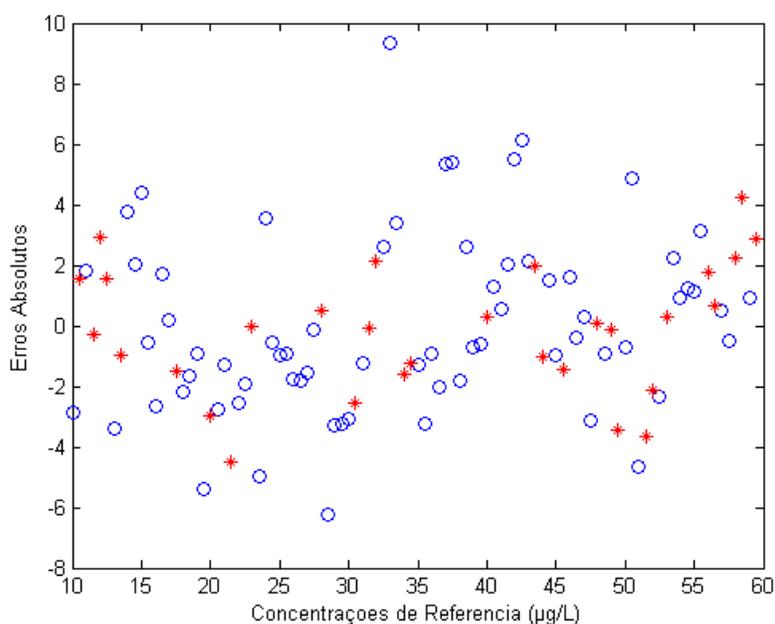


Figura 4.35. Gráfico de erros absolutos contra os valores de referência do modelo de calibração para determinação do pesticida endosulfan.

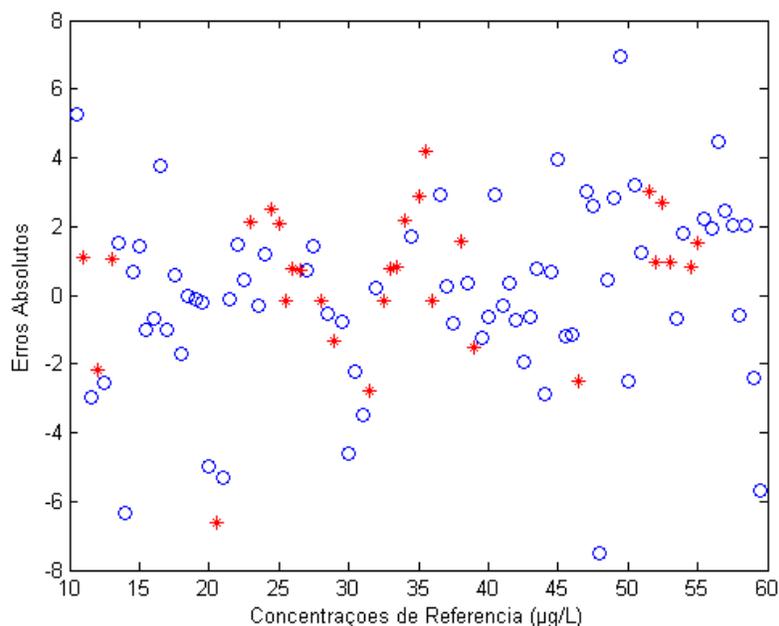


Figura 4.36. Gráfico de erros absolutos contra os valores de referência do modelo de calibração para determinação do pesticida metamidofós.

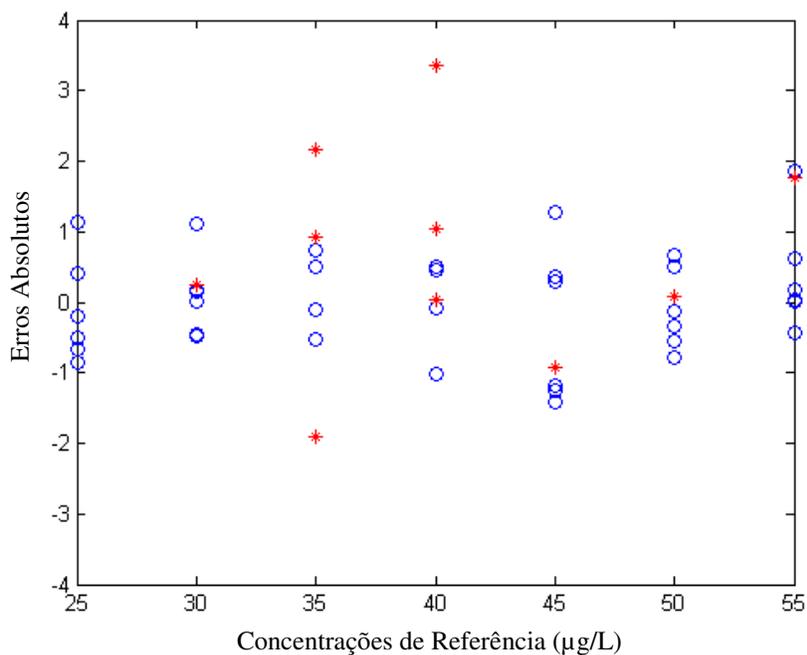


Figura 4.37. Gráfico de erros absolutos contra os valores de referência do modelo de calibração para determinação do pesticida endosulfan na mistura.

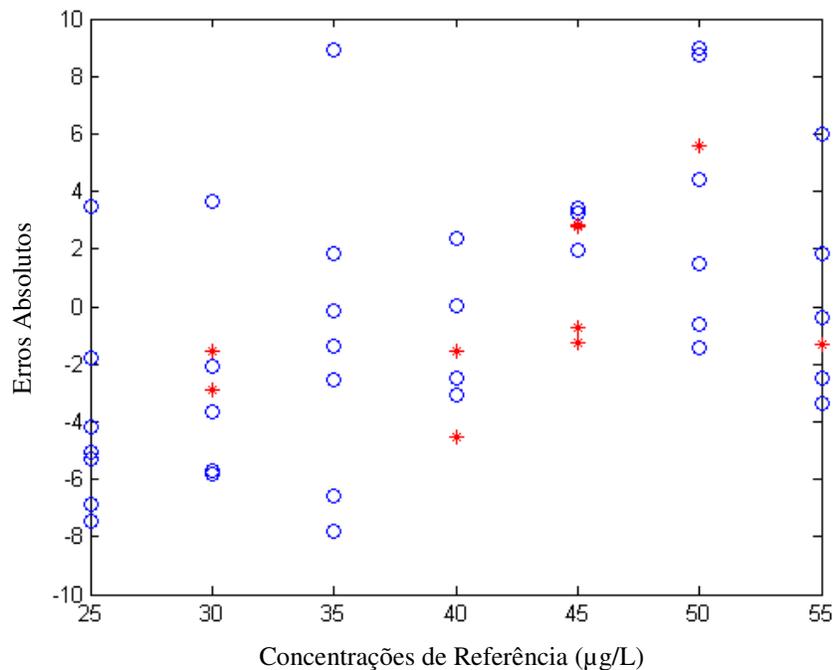


Figura 4.38. Gráfico de erros absolutos contra os valores de referência do modelo de calibração para determinação do pesticida metamidofós na mistura.

Os indicadores de exatidão, mostrados na Tabela 4.10, apresentam um nível aceitável de dispersão e uma boa concordância entre si, menos para o metamidofós na mistura. A sensibilidade e sensibilidade analítica apresentaram ótimos resultados para o modelo endosulfan e bons resultados para os demais modelos (metamidofós, endosulfan na mistura e metamidofós na mistura) considerando-se a faixa de concentrações utilizadas e também pela técnica empregada neste trabalho. Os valores para o inverso da sensibilidade analítica, apresentados na Tabela 4.10, podem ser interpretados de forma mais clara, por apresentarem uma correlação com a concentração utilizada. Este valor é mais simples e informativo para comparações e julgamento de um método analítico, pois permite estabelecer a menor diferença de concentração entre amostras que pode ser distinguida pelo método. Segundo esses valores, por exemplo, o modelo é capaz de fazer a distinção entre amostras com diferença de concentração da ordem de 0,13 µg/L de endosulfan e metamidofós em águas.

Os valores de seletividade que são mostrados na Tabela 4.10 representam a fração média do sinal do espectro da amostra que é usado na modelagem, por não ser ortogonal em relação à propriedade de interesse. Logo, esses valores não se referem à seletividade no seu significado físico, que é em geral empregado em Química Analítica. Eles indicam que menos que 1% em média do sinal está relacionado ao nível do analito.

Os valores para a razão sinal/ruído apresentados na Tabela 4.10 mostram o quanto o escalar “nas” está acima do desvio padrão da flutuação do sinal instrumental da referência. Os valores mínimos para a razão sinal/ruído apresentados na tabela, são os limites aceitáveis para determinações quantitativas.

Os limites de detecção e quantificação para os modelos construídos mostraram resultados coerentes com as quantidades medidas para todos os parâmetros. Assim é possível realizar quantificações para os pesticidas em água com concentrações acima de 1,34 e 1,29 µg/L para endosulfan e metamidofós, respectivamente.

CAPÍTULO 5

**DETERMINAÇÃO DE TSH EM PLASMA SANGUÍNEO UTILIZANDO
SERS**

5.1. Introdução

Os hormônios tireoideanos (HT) [76] são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos de animais vertebrados. Embora essa ação já ocorra no estágio embrionário, alguns desses órgãos e tecidos ainda apresentam-se imaturos após nascimento e têm um padrão de desenvolvimento temporal específico, o qual depende de um suporte adequado de triiodotironina (T3), o principal hormônio tireoideano. Dele também depende o crescimento, diferenciação e a regulação da atividade e metabolismo desses mesmos órgãos e tecidos na fase adulta, razão pelas quais os hormônios tireoideanos são considerados essenciais para a manutenção da qualidade de vida do ser humano.

A fonte de HT é a glândula tireóide, que secreta predominantemente o hormônio tiroxina (T4) da qual deriva, por desiodação, a maior parte do T3 circulante. É do T3, hormônio que apresenta atividade biológica no mínimo 5 vezes maior que a do T4, que depende a atividade de, praticamente, todos os tecidos do organismo, já que todos eles expressam receptores de HT [76].

Em linhas gerais, a função tireoideana é regulada pelo hormônio liberador de tireotropina (TRH) produzido no hipotálamo que, por meio do sistema porta hipotálamo-hipofisário, se dirige à adeno-hipófise, ligando em receptores específicos no tireotrofo e induzindo a síntese e secreção de hormônio tirotrópico (TSH). Este, por sua vez, interage com receptores presentes na membrana da célula folicular tireoideana induzindo a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese de HT, aumentando a atividade da célula tireoideana e estimulando a secreção hormonal [76].

É necessário que a fisiologia da tireóide esteja normal, para bons resultados reprodutivos, haja vista que, na mulher, o hipotireoidismo é reportado como causa de falha na ovulação e aumento na taxa de abortamento [77].

Na década de 60 surgiram vários estudos que demonstraram alterações nas dosagens dos hormônios tireoideanos em patologias não tireoideanas. Desde então, outros trabalhos foram publicados descrevendo doenças sistêmicas graves,

agudas ou crônicas, acompanhadas ou não por desnutrição e caquexia, nas quais o perfeito entendimento da função tireoideana não era simples, pois havia alterações dos níveis hormonais do sangue, independente da presença de patologia endócrina [78].

5.1.1. Hormônio Tireoestimulante (TSH)

O hormônio tireoestimulante (TSH), também conhecido como tireotropina, é uma glicoproteína produzida pelos tireotrofos da adeno-hipófise. É formado por duas subunidades, alfa e beta, unidas por ligação não-covalente. A subunidade alfa é comum a outras glicoproteínas, como o hormônio folículoestimulante (FSH), o hormônio luteinizante (LH) e a gonadotropina coriônica humana (hCG). Já a subunidade beta do TSH é específica, conferindo especificidade biológica e imunológica [79].

A secreção de TSH pela hipófise é modulada por hormônios tireóideos com mecanismo clássico de retroregulação (“feedback” negativo). Dados recentes da literatura indicam que o T3 produzido internamente, dentro do tirotofocito, por desalogenação de T4, é o agente que bloqueia a secreção de TSH em condições fisiológicas [79].

O hipotálamo atua tanto estimulando a secreção de TSH, através do hormônio liberador de tireotropina (TRH). A concentração sérica de hormônios tireoidianos também causa influência na secreção de TSH, através de *feedback* negativo exercido sobre o eixo hipotálamo-hipofisário. A somatostatina, um hormônio hipotalâmico inibitório, atua através do aumento do efeito inibitório do hormônio tireoidiano sobre os tireotrofos. Ocorre ainda um controle neural, sendo que a dopamina é responsável por inibir fisiologicamente a secreção de TSH.

A principal função da tireotropina é ligar-se à receptores de alta afinidade na glândula tireóide, estimulando a captação do iodo, a hormonogênese e a liberação de T3 e T4 [79].

Desta forma, quando a função hipotálamo-hipofisária está intacta, pequenas alterações nas concentrações dos hormônios tireoideanos livres

resultam em grandes alterações nas concentrações séricas de TSH, tornando o TSH o melhor indicador de alterações discretas da produção tireoideana. A secreção do TSH é pulsátil e possui um ritmo circadiano com os pulsos de secreção ocorrendo entre 22hs e 4hs da madrugada, sendo seus níveis médios entre cerca de 1,3 e 1,4mU/L, com limites inferiores entre 0,3 e 0,5mU/L e limites superiores entre 3,9 e 5,5mU/L (4,5). Variações na concentração sérica de TSH podem ser atribuídas a esta secreção pulsátil e a liberação noturna do TSH [76].

Existem algumas técnicas para avaliação dos níveis destes hormônios, sendo que as mais usadas são: as técnicas de radioimunoensaio [80] e a quimiluminescência [81]. Estas técnicas são rápidas, exatas e apresentam baixos limites de detecção, porém a periculosidade da técnica de radioimunoensaio, devido à radioatividade dos reagentes envolvidos, o alto custo dos aparelhos, do conjunto de reagentes utilizados, bem como a utilização de mão-de-obra especializada, inviabilizam o uso destes métodos de análise.

A perspectiva de utilização da espectroscopia Raman de baixa resolução amplificada por superfície (SERS), para determinação do hormônio tireoideano TSH é extremamente atraente dada à simplicidade experimental dos métodos envolvidos, os baixos limites de detecção possíveis de serem alcançados e principalmente a isenção de reagentes radioativos e não-radioativos. Contudo, as sobreposições de bandas espectrais, efeitos de fluorescência do analito, conferem ao sistema características que podem dificultar a determinação do hormônio em questão.

Uma alternativa bastante viável para se determinar o TSH sem as características que dificultem sua determinação é a aplicação de técnicas quimiométricas de calibração multivariada baseadas no método dos mínimos quadrados parciais (PLS).

5.2. Parte Experimental

Para desenvolver o modelo de calibração por mínimos quadrados parciais, foram obtidas 53 amostras de sangue animal. As amostras foram

centrifugadas e todo soro foi coletado para quantificação do TSH. Foram utilizados 0,5 mL de soro de cada amostra sendo que desses, 0,25 mL foram usados para se determinar a concentração do TSH pelo método de referência e os outros 0,25 mL foram utilizados para obtenção dos espectros SERS de plasma.

Análises por quimioluminescência foram realizadas como método de referência para quantificação de TSH. Utilizou-se o Kit ADVIA Centaur (Bayer Corporation). O princípio do teste é um ensaio imunológico tipo sanduíche de dois sítios que usa quantidades constantes de dois anticorpos com medida por quimioluminescente direta. Os resultados do ensaio são usualmente calibrados contra uma preparação de referência de TSH (ex.: a “Second International Reference Preparation [2nd IRP]” 80/558 da OMS) e são expressos em mil-unidades internacionais de atividade biológica por litro de soro -mUI/L- (ou μ UI/ml).

A tabela 5.1 mostra os resultados obtidos pelo método de referência, ou seja, pelo método da quimioluminescência. A sensibilidade analítica foi de 0,01 μ UI/mL.

Os espectros Raman foram obtidos utilizando cubeta de quartzo, com tempo de integração de 60 segundos. Foram adicionados na cubeta, 1,0 mL de solução coloidal de ouro, 0,25 mL de plasma sanguíneo e obtidos os espectros, a fim de observar a intensificação do sinal Raman (SERS).

Tabela 5.1. Concentrações obtidas pelo método quimioluminescente

Plasma Sanguíneo	Concentração de TSH ($\mu\text{UI/mL}$)
Amostra 1	1,10
Amostra 2	3,30
Amostra 3	0,80
Amostra 4	3,20
Amostra 5	2,30
Amostra 6	1,90
Amostra 7	1,20
Amostra 8	3,30
Amostra 9	4,30
Amostra 10	1,10
Amostra 11	1,10
Amostra 12	3,00
Amostra 13	2,20
Amostra 14	2,20
Amostra 15	1,00
Amostra 16	1,00
Amostra 17	4,80
Amostra 18	1,80
Amostra 19	0,90
Amostra 20	2,60
Amostra 21	0,80
Amostra 22	1,90
Amostra 23	5,00
Amostra 24	2,10
Amostra 25	2,80
Amostra 26	1,50
Amostra 27	3,10
Amostra 28	3,60
Amostra 29	0,12
Amostra 30	1,10
Amostra 31	0,50
Amostra 32	2,60
Amostra 33	1,70
Amostra 34	3,70
Amostra 35	7,60
Amostra 36	2,20
Amostra 37	5,20
Amostra 38	2,70
Amostra 39	3,50
Amostra 40	3,00
Amostra 41	2,90
Amostra 42	2,30
Amostra 43	1,00
Amostra 44	3,50
Amostra 45	2,10
Amostra 46	2,70
Amostra 47	2,60
Amostra 48	3,40
Amostra 49	2,50
Amostra 50	4,00
Amostra 51	2,60
Amostra 52	1,90
Amostra 53	1,90

5.3. Resultados e Discussão

A figura 5.1 mostra os espectros SERS de plasma sanguíneo obtidos através de um espectrômetro Raman de baixa resolução (Raman System, Inc) com LASER diodo, laser operando no infravermelho próximo (785 nm) e detector do tipo CCD de 2048 elementos.

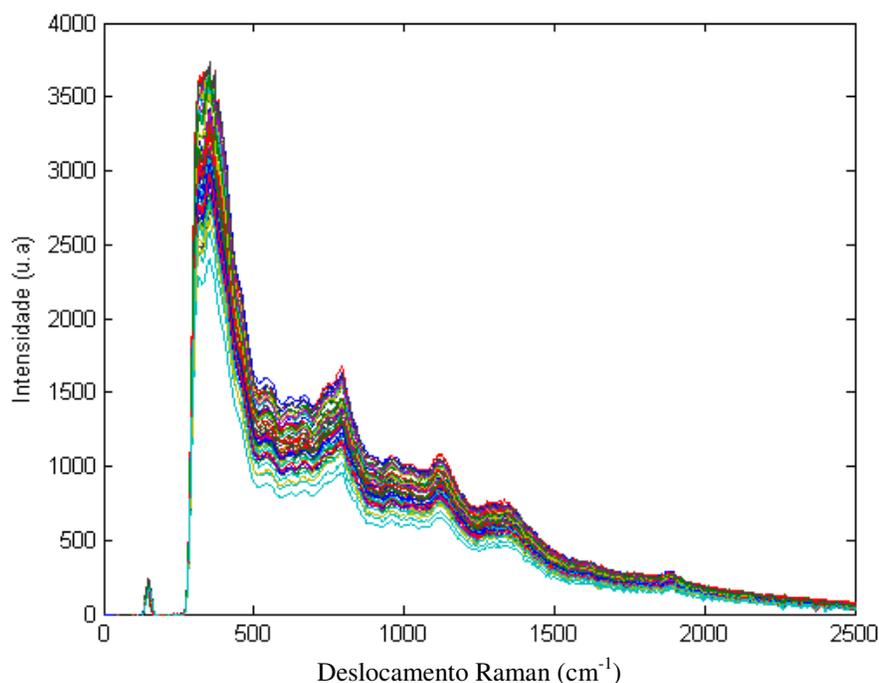


Figura 5.1. Espectros SERS de plasma sanguíneo sem pré-processamento.

Foram usadas 39 amostras na calibração e 14 amostras na previsão, sendo que alguns pré-processamentos foram realizados antes da construção do modelo. Os menores RMSEC (raiz quadrado do erro médio de calibração) e RMSEP (raiz quadrada do erro médio de previsão) foram obtidos com os dados escalados e também com o MSC. A figura 5.2 apresenta os espectros após o pré-processamento.

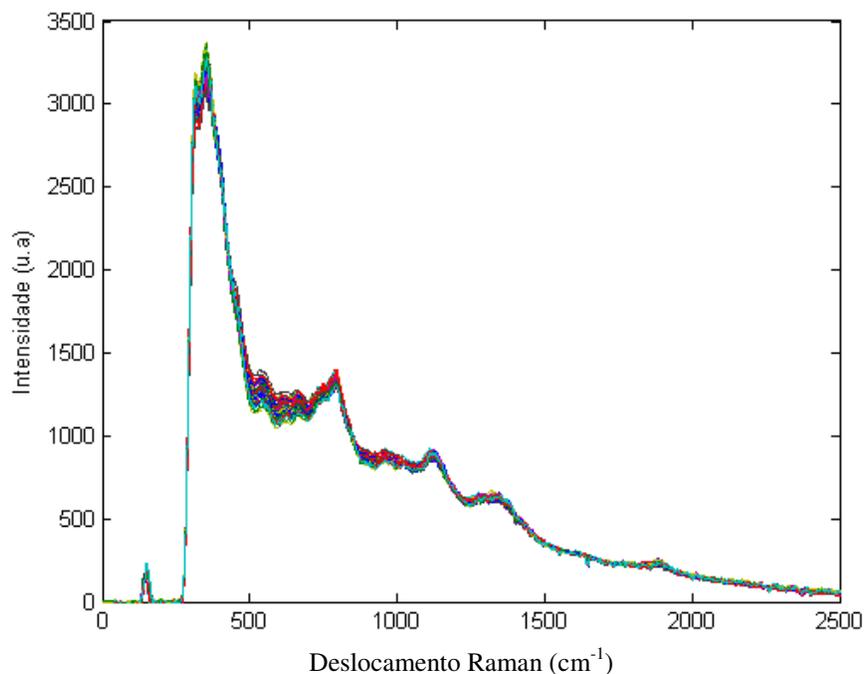


Figura 5.2. Espectros SERS de plasma sanguíneo após pré-processamento

O método de validação cruzada foi usado para a escolha do número ótimo de variáveis latentes, isto é, o menor número de variáveis latentes que conseguem capturar a maior variância dos dados para construir o modelo de calibração para quantificação do TSH, conforme ilustra a figura 5.3. Nessa figura pode-se observar que após a utilização de 7 variáveis latentes não existe mais uma diminuição do RMSEP de validação cruzada.

O modelo de calibração para o TSH foi desenvolvido utilizando 7 variáveis latentes capturando 97,34 % da variância de X (variáveis independentes) e 86,03% da variância de Y (variáveis dependentes). Os valores obtidos dos erros foram: RMSEC de 0,03 $\mu\text{UI/mL}$ e RMSEP de 0,04 $\mu\text{UI/mL}$.

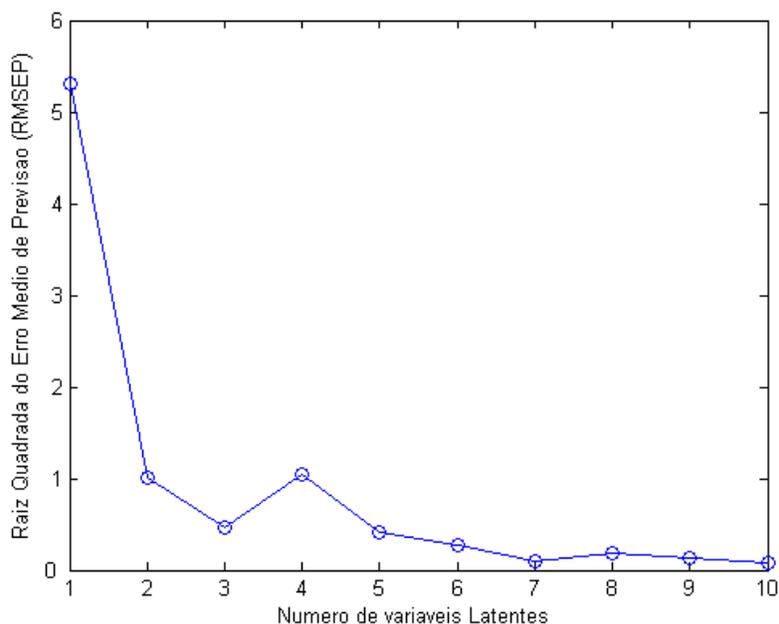


Figura 5.3. Gráfico usado para a escolha no número de variáveis Latentes

O resultado do cálculo das figuras de mérito é apresentado na Tabela 5.2. O modelo linear parece se ajustar bem aos dados. As Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 mostram o gráfico dos valores de referência contra os valores estimados, o gráfico do escalar NAS contra a concentração e o gráfico dos resíduos respectivamente. Esses gráficos demonstram o bom ajuste do modelo linear e a apresentação do modelo PLS na sua forma pseudo-univariada, assim como os erros com comportamentos aleatórios que tendem a confirmar o bom ajuste do modelo de calibração PLS.

Tabela 5.2. Resultados de figuras de mérito estimadas para o modelo PLS.

Figuras de Mérito		
Exatidão*	RMSEC	0,03
	RMSEP	0,04
Sensibilidade**	3,00	
Inverso da Sensibilidade Analítica*	0,12	
Razão Sinal-Ruído	Máx.	$9,80 \times 10^3$
	Min.	$8,38 \times 10^3$
Seletividade	0,06	
Ajuste (Referência x Estimado)	Inclinação	0,70
	Intercepto	0,1
	Coef. Corr.	0,97
Ajuste NAS	Inclinação	0,51
	Intercepto	2,4
	Coef. Corr.	0,97
LD*	0,41	
LQ*	1,24	

(*)Resultados em $\mu\text{UI/mL}$ de TSH em plasma sanguíneo, (**) $\mu\text{UI/mL}$ de TSH^{-1}

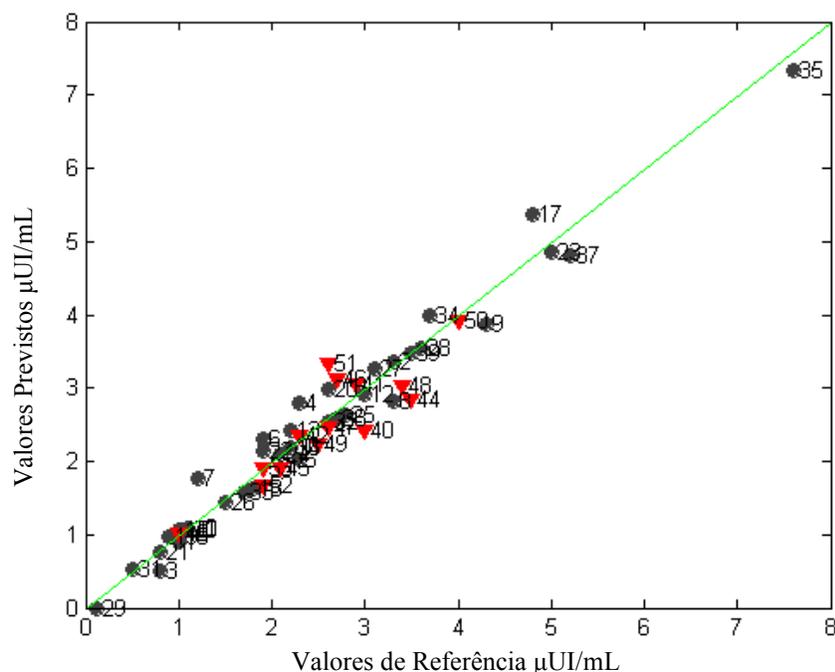


Figura 5.4. Valores de referência contra previstos pelo modelo para determinação de TSH. (●) calibração; (▼) validação.

Os indicadores de exatidão (RMSEC e RMSEP) mostram que os valores das concentrações de TSH estimados pelo modelo de calibração, apresentam boa concordância entre si e também com os valores obtidos pelo método de referência.

Bons resultados foram encontrados para a sensibilidade e sensibilidade analítica dentro da faixa de concentração estudada. O parâmetro sensibilidade analítica é bem simples e mais informativo para comparar e avaliar a sensibilidade do método analítico de interesse, pois o inverso da sensibilidade (sensibilidade analítica) pode ser interpretado de forma mais clara, por sua relação direta com a concentração. Com este parâmetro é possível estabelecer o mínimo da diferença entre os valores de concentrações que podem ser medidas dentro da faixa de concentração utilizada na construção do modelo de calibração. Com base neste resultado, para TSH é possível distinguir diferenças entre as amostras com

diferença de concentração da ordem de $0,12 \mu\text{UI/mL}$. No entanto, este valor é uma estimativa otimista que considera o ruído espectral representando a maior fonte de erro e não leva em conta a falta de ajuste do modelo.

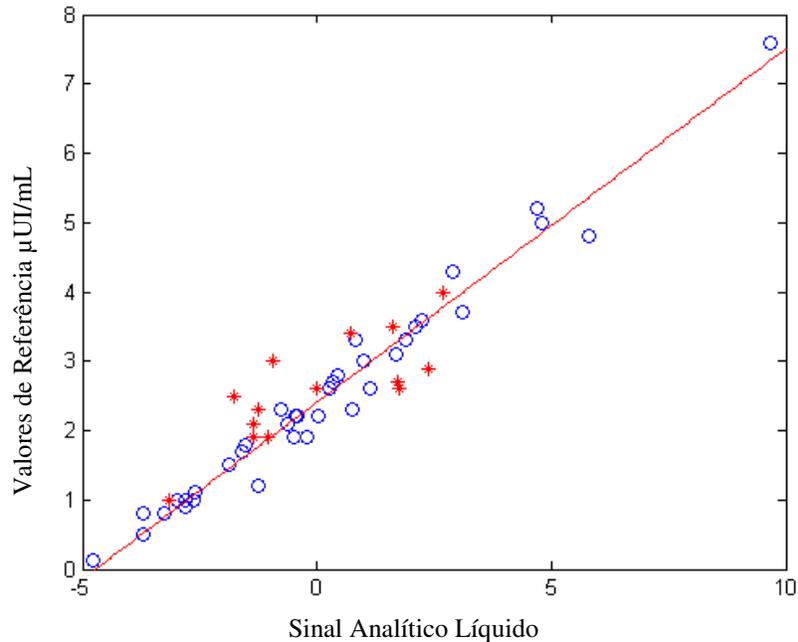


Figura 5.5. Escalar NAS contra as concentrações de Referência, (o) amostras de calibração, (*) amostras de validação.

Os resultados de relação sinal/ruído apresentados na tabela 5.2, mostram o quanto o escalar NAS está acima do desvio padrão da flutuação do sinal instrumental. Os resultados obtidos comprovam que o sinal está muito acima do ruído experimental, apesar de ser uma medida direta do espalhamento. Uma possível explicação para esses resultados é que a estimativa do ruído instrumental (δx) não representa a totalidade do conjunto de dados. Segundo os resultados, a menor razão observada foi $8,38 \times 10^3$, que representa um limite mínimo aceitável para determinações quantitativas. Este resultado sugere que a estimativa LD e LQ apresentados na Tabela 52 podem ser valores otimistas.

Os valores de seletividade que são mostrados na Tabela 5.2 representam a fração média do sinal do espectro da amostra que é utilizado, por não ser ortogonal em relação à propriedade de interesse. Logo, esses valores não se referem à seletividade no seu significado físico, que é em geral empregado em Química Analítica. Eles indicam que apenas 6% do sinal é utilizado durante o cálculo do NAS.

Os limites de detecção e quantificação encontrados sugerem que apenas concentrações acima de 1,24 $\mu\text{UI/mL}$ podem ser quantificadas, o que para as medidas efetuadas é suficiente para indicar problemas com altas quantidades de TSH, uma vez que valores de referência normais para TSH são de 0,50 a 3,50 $\mu\text{UI/mL}$.

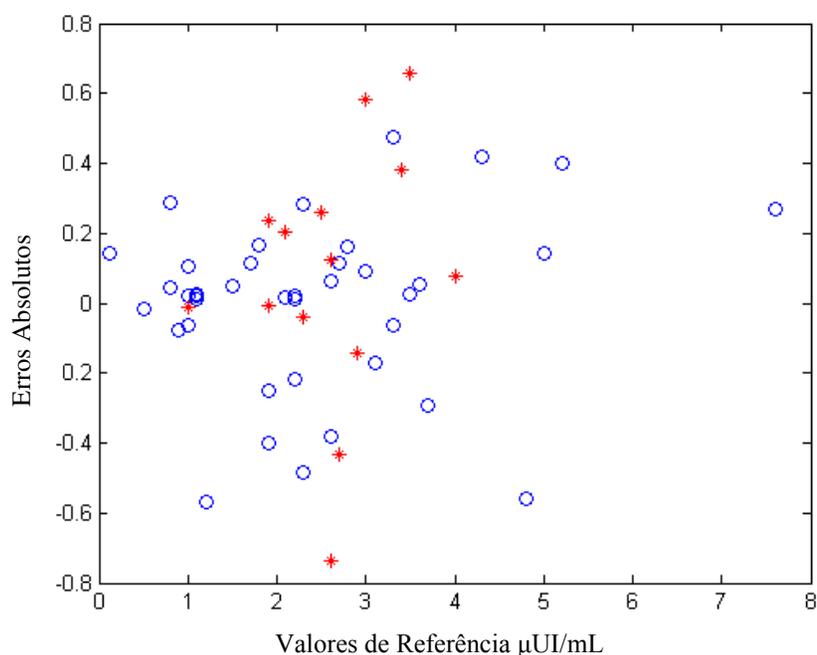


Figura 5.6. Gráfico de erros absolutos contra as concentrações de referência.

CONCLUSÕES

Determinações de pesticidas e TSH foram realizadas por modelos de calibração multivariada baseados em espectroscopia Raman de baixa resolução com amplificação do sinal por superfície. Assim pode-se utilizar um equipamento que tem um custo mais acessível para o desenvolvimento de uma metodologia que pode realizar a detecção de espécies em baixas concentrações. O problema inerente desses equipamentos que é a baixa resolução espectral pode ser contornado com a utilização de métodos quimiométricos de calibração multivariada.

Colóides de ouro foram empregados para a obtenção dos espectros SERS, sendo que não foi possível realizar determinações quantitativas com prata coloidal ou por sol-gel.

Os modelos foram construídos e validados usando amostras representativas cujos resultados foram bastante aceitáveis. Os erros de previsão foram baixos levando em consideração a técnica e a faixa das concentrações utilizadas na construção dos modelos de calibração multivariada.

Os modelos mostraram alta capacidade no parâmetro sensibilidade podendo assim diferenciar amostras com baixa diferença de concentração. Os resultados referentes à exatidão (RMSEC e RMSEP) e outras figuras de mérito, indicam que os modelos desenvolvidos para se determinar pesticidas e também TSH através da espectroscopia Raman amplificada por superfície, podem ser usados como métodos alternativos para monitoramento ambiental e também como método alternativo para exames de rotinas laboratoriais.

O procedimento desenvolvido para a determinação de “traços” de pesticidas é extremamente atraente dada a simplicidade experimental dos métodos envolvidos, a possibilidade de determinações simultâneas de pesticidas de um modo extremamente rápido, além de ter a vantagem de fazer análises *in situ*, vantagem que a técnica cromatográfica ainda não possui.

Para a determinação de TSH o procedimento SERS é também extremamente atraente dada à simplicidade experimental dos métodos envolvidos, os baixos limites de detecção possíveis de serem alcançados, a rapidez do

método para se obter o resultado e principalmente a isenção de reagentes radioativos e não-radioativos para determinação de TSH.

Contudo se desejarmos utilizar, com bastante eficiência, a espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (SERS) para determinação de pesticidas e TSH, devemos inevitavelmente utilizar técnicas de pré-processamentos para tratar os espectros, caso contrário, os erros de calibração e previsão serão elevados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. J. R. Ferraro, K. Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy*, Academic Press, New York, 1994.
2. *Modern Techniques in Raman Spectroscopy*, J. J. Laserna, Ed., Wiley, New York, 1996.
3. O. Sala, *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*, Editora UNESP, São Paulo, 1996.
4. R. L. McCreery, *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*, Wiley-Interscience, New York, 2000.
5. C. Mello, E. Severi, L. Coelho, A. Marangoni, C. Dezuane, E. Ricci, D. M. Ribeiro, R. J. Poppi, *J. Mol. Struct.*, 883-884 (2008) 61.
6. D. Lee, *Appl. Spectrosc.*, 60 (2006) 373.
7. F. Draux, P. Jeannesson, A. Beljebbar, A. Tfayli, N. Fourre, M. Manfait, J. Sule´-Suso, G. D. Sockalingum, *Analyst*, 134 (2009) 542.
8. D. A. Skoog, J. L. Leary, *Principles of Instrumental Analysis*, 4th ed., Saunders, New York, 1992.
9. R. Aroca, *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*, Wiley, New York, 2006.
10. R. L. Garrell, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 401A.
11. G. A. Baker, D. S. Moore, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 1751.
12. S. Lucht, T. Murphy, H. Schmidt, H. -D. Kronfeldt, *J. Raman Spectrosc.*, 31 (2000) 1017.
13. M. Moskovits, *Rev Mod. Phys.*, 57 (1985) 783.
14. B. Pettinger, *In situ Raman Spectroscopy at Metal Electrodes, Adsorption of Molecules at Metal Electrodes*, Ed. J. Lipkowski, P. N. Ross, VCH, 1988.
15. M. Moskovits, *J. Chem. Phys.*, 77(1982) 4408
16. B. n. J. Person, K. Zhao, Z. Zhang, *Phys. Rev. Let.*, 96 (2006) 207401.
17. R.G. Greenler, T.L. Slager, *Spectrochim. Acta A*, 29 (1973) 193.
18. L. Genzel, U. Kreibig, *Z. Physik B*, 37 (1980) 93.

19. N.W. Ashcroft, N.D. Mermin, Solid State Physics, Wiley- Souders College, Philadelphia, 1976.
20. K. Kneipp, M. Moskovits, H. Kneipp, Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications, Springer, New York, 2006.
21. D. L. A. de Faria, M. L. A. Temperini, O. Sala, Quim. Nova, 22 (1999) 541.
22. R. L. Birke, J.R. Lombardi, *Spectroelectrochemistry: Theory and Practice, Chapter 6, Surface-enhanced Raman Scattering, edited by R.J. Gale, Plenum Press, New York, 1988*
23. J. A. Creighton, C.G. Blatchford, M.G. Albrecht, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, II, 75 (1979) 790.
24. M. Otto, Chemometrics, Wiley, Weinheim, 1999.
25. R. G. Brereton, Chemometrics – Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant, Wiley, Chichester, 2003.
26. H. Martens, T. Naes, Multivariate Calibration, Wiley, Chichester, 1989.
27. D. Aguado, A. Ferrer, J. Ferrer, A. Seco, Chemom. Intell. Lab. Syst., 85 (2007) 82.
28. J. Zupan, J. Gasteiger, Neural Networks in Chemistry and Drug Design, 2nd. Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
29. K. Danzer, M. Otto, L. A. Currie, Pure Appl. Chem., 76 (2004) 1215.
30. P. Geladi, B. R. Kowalski, Anal. Chim. Acta, 186 (1986) 1.
31. R. Bracewell, The Fast Fourier Transform and its application, McGraw-Hill, New York, 1965.
32. P. Geladi, D. MacDougall, H. Martens, Appl. Spectrosc. 39 (1985) 491.
33. T. Isaksson and T. Næs, Appl. Spectrosc. 42 (1988) 1273.
34. R. J. Barnes, M. S. Dhanoa and S. J. Lister, Appl. Spectrosc. 43 (1989) 772.
35. M. A. R. da Fonseca, Álgebra linear aplicada, Manole, Baruer, 2003.
36. N.R. Draper and H. Smith, *Applied regression analysis, 2nd. edition*, John Wiley, New York, 1981.
37. E. Bouveresse, C. Casolino, D. L. Massart, Appl. Spectrosc. 52 (1998) 604.

38. K. R. Beebe, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* , 59 (1987) 17.
39. K. S. Booksh, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A.
40. A. Howard, C. Rorres, *Álgebra Linear com Aplicações*, 8ª. Ed. Bookman, Porto Alegre, 2001.
41. Eurachem/Citac – Work Group, *Guide for Quality in Analytical Chemistry – An aid to accreditation*, 2nd. Ed., 2002.
42. International Conference on Harmonization, ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of Analytical Procedures: Methodology, Fed. Regist. 62 (1997) 27463.
43. International Conference on Harmonization, ICH Harmonized Tripartite Guideline – Text on Validation of Analytical Procedures, Fed. Regist. 60 (1995) 11260.
44. *Annual Book of ASTM Standards, Standards Practices for Infrared, Multivariate, Quantitative Analysis, E1655*, vol. 03.06, ASTM International, West Conshohocken, 2000.
45. J. W. B. Braga, R. J. Poppi, *Quim. Nova*, 27 (2004) 1004.
46. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Guia para a Validação de Métodos analíticos e bioanalíticos*. Resol. 899, 2003
47. J. W. B. Braga, R. J. Poppi, *J. Pharm. Sci.*, 93 (2004) 2124.
48. G. Ragno, G. Ioele, A. Risoli, *Anal. Chim. Acta*, 512 (2004) 173.
49. A. C. Moffat, A. D. Trafford, R. D. Jee, P. Graham, *Analyst* 125 (2000) 1341.
50. H. C. Goicoechea, A. C. Olivieri, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 56 (2001) 73.
51. A. Lorber, K. Faber, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1620.
52. N. J. Messik, J. H. Kalivas, P. M. Lang, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1572.
53. M. Laasonen, T. H. Pulkkinen, C. Simard, M. Rasanen, H. Vuorela, *Anal. Chem.* 75 (2003) 754.
54. N. M. Faber, *J. Chemom.* 12 (1998) 405.
55. A. Lorber, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1167.

56. J. Ferré, S. D. Brown, F. X. Rius, *J. Chemom* 15 (2000) 537.
57. L. C. Rodriguez, A. M. G. Campanã, C. J. Linares, M. R. Ceba, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1243.
58. N. M. Faber, *Anal. Chem.* 70 (1998) 5108.
59. J. Vessman, R. I. Stefan, J. F. van Staden, K. Danzer, W. Linder, D. T. Burns, A. Fajgelj, H. Muller, *Pure Appl. Chem.*, 73 (2001) 1381.
60. P. C. Lee, D. Meisel, *J. Phys. Chem.* 86 (1982) 3391.
61. A. C. Sant'Ana, P. Corio, M. L. A. Temperini, *Quim. Nova*, 29 (2006) 805.
62. H. de Santana, D. A. M. Zaia, P. Corio, F. El Haber, G. Louarn, *Quim. Nova*, 29 (2006) 194.
63. *CRC Analysis of Pesticides in Water*, Vol. 1, Ed. S. Y. Alfred, B. K. Afghan, CRC Press, Boca Raton, 1982.
64. C. Bolognesi, G. Morasso, *Trends Food Sci. Technol.* 11 (2000) 182.
65. M. Younes, H. Galal-Gorchev, *Food Chem. Toxicol.* 38 (2000) 587.
66. EEC Drinking Water Guideline 80/779/EEC, EEC No. L229 (1980) 11.
67. <http://www.terrazul.m2014.net/spip.php?breve167> – acessado em maio de 2008.
68. <http://www.abcbirds.org/abcprograms/policy/pesticides/Profiles/endosulfan.html> - acessado em maio de 2008.
69. F. C. Silva, Z. L. Cardeal, C. R. de Carvalho, *Quim. Nova* 22(1999) 197.
70. D. Tsikas, *J. Chromatogr B – Biomed. Sci. Appl.*, 717 (1998) 201.
71. F. J. Arrebola, J. L. Martínez Vidal, Fernández-Gutiérrez A., *J Chromatogr Sci.* 39 (2001) 177.
72. M.W.Schmidt, K.K.Baldrige, J.A.Boatz, S.T.Elbert, M.S.Gordon, J.H.Jensen, S.Koseki, N.Matsunaga, K.A.Nguyen, S.Su, T.L.Windus, M.Dupuis, J.A.Montgomery, *J. Comput. Chem.*,14 (1993) 1347.
73. M.S.Gordon, M.W.Schmidt, *Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later*, in *Theory and Applications of Computational Chemistry: the first*

forty years, Ed. C.E.Dykstra, G.Frenking, K.S.Kim, G.E.Scuseria Elsevier, Amsterdam, 2005.

74. B.M. Wise, N. B. Gallagher, R. Bro, J. M. Shaver, W. Windig, R. S. Koch, R.S., PLS Toolbox 3.5 for use with Matlab™, Eigenvector Research Inc., Manson (2005).

75. R.W. Kennard and L.A. Stone, *Technometrics* 11 (1969) 137.

76. M. T. Nunes, M. T. Arq. Bras. Endocrinol. Metab., 47, (2003) 639.

77. G. H. Toniollo, W. R. R. Vicente, C. A. Oliveira, E. B. Malheiros, M. B. Carvalho, M. B., *Braz. Vet. Res. Anim. Sci.*, 35 (1998) 210.

78. Novis, M.; Vaisman, M.; Coelho, H. S. M. *Arq. Gastroenterol.*, 38 (2001) 254.

79. L. S. Ward, R. M. B. Maciel, *Rev. Ass. Med. Brasil*, 43 (1997) 114.

80. R. H. Burdon, P. H. Knippenberg, T. Chard, *Laboratory Technique in Biochemistry and Molecular Biology – An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques*, 3th. Ed, McGraw-Hill, New York, 1995.

81. Spencer CA, LoPresti JS, Patel A, Guttler RB, Eigen A, Shen D, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70 (1990) 453.