

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

Cassiano Batestin Costa

**Análise multivariada aplicada a espectroscopia Raman e absorção óptica em fraude de
leite caprino e efeito SERS em leite bovino**

Juiz de Fora

2021

Cassiano Batesttin Costa

Análise multivariada aplicada a espectroscopia Raman e absorção óptica em fraude de leite caprino e efeito SERS em leite bovino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Física.

Orientador: Prof. Virgílio de Carvalho dos Anjos

Juiz de Fora

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Costa, Cassiano Batesttin.

Análise multivariada aplicada a espectroscopia Raman e absorção óptica em fraude de leite caprino e efeito SERS em leite bovino / Cassiano Batesttin Costa. -- 2021.

109 f.

Orientador: Virgílio de Carvalho dos Anjos

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física, 2021.

1. Espectroscopia Raman. 2. SERS. 3. Análise multivariada. 4. Fraude em leite. I. Anjos, Virgílio de Carvalho dos, orient. II. Título.

Cassiano Batesttin Costa

"Análise multivariada aplicada a espectroscopia Raman e absorção óptica em fraude de leite caprino e efeito SERS em leite bovino".

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Doutor em Física. Área de Concentração: Física.

Aprovada em 25 de junho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

JCAmjs

Prof. Dr. Virgilio de Carvalho dos Anjos - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

JCAmjs

Prof. Dr. Ricardo Schneider
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

JCAmjs

Prof. Dr. Roney Alves da Rocha
Universidade Federal de Lavras

JCAmjs

Prof.^a Dr.^a Maria Jose Valenzuela Bell
Universidade Federal de Juiz de Fora

JCAmjs

Prof.^a Dr.^a Zélia Maria Da Costa Ludwig
Universidade Federal de Juiz de Fora

JCAmjs

Prof.^a Dr.^a Fabíola Fonseca Ângelo
Universidade Federal de Juiz de Fora

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por mais esta etapa concluída na minha vida.

Agradeço aos meus pais, Creuzimar e José, pelo amor e apoio que sempre me deram. A minha irmã Josylainne e ao Diego pelo incentivo. Aos meus queridos sobrinhos Calebe, Miguel e Raquel, pelo carinho e brincadeiras.

Agradeço ao meu grande amigo Sérgio, que sempre esteve me apoiando.

Agradeço a Geissy e a Isis, que estiveram presentes e me ajudaram durante toda essa etapa.

Agradeço ao professor Virgílio pela oportunidade, orientação e ensinamentos, os quais me ajudaram a concluir esta etapa. Agradeço a professora Maria José pela oportunidade e conselhos. Também agradeço aos amigos do Grupo de Espectroscopia e Engenharia de Materiais (GE2M) da UFJF.

Agradeço aos amigos e professores da UFJF, que participaram dessa conquista. Ao secretário Domingos por todo auxílio.

Agradeço aos órgãos de pesquisa CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

RESUMO

Devido ao importante valor nutricional e econômico que os leites bovinos e caprinos possuem, estes são constantemente alvos de fraudes. No presente trabalho foram desenvolvidos dois estudos. No primeiro estudo foi realizada a caracterização dos componentes presentes nos leites bovino e caprino através da espectroscopia vibracional Raman e de infravermelho (MIR e NIR). Em seguida, buscou-se avaliar o uso das técnicas de análise multivariadas, como a Análise de Componentes Principais (PCA) e de regressão por Mínimo Quadrados Parciais (PLS), associadas as técnicas de espectroscopia vibracional como métodos alternativos de detecção de fraude no leite caprino cru adulterado com a adição de leite bovino cru. Os modelos de PCA gerados com os dados de espectroscopia Raman e MIR apresentaram resultados satisfatórios na discriminação das amostras de 90-100% de leite caprino, as quais foram adulteradas com passos de 2% de leite bovino. Nas análises de PLS realizadas nas amostras com 60-100% de leite caprino e adulteradas com passos de 2% de leite bovino, as curvas de calibração foram obtidas com valor de $R^2 \geq 0,995$. No segundo estudo realizado, buscou-se obter à amplificação de sinal Raman do leite bovino pasteurizado utilizando substratos SERS (*Surface-enhanced Raman spectroscopy*) ativos. Nesse estudo os substratos SERS utilizados foram produzidos em matrizes vítreas de borofosfato contendo determinadas concentrações de nitrato de prata (AgNO_3) como agente precursor. As nanoestruturas metálicas de prata foram crescidas na superfície dos substratos SERS através do método *bottom-up*, com atmosfera de hidrogênio controlada e tempos de 1, 3, 5, 8 e 11 minutos de tratamento de recozimento térmico na temperatura de 300 °C. Utilizando um *laser* com linha em 488nm, todos os substratos SERS ativos mostraram atividade SERS e amplificaram o sinal Raman do leite bovino pasteurizado. Destacam-se os substratos SERS dopados com 1% e 6% de íons de prata com tempo de recozimento de 3 e 11 minutos, que apresentaram fatores de eficiência SERS de 9,1 e 16,2 respectivamente.

Palavras-chave: Leite bovino cru, Leite caprino cru, Leite bovino pasteurizado, Espectroscopia Raman, Espectroscopia de Infravermelho, SERS, PCA e PLS.

ABSTRACT

Due to the important nutritional and economic value of bovine and caprine milks, they are constant targets of fraud. In the present work, two studies were developed. The first study characterizes the components present in bovine and caprine milks through Raman and infrared vibrational spectroscopy (MIR and NIR). Then, it was sought the evaluation of chemometric techniques Principal Component Analysis (PCA) and regression by partial least squares (PLS), associated with vibrational spectroscopy techniques as alternative methods of tampering detecting in adulterated raw caprine milk with the addition of raw bovine milk. The PCA models generated with Raman and MIR spectra showed satisfactory results in discrimination samples of 90-100% goat milk, adulterated with steps of 2% bovine milk. In the PLS analysis of the samples with 60-100% goat milk, adulterated with steps of 2% bovine milk, the calibration curves were obtained with a value of $R^2 \geq 0.995$. In the second study, was sought to obtain the amplification of the Raman signal of pasteurized bovine milk using SERS active substrates. In this study, the SERS substrates were produced in borophosphate glass matrices containing determined concentrations of silver nitrate (AgNO_3) as a precursor agent. The metallic silver nanostructures were grown on the surface of the SERS substrates using the bottom-up method, with a controlled hydrogen atmosphere and times of 1, 3, 5, 8 and 11 minutes of annealing heat treatment at 300 °C. Using a 488 nm laser line, all active SERS substrates showed SERS activity and amplified the Raman signal from pasteurized bovine milk. It is noteworthy the SERS substrates doped with 1% and 6% silver ions and annealing time of 3 and 11 minutes, which presented SERS efficiency factors of 9.1 and 16.2 respectively.

Keywords: Raw bovine milk, Raw goat milk, Pasteurized bovine milk, Raman spectroscopy, Infrared Spectroscopy, SERS, PCA and PLS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação da estrutura química da α - e β -lactose. Fonte:(ALMEIDA, 2011)	16
Figura 2 - Representação da reação de formação do triglicerídeo a partir de três ácidos graxos e um glicerol. Fonte: Adaptada de (SENIHA GÜNER; YAĞCI; TUNCER ERCIYES, 2006).....	17
Figura 3 - Representação das regiões do espectro eletromagnético. Em destaque, subdivisões das regiões do infravermelho. Fonte: (MENDES, 2018)	21
Figura 4 - Modos vibracionais de uma molécula. Os sinais “+” e “-”, significam saindo e entrando no plano, respectivamente. Fonte: Elaborado pelo autor (2020).....	24
Figura 5 - Representação do fenômeno de interferência da luz. (a) Dois feixes de luz emergindo de uma fonte, passando por diferentes caminhos e se recombinado em um ponto “P”. (b) Representação de um interferograma. Fonte: Adaptadas de (a) (MENDES, 2015) e (b) (ZILIO, 2009).	25
Figura 6 - Representação dos principais componentes internos de um espectrômetro FTIR. Fonte: Adaptada de (PERKINS, 1986).	28
Figura 7 - Representação dos processos de espalhamento de luz em um material. a) Espalhamento Rayleigh, b) Espalhamento Raman Stokes, c) espalhamento Raman anti-Stokes. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).....	31
Figura 8 - Representação da ressonância de plasmon de superfície localizado. Fonte: adaptado de (CHEN et al., 2014).....	33
Figura 9 - Diagrama de energia ilustrando a banda de energia de nanoestruturas metálicas e os orbitais HOMO e LUMO das moléculas adsorvidas. ϕ é a função trabalho do metal e IP é o potencial de ionização do adsorbato. Fonte: adaptado de (AROCA, 2006). ...	35
Figura 10 - (a) Superfícies formadas por cadeias de semicilindros de prata espaçados por uma distância, d , sobre uma placa de prata de espessura, $l = 2R$. Resultados teóricos do efeito SERS, quando a cadeia de semicilindros tem (b) $d \geq 2R$ e (c) $d \leq 2R$. Fonte: (GARCÍA-VIDAL; PENDRY, 1996).	36
Figura 11 - Representação da organização dos dados em métodos de análise exploratória. Fonte: (GONTIJO, 2016)	38

Figura 12 - Representação gráfica da decomposição da matriz X no modelo PCA, sendo X é a matriz de dados com n linhas (amostras) por m colunas (números de onda), T é a matriz de <i>scores</i> , P é a matriz de <i>loadings</i> e E é a matriz de resíduos. Fonte: Elaborado pelo autor (2021)	39
Figura 13 - Gráfico representativo de um conjunto de dados bidimensionais alinhado aos eixos das componentes principais (PC1 e PC2). Fonte: (FERREIRA et al., 1999).....	41
Figura 14 - Representação gráfica da decomposição das matrizes de X e Y em variáveis latentes para o modelo de regressão por PLS. Fonte: Adaptada de (BRERETON, 2007).	42
Figura 15 - Representação esquemática do processo <i>bottom-up</i> . (a) Matriz vítrea dopada com íons de metais de transição. (b) Os íons de metais de transição migram para a superfície da matriz vítrea com o tratamento térmico, sendo reduzidos a um estado metálico sob atmosfera de hidrogênio. Fonte: adaptado de (PEREIRA et al., 2016).....	50
Figura 16 - Comparação do aumento de massa (absorção de água) de vidros contendo diferentes concentrações de Al_2O_3 em função do tempo de exposição a uma umidade relativa do ar de 75%. Fonte: (PEREIRA, 2016)	51
Figura 17 - Espectrômetro de infravermelho médio por transformada de Fourier (FT-MIR) da Bruker, modelo VERTEX 70. Fonte: (BRUKER, [s.d.].....	52
Figura 18 - Representação dos principais componentes internos de um espectrômetro de FTIR. Fonte: Adaptado de (BRUKER, [s.d.].....	53
Figura 19 - Espectrômetro de infravermelho próximo por transformada de Fourier (FT-NIR) da Bruker, modelo MPA.	54
Figura 20 - Representação do espectrômetro Raman T64000 da Horiba Jobin Yvon. Fonte: (RODRIGUES, 2016).	55
Figura 21 - Representação da configuração interna do equipamento Raman T64000. (a) Caminho óptico entre as fendas de entrada e saída do feixe, e a separação dos comprimentos devido a rotação da grade de difusão. (b) Equação fundamental que determina a rotação da grade de difração e o comprimento de onda de saída. (c) Caminho óptico na configuração triplo subtrativo (d) Radiação incidente na CCD é associada a uma faixa espectral. Fonte: (RODRIGUES, 2016).....	56
Figura 22 - Representação do sistema microRaman confocal. (a) Funcionamento da objetiva e limitações da luz incidente e espalhada gerada pelos <i>pinholes</i> . Em detalhe, ilustração da área focada e perfil gaussiano do <i>laser</i> . (b) Comportamento da luz espalhada em função da superfície e da profundidade da amostra analisada. Fonte: (RODRIGUES, 2016).....	57

- Figura 23 - Comparação dos espectros Raman das amostras de leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%). Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 60
- Figura 24 - Comparação dos resultados da primeira derivada dos espectros Raman do leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%). (a) região de 700–3100 cm^{-1} e (b) região de 1000–1600 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 62
- Figura 25 - Comparação dos espectros de infravermelho médio (MIR) das amostras de leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%). Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 63
- Figura 26 - Comparação dos resultados da primeira derivada dos espectros FT-MIR do leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%), referente a região de 3010–500 cm^{-1} . Em detalhe, região de 3000–2780 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 64
- Figura 27 - Comparação dos espectros de infravermelho próximo (NIR) das amostras de leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%). Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 65
- Figura 28 - Comparação dos resultados da primeira derivada dos espectros Raman do leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%), região de 9000–4000 cm^{-1} . Em detalhe, região de (a) 5600–5100 cm^{-1} e (b) 7500–6800 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 66
- Figura 29 - Gráfico de *scores* da PC1 *versus* PC2 referente as amostras de leite do **lote 1** e construído com os dados da primeira derivada dos espectros Raman, região de 700–1800 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 68
- Figura 30 - Gráfico de pesos da PC1 *versus* deslocamento Raman. Resultado referente a PCA das amostras de leite do **lote 1**, construída com os dados da primeira derivada dos espectros Raman. Em detalhe, as regiões com maior contribuição no modelo, sendo: 1090-1200 cm^{-1} , 1400-1500 cm^{-1} e 1525-1570 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 69
- Figura 31 - Gráfico de *scores* da PC1 *versus* PC2 referente as amostras de leite do **lote 2** e construído com os dados da primeira derivada dos espectros Raman, região de 750–1750 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 70
- Figura 32 - Gráfico de pesos da PC1 *versus* deslocamento Raman. Dados referentes a PCA das amostras de leite do **lote 2**, construída com os dados da primeira derivada dos espectros Raman. Em detalhe, as regiões com maior contribuição no modelo, sendo: 1090-1200 cm^{-1} , 1250-1350 cm^{-1} e 1400-1500 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 71

Figura 33 - Gráfico de <i>scores</i> da PC1 <i>versus</i> PC2 referente as amostras de leite do lote 2 e construído com os dados da primeira derivada dos espectros MIR, região de 3676-1000 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).....	72
Figura 34 - Gráfico de pesos da CP1 <i>versus</i> o número de onda. Dados referentes a PCA das amostras de leite do lote 2 , construída com os dados da primeira derivada dos espectros MIR. Em detalhe, a região de maior contribuição no modelo, sendo 3676-1000 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).....	73
Figura 35 - Gráfico de <i>scores</i> da PC1 <i>versus</i> PC2, referente a amostra de leite do lote 2 , construído com os dados da primeira derivada dos espectros NIR, região de 9000–4500 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	74
Figura 36 - Gráfico de <i>loadings</i> da CP1 <i>versus</i> o número de onda. Dados referentes a PCA das amostras de leite do lote 2 , construída com os dados da primeira derivada dos espectros NIR. Em detalhe, as regiões de maior contribuição no modelo, sendo: 7450-6900 cm^{-1} e 5600-5100 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	75
Figura 37 - Resultados de PLS obtidos com os espectros Raman das amostras do lote 1 . (a) Valor predito <i>versus</i> valor da referência (% de leite caprino). (b) Gráfico de resíduo da calibração <i>versus</i> valor predito (% de leite caprino). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	76
Figura 38 - Resultados de PLS obtidos com os espectros Raman das amostras do lote 2 . (a) Valor predito <i>versus</i> valor da referência (% de leite caprino). (b) Gráfico de resíduo da calibração <i>versus</i> valor predito (% de leite caprino). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	77
Figura 39 - Resultados de PLS obtidos com os espectros MIR das amostras do lote 2 . (a) Valor predito <i>versus</i> valor da referência (% de leite caprino). (b) Gráfico de resíduo da calibração <i>versus</i> valor predito (% de leite caprino). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	78
Figura 40 - Resultados de PLS obtidos com os espectros NIR das amostras do lote2 . (a) Valor predito <i>versus</i> valor da referência (% de leite caprino). (b) Gráfico de resíduo da calibração <i>versus</i> valor predito (% de leite caprino). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	79
Figura 41 - Espectros de absorção UV-Vis dos substratos vítreos dopados com 1% de íons de prata (Ag) e produzidos com tratamento térmico de recozimento à 300 °C durante 0, 1, 3, 5, 8 e 11 minutos. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	81

Figura 42 - Espectros de absorção UV-Vis dos substratos vítreos dopados com 1% (-), 3% (-) e 6% (-) de íons de prata (Ag), tratamento térmico de recozimento à 300 °C durante 1 minuto. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	82
Figura 43 - Espectro Raman do leite bovino pasteurizado do tipo A. Região de (a) 750-1350 cm ⁻¹ , (b) 1250-1800 cm ⁻¹ e (c) 2600-3100 cm ⁻¹ . Em detalhe, (a) região de 1100-1200 cm ⁻¹ e (b) região de 1500-1600 cm ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).....	83
Figura 44 - Comparação do espectro Raman do leite bovino pasteurizado com os espectros SERS de leite bovino pasteurizado depositado nos substratos do lote de 1%Ag300. Região de (a) 750-1350 cm ⁻¹ , (b) 1250-1800 cm ⁻¹ e (c) 2600-3100 cm ⁻¹ . (d) Fator de eficiência SERS <i>versus</i> deslocamento Raman. Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 84	
Figura 45 - Comparação do espectro Raman do leite bovino pasteurizado com os espectros SERS de leite bovino pasteurizado depositado nos substratos do lote de 3%Ag300. Região de (a) 750-1350 cm ⁻¹ , (b) 1250-1800 cm ⁻¹ e (c) 2600-3100 cm ⁻¹ . (d) Fator de eficiência SERS <i>versus</i> deslocamento Raman. Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 86	
Figura 46 - Comparação do espectro Raman do leite bovino pasteurizado com os espectros SERS de leite bovino pasteurizado depositado nos substratos do lote de 6%Ag300. Região de (a) 750-1350 cm ⁻¹ , (b) 1250-1800 cm ⁻¹ e (c) 2600-3100 cm ⁻¹ . (d) Fator de eficiência SERS <i>versus</i> deslocamento Raman. Fonte: Elaborado pelo autor (2021). 87	
Figura 47 - Comparação do espectro Raman do leite bovino pasteurizado (—) com os espectros SERS do leite bovino pasteurizado depositados nos substratos de 1%Ag300-3 (—), 3%Ag300-11 (—) e 6%Ag300-11 (—). Região de (a) 750-1350 cm ⁻¹ , (b) 1250-1800 cm ⁻¹ e (c) 2600-3100 cm ⁻¹ . (d) Fator de eficiência SERS <i>versus</i> deslocamento Raman. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	88
Figura 48 - Comparação dos espectros Raman das amostras do lote 1 . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	101
Figura 49 - Comparação dos resultados de primeira derivada dos espectros Raman das amostras do lote 1 . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	101
Figura 50 - Comparação dos espectros Raman das amostras do lote 2 . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	102
Figura 51 - Comparação dos resultados de primeira derivada dos espectros Raman das amostras do lote 2 . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	102
Figura 52 - Comparação dos espectros MIR das amostras do lote 2 . Em detalhe, região de 3100–2750 cm ⁻¹ . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	103

Figura 53 - Comparação dos resultados de primeira derivada dos espectros MIR das amostras do lote 2 . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	103
Figura 54 - Comparação dos espectros NIR das amostras do lote 2. Em detalhe, região de 7700–7200 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	104
Figura 55 - Comparação dos resultados de primeira derivada dos espectros NIR das amostras do lote 2 . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química dos leites crus de origem bovina e caprina.	15
Tabela 2 - Principais sais minerais presentes nos leites bovino e caprino.	18
Tabela 3 - Porcentagem de adulteração do leite caprino cru (LC) com a adição de leite bovino cru (LB).	47
Tabela 4 - Informações nutricionais do leite bovino pasteurizado tipo A da marca Marvin. ..	48
Tabela 5: Descrição dos substratos vítreos de borofosfatos dopados com prata (Ag).	49
Tabela 6 - Classificação dos grupos funcionais e modos vibracionais observados nos espectros Raman das amostras de leite bovino e caprino.....	59
Tabela 7 - Informações dos número de amostras usado em cada modelo de PLS e os valores obtidos de: coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro quadrático médio de calibração (RMSEC), raiz do erro quadrático médio de predição (RMSEP) e erro relativo percentual (RE.(%)).	79
Tabela 8 - Fator de eficiência (<i>EF</i>) SERS obtidos utilizando o lote de substratos de 1%Ag300.	85
Tabela 9 - Fator de eficiência (<i>EF</i>) SERS obtidos utilizando o lote de substratos de 3%Ag300.	86
Tabela 10 - Fator de eficiência (<i>EF</i>) SERS obtidos utilizando o lote de substratos de 6%Ag300.	87

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AgNPs	Nanopartículas esféricas de prata
CCD	Dispositivo de carga acoplada (<i>Charge coupled device</i>)
CLS	Clássico de Mínimos Quadrados (<i>Classical Least Squares</i>).
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
DF	Divisor de feixe (<i>Beamsplitter</i>)
EF	Fator de eficiência
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (<i>Food and Agriculture Organization</i>)
FT-MIR	Espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Medium Infrared Spectroscopy</i>)
FT-NIR	Espectroscopia no infravermelho próximo por transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Near Infrared Spectroscopy</i>)
IN	Instruções Normativas
<i>Laser</i>	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LB	Leite bovino
LC	Leite caprino
LSPR	Ressonância de plasmons de superfície localizada (<i>Localized surface plasmon resonance</i>)
MRL	Regressão Linear Múltipla (<i>Multiple Linear Regression</i>)
NIPALS	Mínimos quadrados parciais iterativos não lineares (<i>Non-linear Iterative Partial Least Squares</i>)
PC	Componente principal
PCA	Análise de Componentes Principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
PLS	Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Squares</i>)
RMSE	Raiz do erro quadrático médio (<i>Root mean square error</i>)
RMSEC	Raiz do erro quadrático médio de calibração
RMSEP	Raiz do erro quadrático médio de predição
SERS	Espectroscopia Raman amplificada por superfície (<i>Surface-Enhanced Raman Spectroscopy</i>)
SPR	Ressonância de plasmon superficiais
SVD	Decomposição em valores singulares (<i>Single Value Decomposition</i>)

UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
VBP	Valor Bruto da Produção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Composição dos leites bovino e caprino	14
1.2	Leite bovino pasteurizado	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Espectroscopia	20
2.1.1	RADIAÇÃO DE INFRAVERMELHO	20
2.1.2	PRINCÍPIOS DA ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	21
2.2	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	24
2.2.1	INTERFERÊNCIA	25
2.2.2	INTERFERÔMETRO DE MICHELSON	27
2.3	Espectroscopia Raman	29
2.4	Espalhamento Raman amplificado por superfície (SERS)	31
2.4.1	MODELO ELETROMAGNÉTICO DE SERS	32
2.4.2	MODELO QUÍMICO DE SERS	34
2.4.3	EFEITO DA INTERAÇÃO DE UM CONJUNTO DE NANOESTRUTURAS	35
2.5	Análise multivariada	36
2.5.1	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	38
2.5.2	REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)	41
2.5.3	NORMALIZAÇÃO	43
3	OBJETIVOS	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Amostras cruas de leite bovino e leite caprino	46
4.2	Substratos SERS ativos utilizados no estudo do efeito SERS em leite bovino pasteurizado	48
4.2.1	PRODUÇÃO DOS SUBSTRATOS VÍTREOS	49
4.3	Espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier	52
4.3.1	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO E PRÓXIMO	52
4.3.2	ESPECTRÔMETRO RAMAN	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
5.1	Caracterização da composição das amostras de leite bovino e caprino	58
5.1.1	CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN	58
5.1.2	CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA MIR	62

5.1.3	CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NIR.....	65
5.2	Identificação da fraude no leite caprino cru por adição de leite bovino cru.....	67
5.2.1	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	67
5.2.2	REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)	75
5.3	Estudo do efeito de SERS em leite bovino pasteurizado.....	80
5.3.1	EFEITO SERS COM SUBSTRATOS DE 1%AG300.....	84
5.3.2	EFEITO SERS COM SUBSTRATOS DE 3%AG300.....	85
5.3.3	EFEITO SERS COM SUBSTRATOS DE 6%AG300.....	87
5.3.4	COMPARAÇÃO DO EFEITO SERS DOS LOTES DE 1%, 3% E 6% DE AG.....	88
6	CONCLUSÕES.....	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
	APÊNDICE A – ESPECTROS RAMAN DAS AMOSTRAS DE LEITE DO LOTE 1 E	
	ESPECTROS DE PRIMEIRA DERIVADA.....	101
	APÊNDICE B – ESPECTROS RAMAN DAS AMOSTRAS DE LEITE DO LOTE 2 E	
	ESPECTROS DE PRIMEIRA DERIVADA.....	102
	APÊNDICE C – ESPECTROS MIR DAS AMOSTRAS DE LEITE DO LOTE 2 E	
	ESPECTROS DE PRIMEIRA DERIVADA.....	103
	APÊNDICE D – ESPECTROS NIR DAS AMOSTRAS DE LEITE DO LOTE 2 E	
	ESPECTROS DE PRIMEIRA DERIVADA.....	104

1 INTRODUÇÃO

O leite bovino e seus derivados são alimentos de grande valor nutricional, já que são fontes de proteína de alto valor biológico, além de conter em sua composição grandes variedades de vitaminas e minerais (FOX et al., 2015; MUNIZ; MADRUGA; ARAÚJO, 2013). Estudos buscam comprovar que o consumo diário do leite além de ser importante na infância dos seres humanos, também é recomendado na fase adulta, auxiliando na prevenção do sobrepeso, obesidade (MORENO et al., 2015), diabetes (AUNE et al., 2013; ELWOOD et al., 2008), osteoporose (WEAVER, 2014), doenças cardiovasculares, além de trazer outros benefícios a saúde (MARANGONI et al., 2019).

Outro importante fator relacionado ao leite bovino é sua importância econômica. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês, *Food and Agriculture Organization*), em 2016 a produção mundial de leite bovino foi de 659,2 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2019). Nesse mesmo ano o Brasil foi o terceiro maior produtor de leite bovino, com uma produção em torno de 33,5 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2019). Nos anos seguintes, 2017 a 2019, a produção de leite bovino no Brasil se manteve acima de 33 milhões de toneladas por ano (PILA, 2019). O volume de leite bovino produzido no Brasil o torna um dos produtos mais importantes do setor da agropecuária brasileira (SILVA et al., 2017). Segundo dados da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), em 2019 o Valor Bruto da Produção (VBP) arrecadado com a produção e venda de leite bovino foi de R\$ 52,5 milhões (CNA, 2020a, 2020b).

O leite caprino é outro importante tipo de leite e o seu consumo tem aumentado nos últimos anos. Consequentemente, também tem aumentado o número de pesquisas relacionadas ao estudo da composição do leite caprino e dos benefícios de seu consumo (BOYAZOGLU; MORAND-FEHR, 2001; PAZ et al., 2014; RONALD ROSS WATSON, ROBERT J COLLIER, 2017). O aumento do consumo do leite caprino está associado ao fato desse leite apresentar funções nutricionais semelhante ao do leite bovino, porém com menores porcentagens de colesterol e lactose em sua composição, além de possuir um perfil de proteínas de alta digestibilidade, resultando em menos casos de alergia e intolerância (CATUNDA et al., 2016; FOX et al., 2015; TURCK, 2013). Porém, a produção mundial de leite caprino em comparação com a de leite bovino ainda é pequena, cerca de 19,89 milhões de toneladas leite no ano de 2019 (FAO, 2020).

Devido à importância econômica e nutricional do leite e de seus derivados, esses produtos são constantemente alvos de fraudes. Entre as fraudes mais comuns destaca-se a

diluição de um leite cru de boa qualidade com a adição de água ou de outro leite de qualidade inferior. Também podem ocorrer fraudes adicionando componentes, como o peróxido de hidrogênio, amido, formol, cloretos e sacarose na composição do leite cru ou de seus derivados (ABRANTES; CAMPÊLO; SILVA, 2014; FOX et al., 2015).

Nos últimos anos, as técnicas de espectroscopia Raman e espectroscopia de absorção no infravermelho têm sido cada vez mais utilizadas para analisar os componentes presentes nos diferentes tipos de leites e de seus derivados (SALEEM; AMIN; IRFAN, 2020; ULLAH et al., 2017), já que são técnicas de rápida análise, não destrutiva e de baixo custo, quando essas são comparadas, por exemplo, a técnicas de cromatografia ou de eletroforese (ALABURDA et al., 2007; SAUER-LEAL; OKADA; PERALTA-ZAMORA, 2008). Em conjunto com as espectroscopias vibracionais, o uso de métodos de análise multivariada como a análise de componentes principais (PCA) e a regressão por mínimo quadrados parciais (PLS) tem se tornado cada vez mais frequente, pois esses métodos permitem explorar regiões espectrais mais significativas, fornecendo resultados quantitativos e qualitativos mais precisos (EL-ABASSY et al., 2011; GELADI, 2003).

De modo geral, o fornecimento de produtos alimentícios seguros, uniformes e com qualidade, deve seguir um sistema rigoroso de controle de qualidade e atender aos critérios específicos dos respectivos órgãos de fiscalização (SAUER-LEAL; OKADA; PERALTA-ZAMORA, 2008). Portanto, é necessário o constante desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos analíticos eficientes, rápidos e precisos, que permitam verificar a qualidade dos produtos alimentícios (SAUER-LEAL; OKADA; PERALTA-ZAMORA, 2008).

Esta tese tem como um dos objetivos utilizar as técnicas de espectroscopias vibracionais NIR, MIR e Raman, na caracterização dos grupos funcionais presentes nos leites bovino e caprino. Além disso, usar os dados de espectroscopia em conjunto com as técnicas de análise multivariada de PCA e de PLS, para detectar a existência de fraude em amostras de leite caprino cru adulteradas com a adição de leite bovino cru.

Ainda considerando a importância do leite bovino, nesta tese também é realizado um estudo de SERS (do inglês, *Surface-enhanced Raman spectroscopy*) em leite bovino pasteurizado, gerado por substratos vítreos contendo nanoestruturas de prata. A espectroscopia Raman é uma técnica que se baseia no espalhamento inelástico da radiação monocromática que interage com a matéria (SALA, 2008; SCHRADER, 1995). Essa técnica tem sido constantemente utilizada na identificação, caracterização e elucidação de estruturas de moléculas e compostos. Entretanto, o espalhamento Raman possui como desvantagem à baixa intensidade de fótons espalhados inelasticamente. Esse fator negativo em alguns casos, dificulta

a detecção do sinal Raman, podendo comprometer os resultados (FERRARO; NAKAMOTO; BROWN, 2003; SALA, 2008).

Buscando alternativas para amplificar o sinal Raman nos experimentos, diferentes modalidades foram desenvolvidas, sendo o espalhamento Raman amplificado por superfície ou SERS, uma dessas modalidades (LONG, 2002; RU; ETCHEGOIN, 2009). O SERS consiste em amplificar o sinal Raman do adsorbato (amostra) a partir da ressonância de plasmon de superfície das nanoestruturas metálicas, gerado devido a incidência de radiação monocromática (LE RU et al., 2007; RU; ETCHEGOIN, 2009). Entretanto, o desenvolvimento de substratos SERS ativos com alta eficiência e reprodutibilidade ainda é um desafio.

Estudos mostram que a produção de substratos SERS ativos utilizando técnicas como a litografia por feixe de elétrons (*electron-beam lithography*) ou por ultravioleta (*UV lithography*), produzem substratos SERS contendo nanoestruturas metálicas com formas, tamanhos e distâncias bem definidas, podendo resultar substratos com alta atividade SERS. No entanto, essas técnicas necessitam de um elevado custo de investimento, inviabilizando em alguns casos o estudo do SERS nas amostras (JHA et al., 2012; KAHL et al., 1998; YUE et al., 2012). Outro método de produção de substratos SERS ativos que tem gerado bons resultados de efeito SERS nas amostras e com custo de produção relativamente menor, é o método por *bottom-up* (BELUSSO et al., 2019; PEREIRA et al., 2016).

O método *bottom-up* consiste em produzir uma matriz vítrea contendo um agente precursor em sua composição, neste caso o nitrato de prata (AgNO_3). Após a síntese da matriz vítrea, essa é submetida a um tratamento térmico com temperatura e atmosfera controladas, resultando na migração de íons de metais de transição, Ag^+ , para a superfície. Devido a atmosfera controlada, os íons que migram para a superfície do substrato crescem/coalescem, resultando em nanoestruturas metálicas de prata na superfície do substrato vítreo (BELUSSO et al., 2019; PEREIRA et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2014).

Dessa forma, no estudo de efeito SERS do leite bovino pasteurizado realizado nesta tese, investigou-se a eficiência dos substratos vítreos de borofosfato dopados com 1%, 3% e 6% de íons de prata, em amplificar o sinal Raman do leite bovino pasteurizado.

1.1 COMPOSIÇÃO DOS LEITES BOVINO E CAPRINO

De modo geral, o leite consiste de uma combinação de diversos elementos sólidos em água (FOX et al., 2015; JENSEN, 1995). No caso do leite bovino cru, a composição varia entre 13-15% de elementos sólidos e 85-87% de água. No leite caprino cru as porcentagens de

elementos sólidos são de 12-13% e a de água ficam entre 87-88% (AL HAJ; AL KANHAL, 2010; FOX et al., 2015). Os principais elementos sólidos presentes no leite, independentemente da espécie, são: lipídios (gordura), carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas (CHRISTIE, 1983; FOX et al., 2015). A Tabela 1 informa as porcentagens dos componentes presentes nos leites bovino e caprino.

Tabela 1 - Composição química dos leites crus de origem bovina e caprina.

<i>Leite (espécie)</i>	<i>Água %</i>	<i>Proteína %</i>	<i>Gordura (lipídios) %</i>	<i>Resíduo mineral %</i>	<i>Carboidratos %</i>
Bovino	85-87	3,2-3,8	3,7-4,4	0,7-0,8	4,8-4,9
Caprino	87-88	2,9-3,7	4,0-4,5	0,8-0,9	3,6-4,2

Fonte: Adaptada de (AL HAJ; AL KANHAL, 2010; FOX et al., 2015; KULA, 2016)

Como mostrado na comparação da Tabela 1, a porcentagem dos elementos sólidos presentes no leite variam de acordo com cada espécie. Além disso, fatores como o estágio de lactação, raça do animal, tipo de alimentação, temperatura ambiente, manejo e intervalo entre as ordenhas, também causam variações na concentração dos componentes presentes no leite (FOX et al., 2015; JENSEN, 1995).

O principal carboidrato presente na maioria do leite dos mamíferos é a lactose. Outros carboidratos como a glicose e frutose são detectados nos leites, porém apenas vestígios (FOX et al., 2015). De acordo com a Tabela 1, a porcentagem de lactose no leite bovino varia entre 4,8-4,9% e a do leite caprino está entre 3,6-4,2%. No início da lactação a concentração de lactose é maior, diminuindo progressivamente ao longo da lactação (FOX et al., 2015).

A lactose é um dissacarídeo composto pelos monossacarídeos galactose e glicose, os quais são unidos por ligação $\beta(1-4)$ (SCHUSTER et al., 2006), e naturalmente podem existir na forma de α - ou β -lactose, como representado na Figura 1. A lactose é a principal fonte de energia dos recém-nascidos, e nos humanos adultos o seu consumo tem função nutricional. Além disso, está diretamente relacionada ao controle do volume de leite produzido durante o período de lactação (EMBRAPA, [s.d.]; FOX et al., 2015).

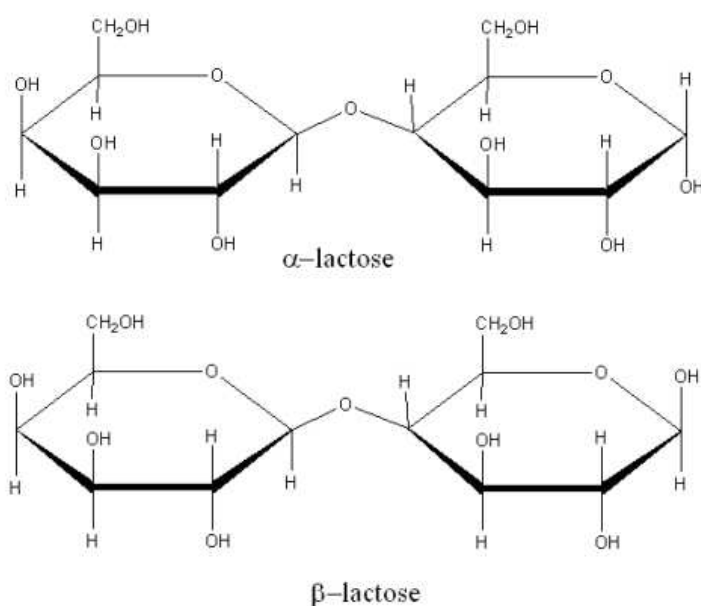


Figura 1 - Representação da estrutura química da α - e β -lactose. Fonte:(ALMEIDA, 2011)

O leite de todos os mamíferos contém gordura (lipídios), porém a concentração presente no leite varia entre as espécies, podendo ser de 2% até pouco mais de 50% do total de sólidos no leite. Como uma das funções dos lipídios é servir de fonte de energia para o recém-nascido, o teor de gordura no leite reflete em grande parte as necessidades energéticas de cada espécie (CHRISTIE, 1983; FOX et al., 2015).

Os triacilgliceróis (triglicerídeos) correspondem a 97-98% do total de lipídeos presentes no leite da maioria das espécies. Estes são formados por três moléculas de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerol, como mostrado na Figura 2. Os ácidos graxos são cadeias carbônicas que variam entre 4-24 átomos de carbonos, podendo ser cadeias do tipo linear ou ramificada, saturada (possui somente ligações simples) ou insaturada (possui ligações simples e dupla) (BELL et al., 1997). Os lipídios do leite também são importantes fontes de ácidos graxos essenciais, fornecendo ácidos graxos que não podem ser sintetizados por animais, como o ácido linoléico, C18:2. E também auxiliam na absorção de vitaminas (A, D, E, K) e outras substâncias, como os carotenoides, que são solúveis em gordura (FOX et al., 2015).

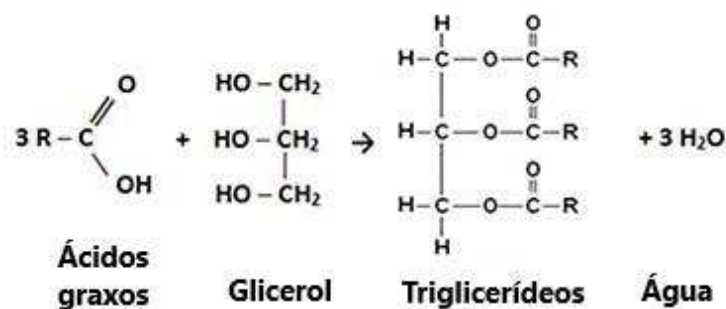


Figura 2 - Representação da reação de formação do triglicerídeo a partir de três ácidos graxos e um glicerol. Fonte: Adaptada de (SENIHA GÜNER; YAĞCI; TUNCER ERCIYES, 2006)

A gordura presente no leite encontra-se na forma de pequenos glóbulos suspensos em fase aquosa. Estes são envolvidos por uma membrana lipoprotéica, que impede a união de todos os glóbulos de gordura e os mantém em suspensão. Os glóbulos apresentam diferentes tamanhos de acordo com a espécie (EL-ZEINI, 2006; FOX et al., 2015). No caso do leite bovino cru, o diâmetro médio dos glóbulos é de aproximadamente 3,95 μm e o do leite caprino cru é de 3,20 μm . Além dessa diferença, o leite caprino possui em sua composição aproximadamente 57% de ácidos graxos com cadeia curta e média (4-10 e 12-16 átomos de carbono, respectivamente (EIFERT et al., 2006)), porém no leite bovino a proporção é de 50%. De acordo com (CATUNDA et al., 2016; FONTECHA et al., 2000; JANDAL, 1996; KULA, 2016), a diferença do tamanho dos glóbulos de gordura e da proporção de ácidos graxos com cadeia curta e média nesses leites, contribuem para que o leite caprino apresente maior facilidade de digestão e menores índices de intolerância quando comparado ao leite bovino.

Como comparado na Tabela 1 a porcentagem de proteína que compõem os leites bovino e caprino variam entre 3,2-3,8% e 2,9-3,7%, respectivamente. Durante a lactação a porcentagem de proteína no leite também varia, ocorrendo uma redução abrupta nas primeiras cinco semanas de lactação, seguido de um aumento gradual na porcentagem de proteína. (FOX et al., 2015). A função natural das proteínas contidas no leite é fornecer aos mamíferos jovens os aminoácidos necessários para o desenvolvimento de tecidos, principalmente os musculares. E também fornecem uma série de proteínas biologicamente ativas, como as imunoglobulinas, as proteínas de ligação e vários hormônios proteicos (FOX et al., 2015; SGARBIERI, 2004).

As proteínas do leite são divididas em dois grupos bem específicos: caseínas e proteínas do soro. A função biológica das caseínas na glândula mamária é transportar cálcio, fosfato e proteínas para o recém-nascido, sendo as quatro proteínas principais: α_{s1} -, α_{s2} -, β - e κ -caseína (DE KRUIF; HOLT, 2003). Com relação as proteínas do soro, os dois componentes principais são a α -lactalbumina e β -lactoglobulina, e estes permanecem solúveis no soro do leite após a

precipitação da caseína a pH de 4,6 e temperatura de 20 °C (DE KRUIF; HOLT, 2003; FARRELL et al., 2006). A proporção de caseína e de proteínas de soro que compõem o leite, variam de acordo com as espécies. No caso do leite bovino cru as porcentagens de caseína e da proteína do soro são de 80% e 20%, respectivamente, e no leite caprino cru as porcentagens são de 86% e 14%, respectivamente (FOX et al., 2015).

Com relação aos sais minerais presentes no leite, os elementos com maior concentração são: cálcio, magnésio, sódio, potássio e fósforo, como mostrado da Tabela 2. Outros minerais também são detectados, como o cobre, ferro, chumbo, boro, manganês, zinco, iodo e outros, porém com baixas concentrações. O cálcio apresenta importantes funções nutricionais, por exemplo, está diretamente relacionado com a formação da estrutura dentária e óssea. Além disso, está associado física e quimicamente a caseína, permitindo um elevado acúmulo de cálcio no leite e gerando o equilíbrio osmótico com o sangue (FOX et al., 2015; JENSEN, 1995).

Tabela 2 - Principais sais minerais presentes nos leites bovino e caprino.

Sais minerais	Bovino (mmol/L)	Caprino (mmol/L)
Cálcio	29,4	23,1
Magnésio	5,1	5,0
Sódio	24,2	20,5
Potássio	34,7	46,6
Fósforo	20,9	15,6

Fonte: (FOX et al., 2015)

1.2 LEITE BOVINO PASTEURIZADO

A venda de leite cru para o consumo direto da população é proibida no Brasil desde 1969 (DECRETO Nº 66.183, 1969). Após anos de alterações nas normas e regulamentações sanitárias sobre a comercialização, armazenamento e transporte do leite, esses critérios atualmente no Brasil são determinados pelas Instruções Normativas (IN) nº 51/2002 e a nº 62/2011 (IN, 2002, 2011). De acordo com essas instruções normativas, é obrigatório que o leite bovino cru seja submetido a um processo de pasteurização antes de ser comercializado. O processo de pasteurização no leite consiste do emprego de calor de forma conveniente, destruindo microrganismos patogênicos como a bactéria *Coxiella burnetii* e outras bactérias que podem causar doenças como a: tuberculose, listeriose, brucelose, cólera, difteria e outras doenças. Além disso, a pasteurização também elimina grande parte da microbiota normal do leite, porém sem causar alteração sensível na constituição física e no equilíbrio químico do leite,

sem prejuízo aos elementos bioquímicos e as características sensoriais, e também resulta no aumento do prazo de validade do leite (IN, 2002, 2011).

Os processos de pasteurização adotados no tratamento do leite bovino cru podem ser: processo lento, no qual o leite é aquecido a 62-65 °C durante 30 minutos com lenta agitação mecânica, ou processo rápido, que consiste em aquecer o leite a 72-75 °C durante 15 a 20 segundos. Após ser realizado o aquecimento do leite, em ambos os processos, o leite é resfriado imediatamente a uma temperatura de 2-4°C em menos de 10 segundos, evitando assim a proliferação dos microrganismos que restaram (SCHUSTER et al., 2006).

As Instruções Normativas também determinam que o leite bovino pasteurizado seja classificado em tipo A, B ou C (IN, 2002, 2011). Os critérios de classificação das IN levam em consideração a concentração final de microrganismos presentes no leite após a pasteurização e se o leite cru pertence ou não a um único rebanho. Dessa forma, no leite tipo A o valor máximo de microrganismo permitido é de 500/mL e o leite ordenhado deve ser de um único rebanho. No leite tipo B é permitido uma concentração maior de microrganismo, sendo de 40000/mL, e o leite pode ser de diferentes rebanhos. No leite tipo C também é permitido a coletado de leite de diferentes rebanhos, além de permitir o transporte do leite cru em tanques refrigerados até o local em que será realizado o processo de pasteurização, no entanto, o leite deve ser submetido a pasteurização em até 10h após a ordenha. A concentração de microrganismos permitida por lei no leite tipo C é de até 100.000/mL.

O processo de pasteurização causa uma redução na proporção dos sólidos totais presentes no leite bovino (BUTLER et al., 2000; SILVA et al., 2018). No entanto, de acordo com a instrução normativa nº 51 (IN, 2002) a comercialização do leite bovino pasteurizado é permitida, desde que o produto final respeite o valor limite de sólidos totais exigidos pela IN nº 51 e que as propriedades nutricionais do leite não sofram alterações. No caso do leite tipo A, é exigido uma porcentagem mínima de sólidos totais de 8,4g/100g.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo são descritas as técnicas de espectroscopia Raman e de infravermelho, as quais foram utilizadas no estudo de caracterização das amostras de leite analisadas neste trabalho. E também são apresentadas as técnicas de análise de componentes principais e de regressão por mínimos quadrados parciais, as quais foram usadas como métodos de identificação de fraudes nas amostras de leite caprino.

2.1 ESPECTROSCOPIA

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, tendo como um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas (HOLLAS, 2013; SALA, 2008). Nas diferentes técnicas de espectroscopia são obtidos espectros, os quais fornecem informações sobre as transições, ou seja, a diferença de energia entre os níveis de energia. A partir dessas informações é possível determinar as posições relativas dos níveis energéticos de cada material analisado (LARKIN, 2018; SALA, 2008).

As transições entre os níveis de energia de um material estão relacionadas com a energia da radiação eletromagnética irradiada na amostra. No caso de moléculas, as transições eletrônicas são normalmente observadas com a incidência da radiação eletromagnética na região do ultravioleta e visível, as transições vibracionais devido a incidência da radiação visível e infravermelho, e as transições rotacionais com a radiação na região do micro-ondas (BUENO, 1989; SALA, 2008). Para cada técnica de espectroscopia é necessário utilizar elementos dispersivos e detectores específicos.

A seguir, são apresentados os conceitos das técnicas de espectroscopia de infravermelho e Raman, as quais foram utilizadas nesse trabalho.

2.1.1 Radiação de Infravermelho

A existência da radiação na região do infravermelho foi descoberta pelo músico e astrônomo William Herschel, em 1800 (OLIVEIRA; MARTINS; SILVA, 2018; ROGALSKI, 2012). Durante um experimento, Herschel posicionou termômetros de mercúrio nas diferentes cores de um espectro de luz visível gerado por um prisma, e observou que para cada cor do espectro, os termômetros apresentaram diferentes tempos para atingir a mesma variação de temperatura. E ao posicionar um termômetro do lado da cor vermelha do espectro, em uma

região onde não era observada luz visível, Herschel notou que essa região também causava um aumento de temperatura no termômetro (OLIVEIRA; MARTINS; SILVA, 2018; ROGALSKI, 2012). Os resultados desse experimento deram início ao estudo da radiação de infravermelho (ROGALSKI, 2012).

Dentre as diferentes regiões do espectro eletromagnético (Figura 3), a região espectral do infravermelho está compreendida entre 0,78–1000 μm . Porém, essa é subdividida em três partes: infravermelho próximo (NIR, do inglês, *Near infrared*) de 0,78–2,5 μm (12800–4000 cm^{-1}), infravermelho médio (MIR, do inglês, *Middle infrared*) de 2,5–50,0 μm (4000–200 cm^{-1}) e infravermelho longo (FAR, do inglês, *Far infrared*) de 50,0–1000,0 μm (200–10 cm^{-1}) (BUENO, 1989; DONALD L. PAVIA et al., 2010). Neste trabalho foi utilizado as técnicas de espectroscopia de absorção no infravermelho próximo e médio.

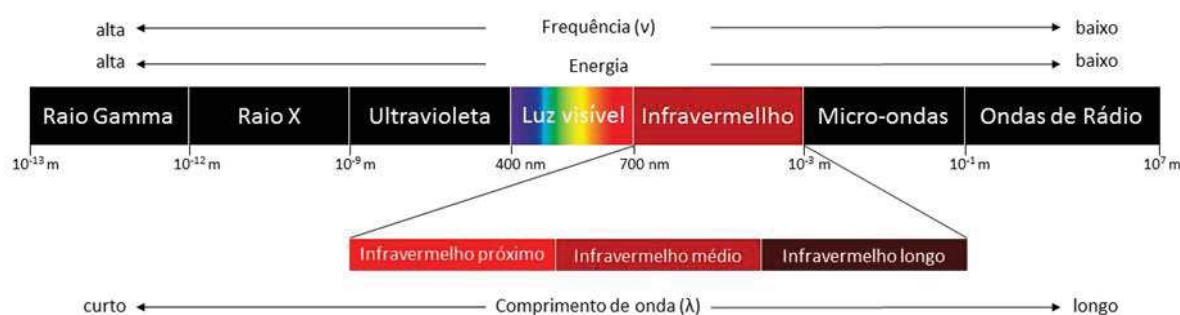


Figura 3 - Representação das regiões do espectro eletromagnético. Em destaque, subdivisões das regiões do infravermelho. Fonte: (MENDES, 2018)

2.1.2 Princípios da espectroscopia de infravermelho

Na teoria clássica, a absorção (ou emissão) de radiação por um sistema é devido à variação periódica do momento de dipolo elétrico, sendo a frequência absorvida (ou emitida) idêntica a frequência de oscilação do dipolo (ROGALSKI, 2012; SALA, 2008). Por exemplo, materiais com ligações do tipo simétrica, como o H_2 ou Cl_2 , não absorvem radiação do infravermelho. Deste modo, para que ocorra transferência de energia a ligação deve apresentar um dipolo elétrico μ (ou um dos seus três componentes: μ_x , μ_y ou μ_z) oscilando na mesma frequência da radiação incidente (DONALD L. PAVIA et al., 2010; SALA, 2008).

O momento de dipolo é determinado pela configuração nuclear, portanto, ao vibrar uma molécula o seu momento de dipolo pode sofrer variação. No caso de moléculas diatômicas, a única coordenada normal do sistema coincide com a coordenada interna da ligação, q . Sendo

assim, ao expandir o momento de dipolo em série de Taylor da coordenada q para cada um dos componentes μ_x , μ_y e μ_z e escrevendo de forma condensada, temos:

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 q + \dots \quad \text{Eq. 1.1}$$

onde μ_0 é o vetor do momento de dipolo permanente e a derivada é considerada na posição de equilíbrio. Os termos de ordem mais alta são desprezados para pequenos deslocamentos em torno da posição de equilíbrio. Então a condição de variação do momento de dipolo com a vibração necessária para ocorrer absorção no infravermelho implica em $(d\mu/dq)_0 \neq 0$, em pelo menos um dos componentes μ_x , μ_y e μ_z . (SALA, 2008)

Já na mecânica quântica, a transição entre dois estados caracterizados pelas funções de onda ψ_m e ψ_n é descrita pelo momento de transição de dipolo:

$$\mu_{mn} = \int \psi_m \mu \psi_n d\tau \quad \text{Eq. 1.2}$$

ou pelos componente μ_x , μ_y e μ_z (SALA, 2008; SCHRADER, 1995):

$$\begin{aligned} (\mu_x)_{mn} &= \int \psi_m \mu_x \psi_n d\tau \\ (\mu_y)_{mn} &= \int \psi_m \mu_y \psi_n d\tau \\ (\mu_z)_{mn} &= \int \psi_m \mu_z \psi_n d\tau \end{aligned} \quad \text{Eq. 1.3}$$

Quanticamente, a transição é permitida se pelo menos uma das componentes acima for diferente de zero. O momento de transição dado pelo hamiltoniano (H), ocorre devido a perturbação do operador hamiltoniano (H') pelo campo da radiação incidente (H_0), logo,

$$H = H_0 + H' \quad \text{Eq. 1.4}$$

O campo elétrico E, atua no momento de dipolo μ produzindo uma variação, $E\mu$, que consequentemente é adicionada à energia do sistema.(SALA, 2008)

Substituindo a Eq. 1.1 na Eq. 1.2, temos:

$$\mu_{mn} = \mu_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau \quad \text{Eq. 1.5}$$

Na equação acima, o primeiro termo do lado direito da equação é igual a zero, isto ocorre devido a ortogonalidade das funções de onda (exceto quando $m = n$, nesse caso não ocorre transição). O segundo termo da equação será diferente zero quando (DONALD L. PAVIA et al., 2010; SALA, 2008):

(1) $(d\mu/dq)_0 \neq 0$, ou seja, ocorra variação do momento de dipolo devido a uma pequena vibração na posição de equilíbrio.

(2) $\int \psi_m^* \psi_n d\tau \neq 0$. No caso do produto $\psi_m^* \psi_n$ for diferente de zero, a integral também será.

Devido a primeira condição, as moléculas diatômicas homonuclear não apresentam absorção no infravermelho, já que o seu momento de dipolo continua sendo nulo durante a vibração. No caso de moléculas diatômicas heteronuclear, o movimento vibracional causará variação do momento de dipolo, gerando atividade no infravermelho (DONALD L. PAVIA et al., 2010; SALA, 2008).

O movimento resultante das vibrações moleculares é descrito pelos graus de liberdade de uma molécula. Em um sistema com N átomos não combinados, estes têm liberdade para se moverem nas direções x, y e z, portanto, 3N modos distintos de movimentos associados aos três tipos possíveis de transições. As possíveis transições são: as vibracionais, nas quais os núcleos dos átomos mudam de posição constantemente devido as mudanças das distâncias de ligação ou dos ângulos de ligação; as rotacionais, que implicam mudanças na posição dos átomos da molécula devido a rotações sobre os eixos definidos, e as translacionais, que ocorrem devido aos movimentos de translação da molécula como um todo. No entanto, para os átomos que se movem em fase nas direções x, y e z, os movimentos translacionais são desconsiderados. Também em fase, os movimentos rotacionais de moléculas não lineares são eliminados, sendo assim, o grau de liberdade vibracional é dado por 3N-6. No caso de moléculas lineares, haverá 3N-5 graus de liberdade vibracional, pois os núcleos são considerados pontuais e, portanto, não ocorre rotação no eixo da molécula (DONALD L. PAVIA et al., 2010; RIBEIRO CLARO, 2018).

Os graus de liberdade da molécula correspondem aos modos normais de vibração, os quais apresentam diferentes tipos de vibração, como representados na Figura 4. Os modos de vibrações podem ser divididos em dois grupos (DONALD L. PAVIA et al., 2010; JÚNIOR, 2010; SAKANE et al., 2011):

- i) **Vibrações de estiramento (*stretching*):** o movimento dos átomos é ao longo dos eixos da ligação molecular. Este movimento pode ser simétrico ou assimétrico, como representado respectivamente na Figura 4 (a) e (b);
- ii) **Vibrações de deformação angular (*bending*):** os movimentos das moléculas provocavam mudanças nos ângulos entre as ligações dos átomos. Com mostrados na Figura 4 estes podem ser: (c) simétrico (*scissoring*) ou (d) assimétrico no plano (*rocking*), e (e) simétrico (*wagging*) ou (f) assimétrico fora do plano (*twisting*).

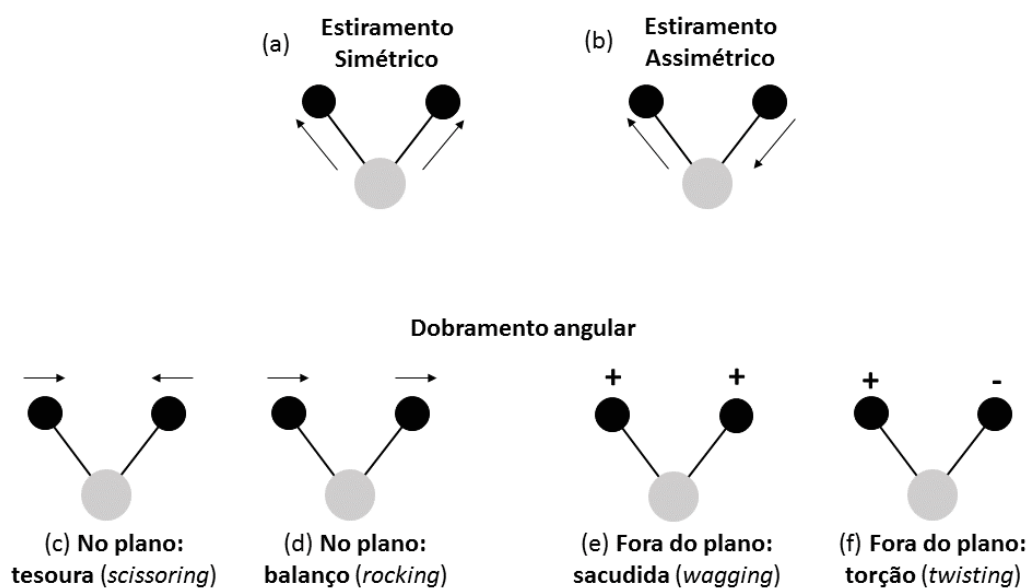


Figura 4 - Modos vibracionais de uma molécula. Os sinais “+” e “-”, significam saindo e entrando no plano, respectivamente. Fonte: Elaborado pelo autor (2020)

Na espectroscopia de infravermelho médio (MIR) e na espectroscopia Raman, os modos de vibração analisados são chamados de vibrações fundamentais e são originados devido a excitação do estado fundamental para o estado excitado de menor energia. Já na espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), as bandas de absorção obtidas são consideradas bandas de sobretons e de combinação, ocorrendo devido a excitação de moléculas do estado fundamental para estados de maior energia (BUENO, 1989; DONALD L. PAVIA et al., 2010).

2.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

Os fundamentos da técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier-transform infrared spectroscopy*) foram desenvolvidos no final do século XIX (PERKINS, 1986; STUART, 2004). O físico Albert Abraham Michelson construiu um interferômetro e o descreveu em suas publicações no ano de 1891. Em 1892, o matemático e físico Lord Rayleigh, reconheceu que o interferograma estava relacionado ao espectro por uma operação matemática conhecida como Transformação de Fourier. No entanto, devido à falta de computadores e a baixa capacidade de processamento de dados na época, os avanços significativos no desenvolvimento de espectrômetros de infravermelhos só começaram depois de 1960 (BUENO, 1989; PERKINS, 1986; STUART, 2004).

Os espectrômetros de infravermelho do tipo não dispersivos (transformada de Fourier) ainda são construídos baseados no arranjo óptico do interferômetro de Michelson e no fenômeno de interferência da luz (BUENO, 1989; DONALD L. PAVIA et al., 2010; PERKINS, 1986). Como neste trabalho foram utilizados espectrômetros de infravermelhos deste tipo, nas seções seguintes são descritas o fenômeno de interferência da luz e o princípio do interferômetro de Michelson.

2.2.1 Interferência

O efeito de interferência consiste na sobreposição de ondas com iguais frequências de oscilações e amplitude, mas com uma diferença de fase δ entre estas (NUSSENZVEIG, 2013). Apesar do fenômeno da interferência ser observado em ondas mecânicas, foram necessários anos para comprovar experimentalmente a ocorrência do efeito de interferência da luz, sendo a comprovação realizada pelo físico e médico Thomas Young, em 1802 (FOWLES, 1898; NUSSENZVEIG, 2010; ZILIO, 2009).

O efeito de interferência da luz pode ser representado pela Figura 5. Na Figura 5(a) temos uma fonte de luz “S” projetando dois feixes com iguais frequência e amplitude, porém percorrendo caminhos diferentes. Os feixes ao se recombinarem no anteparo “P” podem estar defasados, gerando assim uma interferência de onda construtiva ou destrutiva, como ilustrado na Figura 5(b).

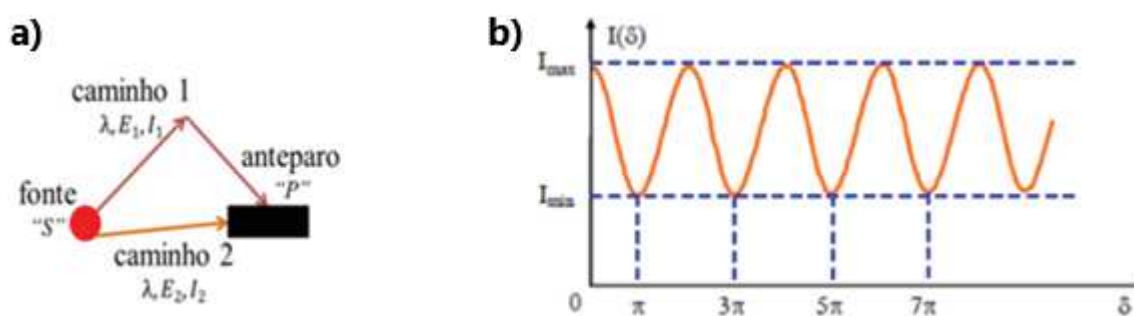


Figura 5 - Representação do fenômeno de interferência da luz. (a) Dois feixes de luz emergindo de uma fonte, passando por diferentes caminhos e se recombinando em um ponto “P”. (b) Representação de um interferograma. Fonte: Adaptadas de (a) (MENDES, 2015) e (b) (ZILIO, 2009).

O valor da intensidade de luz, I , em um determinado instante é definido pela média temporal do vetor de Poynting \vec{S} , o qual fornece a densidade de fluxo de energia associada a uma onda eletromagnética (FOWLES, 1898; NUSSENZVEIG, 2013), portanto:

$$I = \langle \vec{S} \rangle \quad \text{Eq. 1.6}$$

Definindo o vetor de Poynting como (FOWLES, 1898; NUSSENZVEIG, 2013):

$$\vec{S} = \vec{E} \times \vec{H} \quad \text{Eq. 1.7}$$

sendo, \vec{E} o vetor campo elétrico e \vec{H} o vetor campo magnético. Sabendo que a magnitude do \vec{H} se relaciona com o \vec{E} por,

$$H = \epsilon c E \quad \text{Eq. 1.8}$$

Então, a Eq. 1.7 pode ser reescrita como:

$$\vec{S} = \epsilon c \vec{E} \times (\vec{E} \times \hat{k}) \quad \text{Eq. 1.9}$$

sendo, ϵ a permissividade elétrica do meio em que a onda eletromagnética se propaga, c é a velocidade da luz, \hat{k} é o vetor de onda unitário e fornece a direção de propagação da onda eletromagnética (FOWLES, 1898; NUSSENZVEIG, 2010; ZILIO, 2009).

De acordo com ao princípio da superposição, o vetor campo eletromagnético resultante \vec{E} em um determinado ponto “P” (Figura 5(a)), corresponde a soma do vetor campo elétrico \vec{E}_1 de um feixe que passa pelo caminho 1, com o campo elétrico \vec{E}_2 do feixe que passam pelo caminho 2, portanto,

$$\vec{E} = \vec{E}_{(1)} + \vec{E}_{(2)} \quad \text{Eq. 1.10}$$

e,

$$\begin{aligned} \vec{E}_{(1)} &= \vec{E}_1 e^{i(\mathbf{k}_1 \cdot \mathbf{r} - \omega t)} \\ \vec{E}_{(2)} &= \vec{E}_2 e^{i(\mathbf{k}_2 \cdot \mathbf{r} - \omega t + \delta)} \end{aligned} \quad \text{Eq. 1.11}$$

sendo, δ a diferença de fase entre as ondas do E_1 e E_2 , originada devido a diferença de caminho dos feixes.

Reescrevendo a Eq. 1.6 de acordo com o princípio da superposição de duas ondas planas monocromáticas, a intensidade em um determinado ponto, é dada por,

$$I = \langle \vec{S} \rangle = \epsilon c \langle \vec{E} \cdot \vec{E} \rangle \quad \text{Eq. 1.12}$$

Como o vetor campo elétrico \vec{E} é resultante das contribuições do \vec{E}_1 e \vec{E}_2 , temos:

$$I = \epsilon c \left(\langle E_1^2 \rangle + \langle E_2^2 \rangle + \langle E_1 \cdot E_2^* \rangle \langle E_1^* \cdot E_2 \rangle \right) \quad \text{Eq. 1.13}$$

ou,

$$I = \epsilon c \left(I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 \cdot I_2} \cos \delta \right) \quad \text{Eq. 1.14}$$

Na Eq. 1.14 os termos I_1 e I_2 correspondem, respectivamente, a intensidade da luz dos feixes que passam pelos caminho 1 e 2, e $2\sqrt{I_1 \cdot I_2} \cos \delta$, é chamado de termo de interferência (FOWLES, 1898).

Observa-se na Eq. 1.14 que o valor resultante da intensidade de luz que chega no ponto “P” da Figura 5(a), varia de acordo com a função cosseno. Desta forma, a intensidade máxima (I_{\max}) no ponto “P” ocorre quando o $\cos = +1$, ou seja, temos $\delta = 2n\pi$ (sendo $n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$) gerando uma interferência construtiva. Porém, quando $\cos = -1$ ocorre um intensidade mínima (I_{\min}), portanto, $\delta = (2n\pi + \pi)$ resulta em uma interferência destrutiva. A Figura 5(b) representa a variação da intensidade construtiva e destrutiva no ponto P em função de δ (FOWLES, 1898; ZILIO, 2009).

2.2.2 Interferômetro de Michelson

O interferômetro de Michelson (espectrômetro do tipo não dispersivo) é composto basicamente por: uma fonte de radiação, um divisor de feixe (*beamsplitter*) e dois espelhos planos posicionados perpendicularmente um ao outro, sendo um espelho fixo (E1) e outro móvel (E2), como representado na Figura 6 (BUENO, 1989; HOLLAS, 2013). A fonte de radiação emite na direção ao *beamsplitter*, e ao incidir no *beamsplitter*, este divide o feixe inicial em dois feixes resultantes de 50% da potência inicial. Um dos feixes resultantes é refletido na direção do espelho fixo (E1), e o outro feixe resultante é transmitido na direção do espelho móvel (E2). Após os feixes resultantes atingirem os espelhos E1 e E2, estes são refletidos e novamente são direcionados ao *beamsplitter*. No *beamsplitter* as amplitudes das ondas são recombinadas gerando o fenômeno de interferência da luz. A radiação resultante após a recombinação é irradiada na amostra e depois direcionada para o detector (HOLLAS, 2013; PERKINS, 1986).

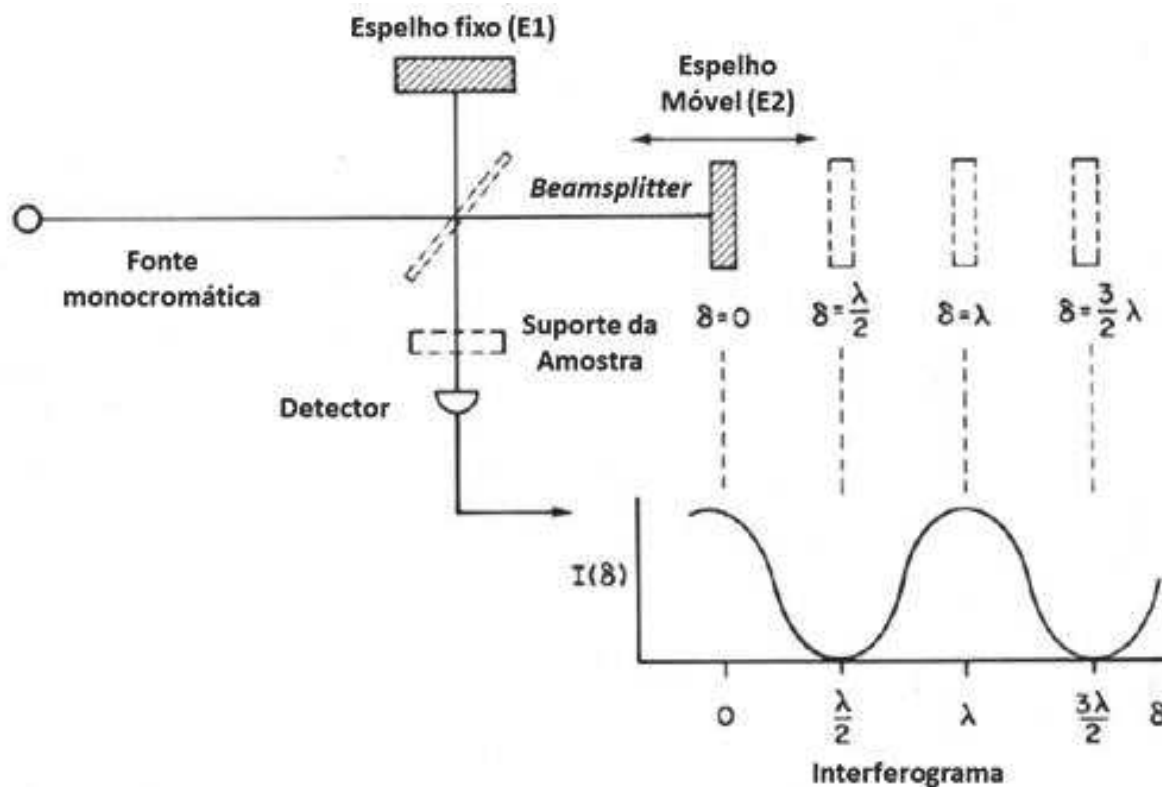


Figura 6 - Representação dos principais componentes internos de um espectrômetro FTIR. Fonte: Adaptada de (PERKINS, 1986).

O movimento do espelho móvel (E_2) gera uma diferença de caminho óptico entre os feixes, resultando em um retardo óptico representado por δ (Figura 6). O retardo óptico é dado por $\delta = 2x$, sendo x a distância adicional que o feixe percorre, e o fator 2 é a distância adicional de ida e volta do feixe. No caso de uma fonte monocromática o deslocamento do espelho móvel gera um interferograma com diversos máximos e mínimos.

O interferograma resultante pode ser descrito como uma onda cosseno infinitamente longa, dada por (FOWLES, 1898; PERKINS, 1986):

$$I(\delta) = B(\nu) \cos\left(2\pi \frac{\delta}{\lambda}\right) \quad \text{Eq. 1.15}$$

sendo, $I(\delta)$ é a intensidade do sinal no detector em função do retardo óptico e $B(\nu)$ é a intensidade da fonte em função da frequência ν . No entanto, por conveniência os resultados de espectroscopia de infravermelho são expressos em função do número de onda, definido por ($\nu = 1/\lambda$), logo:

$$I(\delta) = B(\nu) \cos(2\pi\delta\nu) \quad \text{Eq. 1.16}$$

Para uma fonte que emite mais de uma frequência, cada frequência deve ser tratada com a sua própria periodicidade. Portanto, matematicamente pode-se definir o interferograma como

a soma das ondas cosseno de todas as frequências presentes em um fonte, logo (FOWLES, 1898; PERKINS, 1986):

$$I(\delta) = \sum_{\nu_1}^{\nu_n} B(\nu_i) \cos(2\pi\delta\nu_i) \quad \text{Eq. 1.17}$$

Substituindo o somatório da equação acima por uma integral, temos:

$$I(\delta) = \int_0^{\infty} B(\nu) \cos(2\pi\nu\delta) d\nu \quad \text{Eq. 1.18}$$

Desta forma, a Eq. 1.18 descreve matematicamente o interferograma obtido em um espectro de intensidade *versus* tempo (Figura 6), porém, nesta forma existe uma grande dificuldade em analisar os modos de vibração de um sistema em função da frequência da irradiação. Conhecendo a forma matemática do interferograma $I(\delta)$, em função de δ , e aplicando a transformada de Fourier nos resultados obtidos pela Eq. 1.18, gera-se um espectro relacionando as intensidades em função do número de onda, desta forma,

$$B(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\nu\delta) d\delta \quad \text{Eq. 1.19}$$

sendo, $B(\nu)$ é a intensidade do espectro em função do número de onda ν (FOWLES, 1898; PERKINS, 1986)

2.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

O efeito Raman consiste no espalhamento inelástico da luz ao incidir sobre um material (LONG, 2002; SALA, 2008). Esse fenômeno foi descrito pelo físico Chandrasekhara Venkata Raman em 1928, e devido as suas publicações, esse fenômeno recebeu o seu nome e lhe permitiu ganhar o prêmio Nobel de Física em 1930 (PRIZE, [s.d.]; RAMAN; KRISHNAN, 1928). C. V. Raman observou que ao irradiar luz visível em uma amostra, uma pequena fração de luz espalhada com comprimento de onda na região do visível mudava em relação a luz incidente. Apesar desse efeito ter sido previsto teoricamente anos antes (NIELSEN, 1929), foi devido as publicações de C. V. Raman que esse efeito ganhou importância. A aplicação do efeito Raman na ciência só começou de forma significativa após os anos de 1960, com o desenvolvimento do *laser* (do inglês, *light amplification by stimulated emission of radiation*) como fonte de excitação (LONG, 2002; SALA, 2008; SCHRADER, 1995).

No efeito Raman, o fenômeno está ligado à variação do momento de dipolo induzido na molécula devido o campo elétrico da radiação incidente. Nota-se que esse efeito é diferente da

espectroscopia de infravermelho, na qual se considera a variação do momento de dipolo intrínseco com a vibração. (SALA, 2008)

Na teoria clássica, o espalhamento Raman origina-se a partir de uma fonte de radiação monocromática com frequência de incidência ω_0 e campo elétrico dado por $E = E_0 \cos(\omega_0 t)$ interagindo com a matéria. Considerando o vetor do momento de dipolo induzido \vec{p} , dado por,

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} \quad \text{Eq. 1.20}$$

A polarizabilidade α , pode ser expandida em série de Taylor em torno da coordenada generalizada q , logo:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q + \dots \quad \text{Eq. 1.21}$$

sendo, α_0 é a polarizabilidade na posição de equilíbrio e os termos de ordem mais alta são desprezados devido a pequena variação da coordenação q , escrita na forma de $q = q_0 \cos(\omega_v t)$. A frequência de vibração é representada por ω_v (FERRARO; NAKAMOTO; BROWN, 2003; SALA, 2008).

Substituindo a expressão do campo E e a Eq. 1.21 na Eq. 1.20, temos (FERRARO; NAKAMOTO; BROWN, 2003; SALA, 2008):

$$\vec{p} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) \cos(\omega_v t) \quad \text{Eq. 1.22}$$

Aplicando na equação acima a transformação trigonométrica, dada por:

$$\cos(a) \cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a + b) + \cos(a - b)],$$

temos:

$$\vec{p} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(\omega_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{d\alpha}{dq} \right)_0 q_0 \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\omega_0 + \omega_v)t] + \cos[2\pi(\omega_0 - \omega_v)t] \} \quad \text{Eq. 1.23}$$

Na Eq. 1.23 o primeiro termo do lado direito da equação refere-se a frequência da radiação incidente e corresponde ao espalhamento Rayleigh (espalhamento elástico). Já o segundo termo da equação refere-se a radiação espalhada com frequência $\omega_0 - \omega_v$ (espalhamento Raman Stokes) e com $\omega_0 + \omega_v$ (espalhamento Raman anti-Stokes). No entanto, a contribuição deste termo ocorre quando há variação da polarizabilidade com o pequeno deslocamento da coordenada q em torno da posição de equilíbrio, ou seja, $((d\alpha/dq)_0 \neq 0)$ (FERRARO; NAKAMOTO; BROWN, 2003; SALA, 2008).

A Figura 7 representa os possíveis processos de espalhamento de luz. Quando a radiação incidente causa a excitação de um sistema, este pode sair de um estado fundamental para um

estado intermediário (nível virtual vibracional) e, ao retornar, decai para o estado fundamental emitindo um fóton com igual frequência, este processo é chamado de espalhamento Rayleigh (Figura 7(a)). No entanto, se o fóton espalhado tem energia menor que a energia do fóton incidente ($h\nu_0 - h\nu_v$), ocorre o espalhamento Raman Stokes (Figura 7(b)). Já no espalhamento Raman anti-Stokes (Figura 7(c)), a radiação incidente excita um sistema, o qual já se encontrava em um estado excitado e ao decair retorna ao estado fundamental, portanto, o fóton espalhado tem energia maior que o fóton incidido ($h\nu_0 + h\nu_v$) (FERRARO; NAKAMOTO; BROWN, 2003).

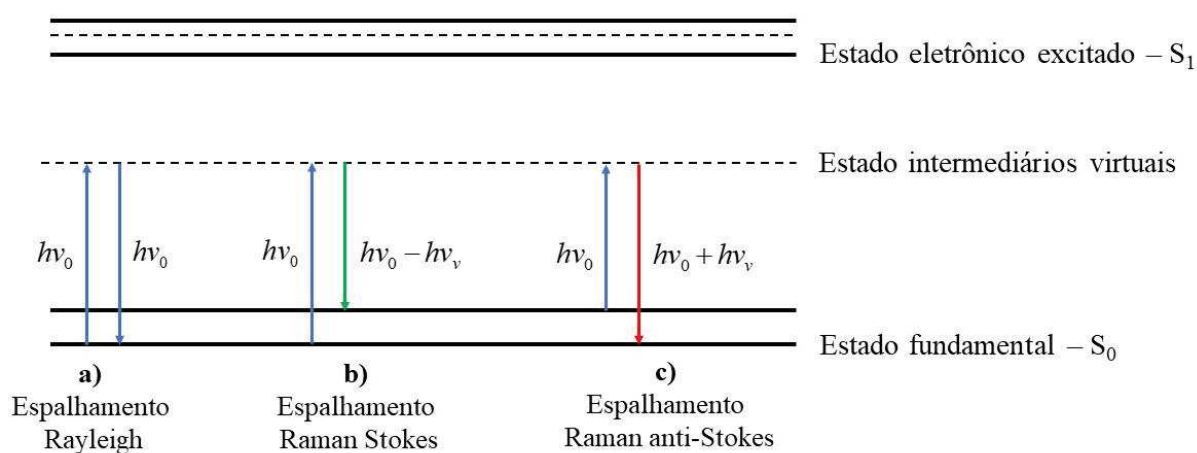


Figura 7 - Representação dos processos de espalhamento de luz em um material. a) Espalhamento Rayleigh, b) Espalhamento Raman Stokes, c) espalhamento Raman anti-Stokes. Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

A teoria clássica prevê que as contribuições para o espalhamento Stokes e anti-Stokes apresentem as mesmas intensidades. Todavia, verifica-se experimentalmente que o espalhamento Stokes é mais intenso. Isso ocorre devido a probabilidade da molécula estar no estado fundamental de energia ser maior do que no estado excitado, vide distribuição de Maxwell-Boltzmann (FERRARO; NAKAMOTO; BROWN, 2003; FOWLES, 1898).

2.4 ESPALHAMENTO RAMAN AMPLIFICADO POR SUPERFÍCIE (SERS)

Como já mencionado, o efeito Raman foi descoberto em 1928, mas a espectroscopia Raman só passou a ser amplamente utilizada como técnica de análise a partir de 1960, com a descoberta e a disponibilidade do uso do *laser* como fonte de excitação. Atualmente, existem mais de 25 modalidades de espectroscopia baseada no efeito Raman, sendo o espalhamento

Raman amplificado por superfície (SERS, do inglês, *Surface-enhanced Raman spectroscopy*) uma dessas modalidades (LONG, 2002; RU; ETCHEGOIN, 2009).

Em uma pesquisa publicada por Fleischmann e colaboradores no ano de 1974, foi relatado espectros Raman com alta relação sinal/ruído obtidos ao analisar moléculas de piridina adsorvida de uma solução aquosa em um eletrodo de prata de aspecto rugoso, submetidos a sucessivos ciclos de oxidação-redução (FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974). Esses pesquisadores atribuíram a melhora do sinal Raman e o aumento da intensidade, cerca de um fator da ordem de 10^6 , ao grande aumento da área superficial do eletrodo e ao número de moléculas adsorvidas. Porém, em trabalhos independentes realizados por Jeanmaire e Van Duyne (JEANMAIRE; VAN DUYNÉ, 1977) e de Albrecht e Creighton (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977), verificou-se que o aumento da intensidade de sinal Raman não poderia ocorrer somente devido ao aumento do número de moléculas adsorvidas na superfície do eletrodo, visto que a área superficial do eletrodo aumentou somente uma ordem de 10^2 . Dessa forma, outras pesquisas foram realizadas na busca de explicar o efeito da amplificação de sinal Raman, o qual ficou conhecido como *Surface-enhanced Raman spectroscopy* (SERS) (AROCA, 2006; MOSKOVITS, 2005; RU; ETCHEGOIN, 2009).

Atualmente são aceitos dois modelos para explicar o efeito SERS, o eletromagnético e o químico, sendo que esses dois modelos se complementam. Basicamente, no modelo eletromagnético à amplificação do sinal Raman da amostra ocorre quando o campo eletromagnético local das nanoestruturas metálicas é intensificado devido a ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR, do inglês, *localized surface plasmon resonance*). No modelo químico a intensificação de sinal é atribuída a transições por transferência de carga entre nanoestruturas metálicas e as moléculas adsorvidas na superfície das nanoestruturas (CARDINAL et al., 2017; OTTO, 2005; RU; ETCHEGOIN, 2009).

2.4.1 Modelo eletromagnético de SERS

No modelo eletromagnético, como já mencionado, a intensificação do sinal Raman resulta da intensificação do campo elétrico próximo a superfície das nanoestruturas metálicas devido a ressonância de plasmon de superfície localizado (AROCA, 2006; RU; ETCHEGOIN, 2009).

O efeito da ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR, do inglês, *localized surface plasmon resonance*) está associado a incidência de luz monocromática (*laser*) em nanoestruturas metálicas, as quais possuem tamanho menor que o comprimento de onda

incidente. Como representado na Figura 8, os elétrons livres na superfície da nanoesfera de metal podem ser induzidos a oscilarem quando excitados com uma radiação de frequência ω e amplitude \vec{E}_ω . A oscilação periódica leva a uma separação de carga transitória na partícula metálica, dando origem a um dipolo induzido oscilante ou LSPR (AROCA, 2006; CHEN et al., 2014; RU; ETCHEGOIN, 2009).

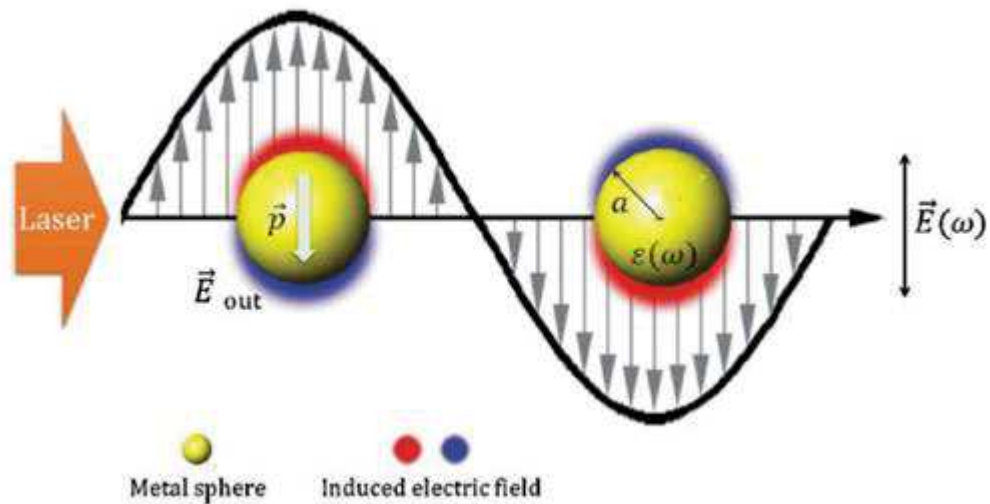


Figura 8 - Representação da ressonância de plasmon de superfície localizado. Fonte: adaptado de (CHEN et al., 2014).

O efeito LSPR varia de acordo com o tamanho, forma e características dielétricas das nanoestruturas metálicas (CHEN et al., 2014; GARCÍA-VIDAL; PENDRY, 1996; KLEINMAN et al., 2013). No caso de esferas metálicas com raio (a) muito menor do que o comprimento de onda incidente ($a \ll \lambda$) (Figura 8), o modelo de Drude combinado com a aproximação quase-estática pode ser usado para descrever a resposta eletrodinâmica do efeito LSPR (CHEN et al., 2014). Portanto, em uma nanoestrutura esférica a magnitude do dipolo (\vec{p}) gerada pela influência do campo elétrico é proporcional à permissividade do meio circundante (ϵ_m), a polarizabilidade da esfera metálica (α) e a intensidade do campo elétrico incidente $\vec{E}(\omega)$, logo,

$$\vec{p} = \epsilon_m \alpha \vec{E} \quad \text{Eq. 1.24}$$

A polarizabilidade da esfera metálica é expressa por:

$$\alpha = 4\pi\epsilon_0 a^3 \frac{\epsilon(\omega) - \epsilon_m}{\epsilon(\omega) + 2\epsilon_m} \quad \text{Eq. 1.25}$$

Sendo, ε_0 e $\varepsilon(\omega)$ representam a permissividade do vácuo e do metal, respectivamente. Dessa forma, verifica-se que a LSPR ocorre quando $\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_m \rightarrow 0$, resultando em $\alpha \rightarrow \infty$ (CHEN et al., 2014; RU; ETCHEGOIN, 2009).

O valor da permissividade dos metais $\varepsilon(\omega)$ é uma função complexa da frequência da luz incidente, e leva em consideração a parte real $\varepsilon_1(\omega)$ e a imaginária $\varepsilon_2(\omega)$, logo :

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega) \quad \text{Eq. 1.26}$$

sendo,

$$\varepsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{1 + \omega^2\tau^2} \quad \text{Eq. 1.27}$$

$$\varepsilon_2(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2\tau}{\omega(1 + \omega^2\tau^2)} \quad \text{Eq. 1.28}$$

O τ corresponde ao tempo de relaxação do elétron livre, $\gamma = 1/\tau$ é a frequência de amortecimento e ω_p é a frequência do plasma da nanoesfera de metal. Assim, a condição ressonante pode ser obtida, desde que a parte real seja $\varepsilon_1(\omega) = -2\varepsilon_m$, e a parte imaginária, $\varepsilon_2(\omega) = 0$ (AROCA, 2006; RU; ETCHEGOIN, 2009).

A frequência de ressonância ω_{LSPR} é determinada tanto pela frequência de esfera metálica, ω_p , quanto pelo ambiente dielétrico ε_m , desse modo,

$$\omega_{LSPR} \approx \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + 2\varepsilon_m}} \quad \text{Eq. 1.29}$$

2.4.2 Modelo químico de SERS

A intensificação do espalhamento Raman no modelo químico resulta da interação eletrônica do adsorbato com a nanoestrutura metálica. Essa interação causa a formação de complexos de superfícies, ou seja, ocorre transições por transferência de carga entre os orbitais moleculares do adsorbato e os elétrons das bandas do metal (AROCA, 2006; CORIO et al., 1999; RU; ETCHEGOIN, 2009).

Como representado na Figura 9, após o adsorbato interagir com a superfície da nanoestrutura metálica, o nível de Fermi do metal se encontra entre o orbital HOMO (orbital molecular de maior energia ocupado) e o orbital LUMO (orbital molecular de menor energia desocupado) do adsorbato. A incidência de radiação com comprimento de onda ressonante, pode gerar a transição de transferência de carga entre o orbital HOMO do adsorbato e o nível

de Fermi do metal ou entre o nível de Fermi do metal e o orbital LUMO do adsorbato (LONG, 2002; RU; ETCHEGOIN, 2009).

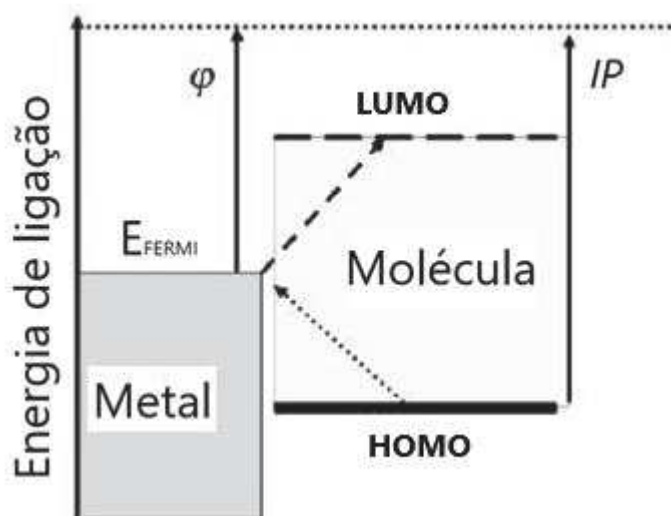


Figura 9 - Diagrama de energia ilustrando a banda de energia de nanoestruturas metálicas e os orbitais HOMO e LUMO das moléculas adsorvidas. ϕ é a função trabalho do metal e IP é o potencial de ionização do adsorbato. Fonte: adaptado de (AROCA, 2006).

No modelo químico, a transferência de carga entre metal-molécula em ressonância com a radiação incidente além de gerar o efeito SERS, pode causar alterações no perfil espectral da espécie adsorvida, quando este é comparado com o espectro Raman da molécula sem adsorção. O deslocamento de bandas é um exemplo de alteração (F. S. ANDRADE; BROLO; TEMPERINI, 2008; HUANG et al., 2012). A intensificação do sinal Raman prevista pelo modelo químico é consideravelmente menor, quando comparado com o modelo eletromagnético, ficando limitada a uma intensificação da ordem de 10^2 (AROCA, 2006; RU; ETCHEGOIN, 2009).

2.4.3 Efeito da interação de um conjunto de nanoestruturas

Pesquisas mostram que as propriedades como tamanho, formato e padrão de agregação das nanoestruturas metálicas, são importantes na intensificação do efeito SERS (GARCÍA-VIDAL; PENDRY, 1996; KLEINMAN et al., 2013).

A proximidade entre as nanoestruturas metálicas pode gerar no interstício dessas nanoestruturas sítios de intensificação do campo elétrico, os quais são chamados de *hot spots*. Em condições específicas, os *hot spots* tendem a intensificar o efeito SERS associado principalmente ao modelo eletromagnético. De acordo com a literatura (GARCÍA-VIDAL;

PENDRY, 1996), a eficiência do efeito SERS pode ser melhorada através dos *hot spots*, ou seja, devido a condições ideais de proximidade entre o raio da nanoestrutura metálica, R , e a distância entre as nanoestruturas, d , como representado na Figura 10.

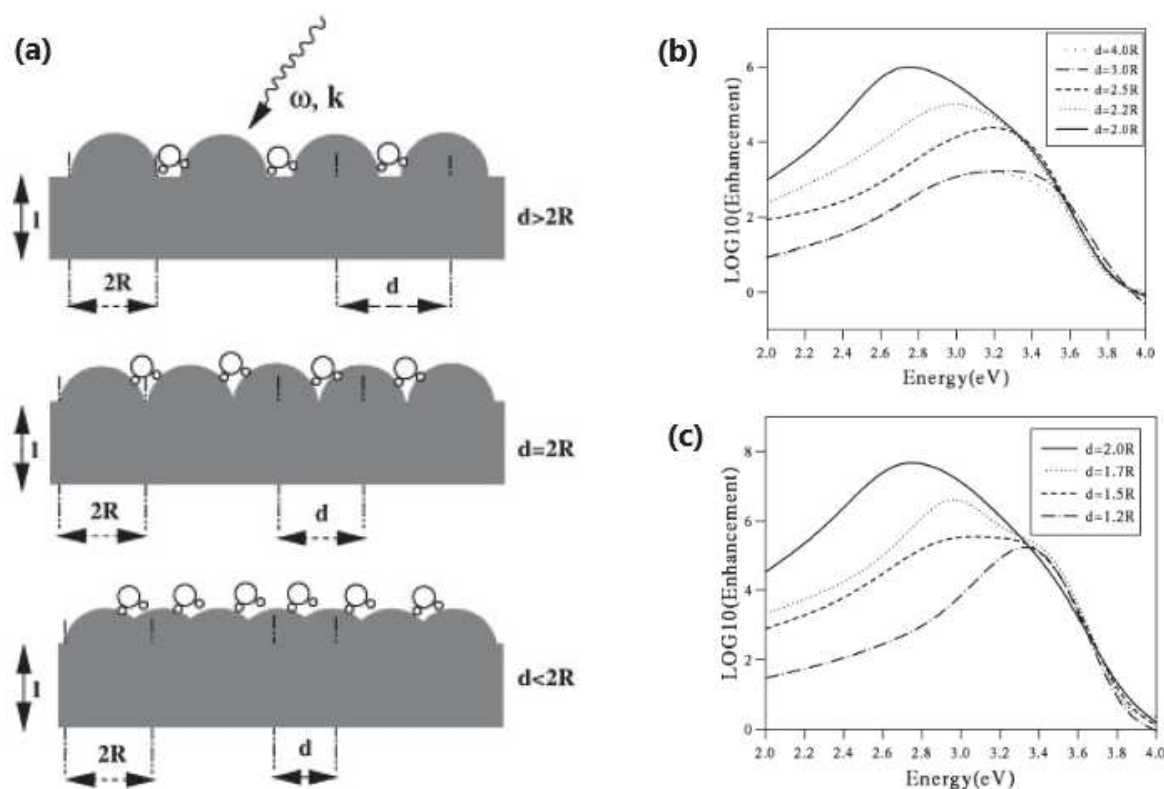


Figura 10 - (a) Superfícies formadas por cadeias de semicilindros de prata espaçados por uma distância, d , sobre uma placa de prata de espessura, $l = 2R$. Resultados teóricos do efeito SERS, quando a cadeia de semicilindros tem (b) $d \geq 2R$ e (c) $d \leq 2R$. Fonte: (GARCÍA-VIDAL; PENDRY, 1996).

Os resultados teóricos das Figura 10(b) e (c), indicam que a maior intensificação do efeito SERS ocorre quando a distância entre as nanoestruturas é igual a duas vezes o raio da nanoestrutura ($l = 2R$). Além disso, quando as nanoestruturas estão com distância de $d = 3R$ e $d = 4R$, o efeito SERS resultante apresenta comportamento semelhante, indicando que dependendo da distância entre as nanoestruturas, não há formação de *hot spots* nos substratos (GARCÍA-VIDAL; PENDRY, 1996)

2.5 ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise multivariada é um campo interdisciplinar que envolve estatística multivariada, modelagem matemática, ciência da computação e química analítica (FERREIRA, 2015;

FERREIRA et al., 1999; GEMPERLINE, 2006). O termo quimiometria foi usado pela primeira vez em 1971 para descrever a crescente utilização de modelos matemáticos, princípios estatísticos e outros métodos baseados em lógica, que estavam sendo utilizados no campo da química analítica (BRUNS; FAIGLE, 1985; GEMPERLINE, 2006). No entanto, a quimiometria consagrou-se somente alguns anos depois, com o aumento na capacidade de processamento dos computadores e a implementação desses métodos em equipamento de laboratório (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; GEMPERLINE, 2006; KOWALSKI, 1975).

A análise multivariada tem aplicações em diversas áreas, como a análise exploratória de dados, calibração multivariada, processamento de sinais analíticos, planejamento e otimização de experimentos, monitoramento e modelagem de processos multivariados, inteligência artificial, entre outros. (BRUNS; FAIGLE, 1985; GEMPERLINE, 2006)

As técnicas de análise exploratória de dados permitem revelar padrões ou tendências em dados complexos, reduzem informações para uma forma mais compreensível e permitem identificar possíveis *outliers* (dados que se diferenciam drasticamente de todos os outros) (GEMPERLINE, 2006). Métodos exploratórios como a análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) e a análise hierárquica de cluster (HCA, do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*) são exemplos de métodos que permitem reduzir grandes conjuntos de dados complexos em uma série de tamanhos otimizados e interpretáveis (BRERETON, 2007; LYRA et al., 2010).

Nos métodos exploratórios os dados para análise são organizados de forma que um conjunto de dados (espectros) de determinadas amostras (a_1, a_2, \dots, a_m), são convertidos em uma matriz de dados X com dimensão $m \times n$, sendo m corresponde aos valores das amostras (absorbância, intensidade, etc) e n as variáveis (números de onda, Raman *shift*, etc), como representado na Figura 11 (GEMPERLINE, 2006).

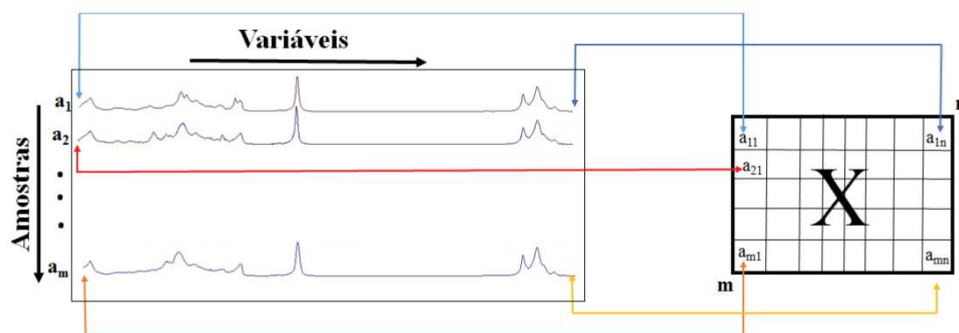


Figura 11 - Representação da organização dos dados em métodos de análise exploratória. Fonte: (GONTIJO, 2016)

Com relação aos métodos de calibração, estes permitem construir modelos de predição quantitativos de determinados constituintes em amostras (GEMPERLINE, 2006). Os métodos de calibração podem ser classificados devido à complexidade ou dimensionalidade dos dados da amostra analisada, assim sendo, há a calibração de ordem zero, de primeira ordem e de segunda ordem. Os métodos de ordem zero são utilizados na análise de um único valor de medida experimental por amostra, ou seja, é uma calibração univariada. Nos métodos de segunda ordem são construídos sistemas que geram uma matriz de dados por amostra, ou seja, uma matriz de dados de dimensões $(j \times k)$ (colunas \times linhas) é obtida para cada amostra e, para a análise de “ i ” amostras é obtido um tensor de dados X com dimensões $(i \times j \times k)$. (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009)

Os métodos de calibração de primeira ordem consistem de vetores de medidas instrumentais para cada amostra. Exemplos desse tipo de método são a regressão de componentes principais e a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Squares*) (GEMPERLINE, 2006; OLIVIERI, 2018; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

Nas seções seguintes serão apresentados os métodos PCA e PLS, os quais foram utilizados neste trabalho.

2.5.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

O método de análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*) foi desenvolvido por Pearson em 1901 (PEARSON, 1901) e de forma independente por Hotelling em 1933 (HOTELLING, 1933). Porém, seu uso só teve início nos anos 70, quando começou a ser usado como método de análise qualitativo. A PCA permite revelar a existência de amostras anômalas, de relações entre as variáveis medidas ou relações de agrupamentos

entre amostras, reduzindo a dimensão dos dados originais e facilitando a sua observação. (BRERETON, 2007; FERREIRA et al., 1999; LYRA et al., 2010)

O processo de redução dos dados originais e formação das componentes principais da PCA é representado na Figura 12. A partir de uma matriz de dados X , esta é decomposta em duas matrizes, sendo uma matriz de *scores* (T) e uma matriz de *loadings* (P). Os *scores* carregam a informação das amostras, informando se existe similaridade ou não entre as amostras. Já os *loadings* (pesos) são os cossenos dos ângulos entre as variáveis originais e os componentes principais (PC), representando, portanto, o quanto cada variável original contribui para uma determinada PC. A matriz de resíduos (E) é gerada durante o processamento e engloba as variâncias não explicadas (BRERETON, 2007; LYRA et al., 2010; WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). A matriz de dados X é organizada de forma que cada linha m corresponda à uma amostra e cada coluna n corresponda a variável da amostra (Figura 11).

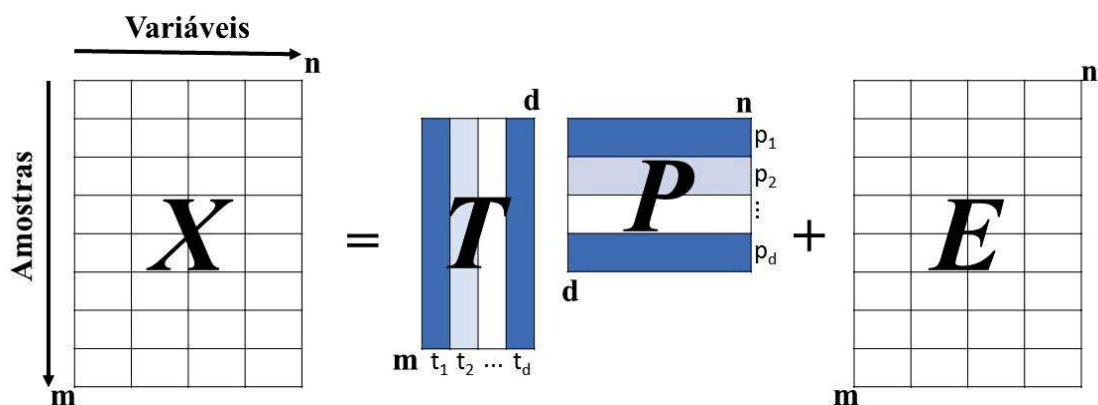


Figura 12 - Representação gráfica da decomposição da matriz X no modelo PCA, sendo X é a matriz de dados com n linhas (amostras) por m colunas (números de onda), T é a matriz de *scores*, P é a matriz de *loadings* e E é a matriz de resíduos. Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

A decomposição da matriz X durante a PCA pode ser representada matematicamente pela seguinte equação:

$$X = TP^T + E \quad \text{Eq. 1.30}$$

ou,

$$X = \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{p}_2^T + \dots + \mathbf{t}_d \mathbf{p}_d^T + E \quad \text{Eq. 1.31}$$

sendo as colunas $\mathbf{t}_1 \dots \mathbf{t}_d$ são os vetores de *scores* e as linhas $\mathbf{p}_1 \dots \mathbf{p}_d$ são os vetores de *loadings* (BRERETON, 2007; FERREIRA et al., 1999; LYRA et al., 2010).

O processo de decomposição da matriz X em matrizes de *scores*, de *loading* e o cálculo das componentes principais, são realizados por *softwares* como o OriginLab, The Unscrambler X, Matlab, R, entre outros. Os *softwares* já contêm diversos algoritmos específicos para a

análise, sendo os algoritmos mais utilizados a decomposição de valor singular (SVD, do inglês, *single value decomposition*) e os mínimos quadrados parciais iterativos não lineares (NIPALS, do inglês, *non-linear iterative partial least squares*). Estes dois algoritmos levam aos mesmos resultados dentro da precisão computacional. Entretanto, no método SVD são estimadas todas as componentes principais simultaneamente, enquanto no método NIPALS as componentes principais são calculadas uma a uma, na ordem da proporção explicada das variações espectrais em \mathbf{X} , até um certo número pré-estabelecido de componentes (FERREIRA et al., 1999; LYRA et al., 2010; WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987). Neste trabalho não será descrito os algoritmos usados na PCA, porém mais informações dos algoritmos pode ser encontrado em (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

Neste estudo os resultados de PCA foram obtidos utilizando o *software* The Unscrambler X, versão 10.4, configurado com o algoritmo SVD.

As componentes principais obtidas na PCA são ortogonais entre si e ordenadas em termos de maior variância, ou seja, em termos da maior informação. Deste modo a primeira componente principal aponta a direção da maior variância e contém mais informações. A segunda componente principal possui um valor de variância menor e menos informação do que a primeira componente e, assim, sucessivamente. A Figura 13 representa graficamente as duas componentes principais que possuem maior variância, sendo a PC1 e a PC2. Observa-se que as componentes principais descrevem a variação, ou seja, o espalhamento entre os pontos (amostras) usando o menor número possível de eixos. Desta forma, a PC1 tem direção tal que descreve o máximo de espalhamento das amostras, mais do que a descrição dada pelas variáveis originais (λ_1 e λ_2) (BRERETON, 2007; FERREIRA et al., 1999).

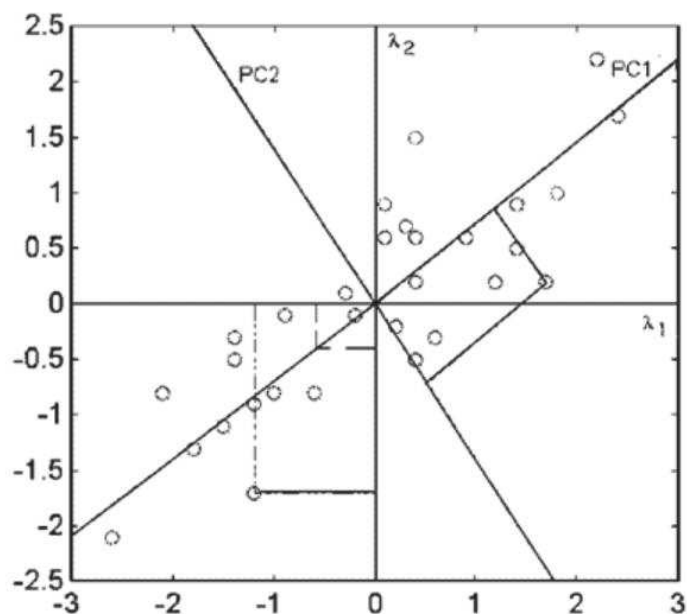


Figura 13 - Gráfico representativo de um conjunto de dados bidimensionais alinhado aos eixos das componentes principais (PC1 e PC2). Fonte: (FERREIRA et al., 1999)

2.5.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O método de análise por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, *Partial Least Squares*) foi desenvolvido pelo economista e estatístico H. Wold, na década de 1960 (GEMPERLINE, 2006; MATEOS-APARICIO, 2011). No entanto, o uso do método só ganhou importância em análises químicas no final da década de 1970, com os pesquisadores S. Wold e H. Martens (GEMPERLINE, 2006).

A regressão PLS é um método de análise comumente utilizado na construção de modelos de calibração. Esse método é considerado mais eficiente para lidar com ruídos experimentais, dados colineares e não lineares, quando comparado com métodos como a regressão linear múltipla (MRL, do inglês, *Multiple Linear Regression*) ou o método clássico de mínimos quadrados (CLS, do inglês, *Classical Least Squares*). Outra vantagem do PLS é a possibilidade de realizar previsões sem o conhecimento exato de todos os componentes presentes nas amostras ou de realizar na presença de interferentes, desde que estes também estejam inclusos na construção do modelo (FERREIRA et al., 1999; GEMPERLINE, 2006; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

A regressão PLS consiste em correlacionar duas matrizes de dados através de um modelo linear, modelando as estruturas destas matrizes. A Figura 14 representa as matrizes de dados geradas no método PLS. As variáveis independentes (espectros) são organizadas em uma matriz de dados X (semelhante à Figura 11), a qual é decomposta em duas matrizes, sendo uma matriz

T (scores) e uma matriz P (loadings). O processo de decomposição de matriz é semelhante ao método PCA, porém, no método PLS os dados são reduzidos gerando um espaço de variáveis latentes (LVs). De forma similar, a matriz Y contendo as variáveis dependentes (concentrações) é decomposta em uma matriz de scores U e de loadings Q (FERREIRA et al., 1999; GEMPERLINE, 2006; OLIVIERI, 2018).

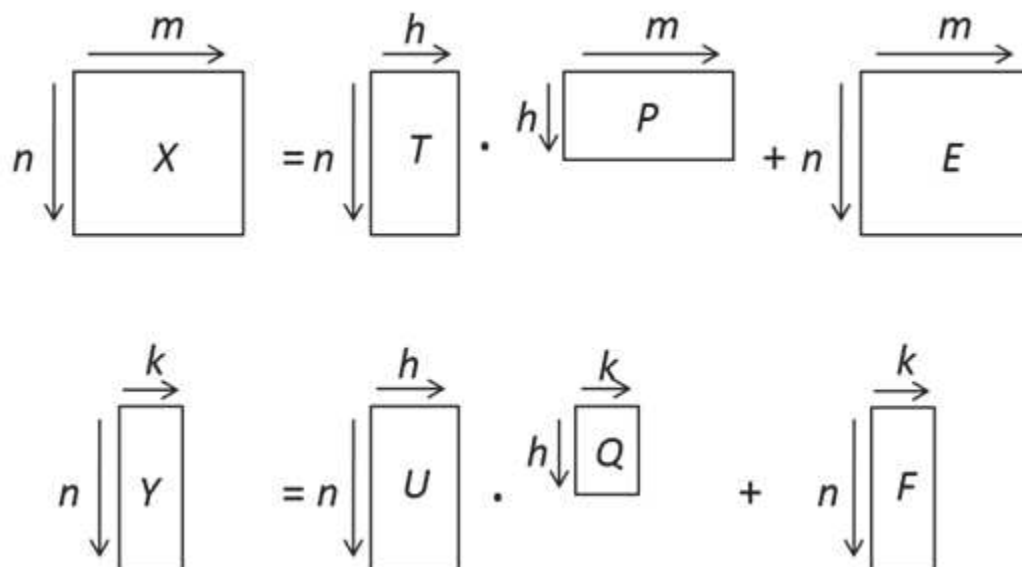


Figura 14 - Representação gráfica da decomposição das matrizes de X e Y em variáveis latentes para o modelo de regressão por PLS. Fonte: Adaptada de (BRERETON, 2007).

As etapas da PLS podem ser representadas matematicamente por (GEMPERLINE, 2006; OLIVIERI, 2018):

$$X = TP^T + E \quad \text{Eq. 1.32}$$

$$Y = UQ^T + F \quad \text{Eq. 1.33}$$

sendo, E e F referem-se aos resíduos das matrizes X e Y , respectivamente. No método PLS as matrizes X e Y são decompostas em matrizes de scores T e U , respectivamente. A partir das matrizes de scores é construída uma relação linear entre essas matrizes, correlacionando as informações das variáveis independentes com as variáveis dependentes. Essa correlação é representada por:

$$U = T\beta \quad \text{Eq. 1.34}$$

sendo β o vetor de regressão. .

Os cálculos no método PLS também são realizados por softwares como o OriginLab, The Unscrambler, Minitab, R, entre outros. Os algoritmos mais utilizados no desenvolvimento dos modelos PLS são: SVD, Kernel, NIPALS para PLS e SIMPLS (WOLD; SJÖSTRÖM;

ERIKSSON, 2001; ZIMMER; ANZANELLO, 2013). Uma descrição detalhada dos algoritmo utilizado no método PLS pode ser encontrada nas referências (ANDERSSON, 2009; OLIVIERI, 2018; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001)

Neste trabalho os modelos PLS foram gerados utilizando o software OriginLab versão 2018. Os algoritmos selecionados para os cálculos foram o SVD e a validação cruzada com o método *leave-one-out*.

A validação dos resultados do PLS assegurando a confiabilidade e a qualidade dos resultados obtidos, pode ser realizada analisando parâmetros, como (OLIVIERI, 2018; VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009; WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001):

(i) A raiz do erro quadrático médio (em inglês, *root mean square error* - RMSE), dado por:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad \text{Eq. 1.35}$$

sendo, \hat{y}_i é o grau de concordância do valor estimado, y_i é o valor considerado como verdadeiro (referência) e N é o número de amostras. Dessa forma, a partir da Eq. 1.35 pode-se calcular a raiz do erro quadrático médio da calibração (RMSEC, do inglês, *root mean square error of calibration*) e a raiz do erro quadrático médio da predição (RMSEP, do inglês, *root mean square error of prediction*), os quais são referentes aos conjuntos de dados utilizados no modelo PLS para a calibração e a predição (ou validação) dos resultados.

(ii) Erro relativo percentual (ER (%)): calcula a imprecisão de uma medida. O erro relativo é a razão entre o erro absoluto, $(y_i - \hat{y}_i)$, pela magnitude do valor exato, logo:

$$ER(\%) = \frac{(y_i - \hat{y}_i)}{(y_i)} \times 100 \quad \text{Eq. 1.36}$$

(iii) Coeficiente de determinação (R^2): este consiste em avaliar o grau de ajuste do modelo a partir da relação linear dos valores preditos na calibração (ou validação) pelos valores de referências.

2.5.3 Normalização

Antes de utilizar métodos de análise multivariada é importante que os dados sejam submetidos a um pré-processamento, ou seja, uma normalização. A normalização de dados é necessária principalmente quando os dados apresentam unidades de medidas diferentes ou são dados espectrais sem o devido tratamento, por exemplo, correção da linha de base (GEMPERLINE, 2006). Como métodos de normalização, temos:

- i) Normalização com variância 1 e média 0 (zero):

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij} - \overline{X_j}}{\sigma(X_j)}, \quad i=1, 2, \dots, n \text{ e } j=1, 2, \dots, k \quad \text{Eq. 1.37}$$

- ii) Normalização com variância 1 e média qualquer:

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij}}{\sigma(X_j)}, \quad i=1, 2, \dots, n \text{ e } j=1, 2, \dots, k \quad \text{Eq. 1.38}$$

- iii) Derivação: a aplicação da derivada de primeira ou de segunda ordem nos dados espectrais, além de dimensionar os dados, também realça as regiões do espectro que apresentam bandas, permitindo em alguns casos, uma melhor comparação entre os espectros (FORATO; BERNARDES FILHO; COLNAGO, 1998; GEMPERLINE, 2006).

3 OBJETIVOS

Este trabalho inicia-se com o objetivo de caracterizar os componentes químicos presentes em uma amostra de leite bovino cru e em uma amostra de leite caprino cru, através das técnicas de espectroscopia vibracional, Raman e de infravermelho (médio e próximo), além de analisar as diferenças existentes na composição desses dois tipos de leite.

Neste trabalho também busca-se avaliar a viabilidade do uso das técnicas de espectroscopia Raman e de infravermelho associadas a técnicas de análise multivariada, como métodos alternativos de identificação de fraude do leite caprino cru adulterado com a adição de leite bovino cru., a saber: Análise de Componentes Principais (PCA) e de regressão por Mínimos Quadrados Parciais.

Amplificar o sinal Raman de uma amostra de leite bovino pasteurizado tipo A, o qual foi depositado em substratos SERS ativos contendo nanoestruturas de prata, que foram produzidos pelo método *bottom-up*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os materiais e os métodos adotados no preparo das amostras de leite caprino cru adulteradas com a adição de leite bovino cru. Também é detalhado o processo de produção dos substratos vítreos dopados com íons de prata, os quais foram utilizados no estudo do efeito SERS do leite bovino pasteurizado. Além disso, são descritas as especificações dos equipamentos utilizados.

4.1 AMOSTRAS CRUAS DE LEITE BOVINO E LEITE CAPRINO

As amostras de leite cru (*in natura*) coletadas de uma vaca e de uma cabra, foram fornecidas pela fazenda Cabriola, localizada em Coronel Pacheco - MG, há 30 km de Juiz de Fora - MG. Com essas amostras foram realizadas dois estudos, sendo: o estudo da composição do leite bovino cru (LB) *versus* leite caprino cru (LC), apresentado na seção 5.1, e o estudo de identificação da fraude no leite caprino cru com a adição de leite bovino cru, discutido na seção 5.2. No segundo estudo, as amostras de leite caprino cru foram adulteradas com a adição do leite bovino cru seguindo as proporções mostradas na Tabela 3.

Após a coleta (ordenha) dos leites caprino e bovino, as amostras foram armazenadas em frascos estéreis e transportados sob refrigeração até o laboratório para a realização da adulteração. A adulteração nas amostras de leite consistiu em misturar determinados volumes de leite bovino em leite caprino, de acordo com as porcentagens apresentadas na Tabela 3. Cada amostra adulterada ficou com um volume total de 50 mL. Após o preparo das amostras adulteradas, essas foram armazenadas em um recipiente com gelo e enviadas para o Laboratório de Espectroscopia de Materiais da UFJF. As etapas de ordenha e preparo das amostras adulteradas foram realizadas por responsáveis técnicos da fazenda Cabriola.

Tabela 3 - Porcentagem de adulteração do leite caprino cru (LC) com a adição de leite bovino cru (LB).

<i>Lote 1</i>	<i>Lote 2</i>
LC_100%	LC_100%
LC_90% / LB_10%	LC_98% / LB_02%
LC_80% / LB_20%	LC_96% / LB_04%
LC_70% / LB_30%	LC_94% / LB_06%
LC_60% / LB_40%	LC_92% / LB_08%
LC_50% / LB_50%	LC_90% / LB_10%
LC_40% / LB_60%	LC_88% / LB_12%
LC_30% / LB_70%	LC_86% / LB_14%
LC_20% / LB_80%	LC_84% / LB_16%
LC_10% / LB_90%	LC_82% / LB_18%
LB_100%	LC_80% / LB_20%
	LC_78% / LB_22%
	LC_76% / LB_24%
	LC_74% / LB_26%
	LC_72% / LB_28%
	LC_70% / LB_30%
	LC_68% / LB_32%
	LC_66% / LB_34%
	LC_64% / LB_36%
	LC_62% / LB_38%
	LC_60% / LB_40%

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Observa-se na Tabela 3 que as amostras do **lote 1** apresentam passos de adulteração de 10%. Este intervalo foi escolhido com o intuito de verificar a sensibilidade do equipamento Raman e a capacidade dos métodos de análise multivariada utilizados neste trabalho em diferenciar e quantificar a adulteração entre as amostras de leite. Com base nos resultados das amostras do **lote 1**, as amostras do **lote 2** foram preparadas com passos de adulteração de 2%. O estudo deste novo lote teve como objetivo confirmar as conclusões obtidas com o **lote 1**, e verificar se os mesmos métodos de análise multivariada adotados tinham capacidade de detectar e diferenciar as amostras de leite com menores porcentagens de adulteração.

É importante ressaltar que os **lotes 1 e 2** foram coletados e enviados para estudo em dias diferentes, entretanto, as medidas de espectroscopia MIR, NIR e Raman, foram realizadas no mesmo dia em que os leites foram coletados.

As medidas de espectroscopia Raman foram realizadas depositando 5 μ L de cada amostra da Tabela 3 em uma lâmina de vidro e deixadas secar a temperatura ambiente (~ 23 °C). Para a homogeneização das amostras, estas foram submetidas a uma simples agitação manual

antes de serem depositadas na lâmina. As medidas Raman só foram realizadas depois que as amostras secaram na lâmina. Nas amostras do **lote 1** foram realizadas medidas Raman em triplicata, totalizando 33 amostras. Já nas amostras do **lote 2** foram realizadas medidas Raman em quintuplicata, totalizando 105 amostras. As medidas foram realizadas com um laser com comprimento de onda de excitação de 488 nm e com tempo de aquisição de 300 segundos.

As espectroscopias MIR e NIR foram usadas somente na análise das amostras do **lote 2**. As medidas foram feitas com as amostras de leite no estado líquido e em temperatura ambiente (~23 °C). Nesta análise, a homogeneização das amostras também foi realizada com uma simples agitação manual. Para cada medida foi depositado 5 µL de amostra diretamente no porta amostra dos equipamentos MIR e NIR. Foram realizadas medidas em triplicata para cada amostra.

4.2 SUBSTRATOS SERS ATIVOS UTILIZADOS NO ESTUDO DO EFEITO SERS EM LEITE BOVINO PASTEURIZADO

No estudo da amplificação de sinal Raman em leite bovino pasteurizado, foram utilizados substratos vítreos de borofosfatos com nanoestruturas de prata como material amplificador de sinal Raman. Os substratos foram preparados e doados pelo professor Ricardo Schneider do departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). A descrição do método de preparação dos substratos encontra-se na seção 4.2.1.

O leite bovino pasteurizado utilizado como amostra no estudo do efeito SERS (seção 5.3), foi comprado em uma loja de conveniências na cidade de Juiz de Fora - MG. Portanto, para o estudo foi comprado o leite bovino pasteurizado do tipo A da marca Marvin, o qual foi usado sem nenhum tratamento adicional. As informações nutricionais desse leite são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 - Informações nutricionais do leite bovino pasteurizado tipo A da marca Marvin.

<i>Quantidade por porção de 200 mL do leite tipo A</i>			
Valor energético	120kcal/504KJ	Colesterol	25 mg
Carboidratos	9 g	Fibras alimentar	0
Proteínas	7 g	Cálcio	238 g
Gorduras totais	7 g	Sódio	98 g
Gorduras saturadas	4g	Ferro	0,3
Gorduras trans	0		

Fonte: (MARIA, [s.d.]

Os substratos vítreos utilizados foram divididos em lotes de acordo com a porcentagem de dopagem, sendo 1%, 3% e 6% de íons de prata (Tabela 5). Com o objetivo de formar nanoestruturas na superfície dos substratos, estes foram submetidos a um tratamento térmico, ou seja, um processo de recozimento a 300 °C durante os tempos de 1, 3, 5, 8 e 11 minutos (seção 4.2.1).

Tabela 5: Descrição dos substratos vítreos de borofosfatos dopados com prata (Ag).

<i>Tempo de recozimento (minutos)</i>	<i>Lote de 1%Ag300</i>	<i>Lote de 3%Ag300</i>	<i>Lote de 6%Ag300</i>
1	1%Ag300-1	3%Ag300-1	6%Ag300-1
3	1%Ag300-3	3%Ag300-3	6%Ag300-3
5	1%Ag300-5	3%Ag300-5	6%Ag300-5
8	1%Ag300-8	3%Ag300-8	6%Ag300-8
11	1%Ag300-11	3%Ag300-11	6%Ag300-11

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

As amostras foram preparadas depositando 1 µL de leite bovino pasteurizado em cada substrato vítreo (Tabela 5) e também em uma lâmina de vidro. A amostra de leite depositada na lâmina de vidro serviu como referência na comparação dos espectros Raman do leite pasteurizado com efeito SERS (seção 805.3). Após o leite depositado nos substratos e na lâmina de vidro secarem a temperatura ambiente (~23 °C), as medidas Raman foram feitas em triplicata para cada amostra.

4.2.1 Produção dos substratos vítreos

As matrizes vítreas de borofosfato contendo as nanoestruturas metálicas de prata (substrato SERS ativo) foram obtidas através do método *bottom-up*. Esse método consiste em adicionar um material precursor na composição da matriz vítrea. Após a síntese da matriz vítrea, essa é submetida a um tratamento térmico de recozimento, com temperatura e atmosfera controlada. O processo de recozimento da matriz vítrea resulta na liberação de íons de metais de transição, ou seja, os íons do material precursor são ativados termicamente migrando para a superfície. A atmosfera controlada causa uma redução dos íons, iniciando a nucleação. Dessa forma, ocorre o crescimento/coalescência das nanoestruturas metálicas na superfície do substrato vítreo (PEREIRA et al., 2016; SCHNEIDER, 2012).

A representação esquemática do processo *bottom-up* é mostrada na Figura 15. O uso do processo *bottom-up* na fabricação de substratos SERS ativos, tem como vantagem o controle da morfologia e da distância entre as nanoestruturas metálicas formadas. Esse controle é

realizado através da variação do tempo e/ou da temperatura de recozimento do substrato, e também de acordo com o gás redutor utilizado (SCHNEIDER et al., 2014).

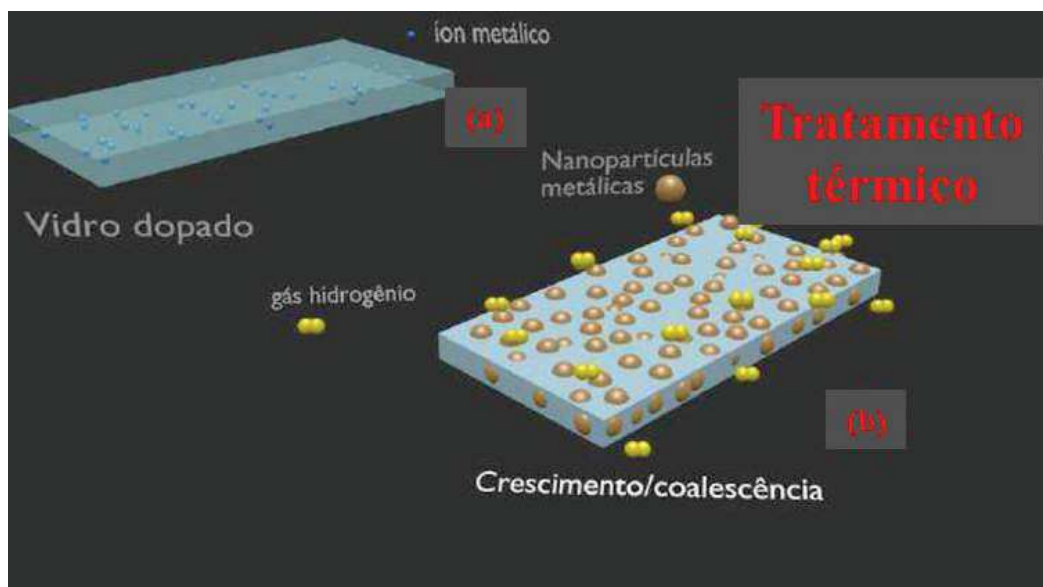


Figura 15 - Representação esquemática do processo *bottom-up*. (a) Matriz vítrea dopada com íons de metais de transição. (b) Os íons de metais de transição migram para a superfície da matriz vítrea com o tratamento térmico, sendo reduzidos a um estado metálico sob atmosfera de hidrogênio. Fonte: adaptado de (PEREIRA et al., 2016).

No preparo dos substratos vítreos com nanoestruturas de prata, a matriz vítrea de borofosfato foi desenvolvida com razão molar de fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4) por ácido bórico (H_3BO_3) igual a dois, ou seja, $(\text{NaH}_2\text{PO}_4)/(\text{H}_3\text{BO}_3) = 2$. Uma das vantagens do uso do H_3BO_3 no desenvolvimento de vidros é o baixo custo de aquisição, quando comparado com o dióxido de germânio GeO_2 . No entanto, vidros a base de fosfato e borato apresentam alta sensibilidade a moléculas de água, podendo sua matriz vítrea ser atacada quimicamente quando em contato com a umidade do ar (BELUSSO et al., 2019; BROW, 1993). Devido a essa desvantagem, estudos tem sido realizados adicionando porcentagem em mol de óxido de alumínio (Al_2O_3) à composição da matriz vítrea de borofosfato. A adição do Al_2O_3 à composição da matriz vítrea resulta na formação de íons trivalentes (Al^{+3}) durante a síntese, gerando um aumento da resistência química do vidro a base de borofosfato, e permitindo que esses sejam expostos à umidade por longos períodos de tempo, sem sofrer alteração nas suas propriedades (BELUSSO et al., 2019; BROW, 1993). Em um estudo realizado por Pereira, A. J. (PEREIRA, 2016), vidros de borofosfatos contendo 0%, 5%, 10% e 15% em mol de Al_2O_3 na composição da matriz vítrea, foram submetidos a uma atmosfera com umidade relativa de

75%. Observa-se na Figura 16 que os vidros com 10% e 15% em mol de Al_2O_3 , não apresentam aumento da massa após 24 horas de exposição.

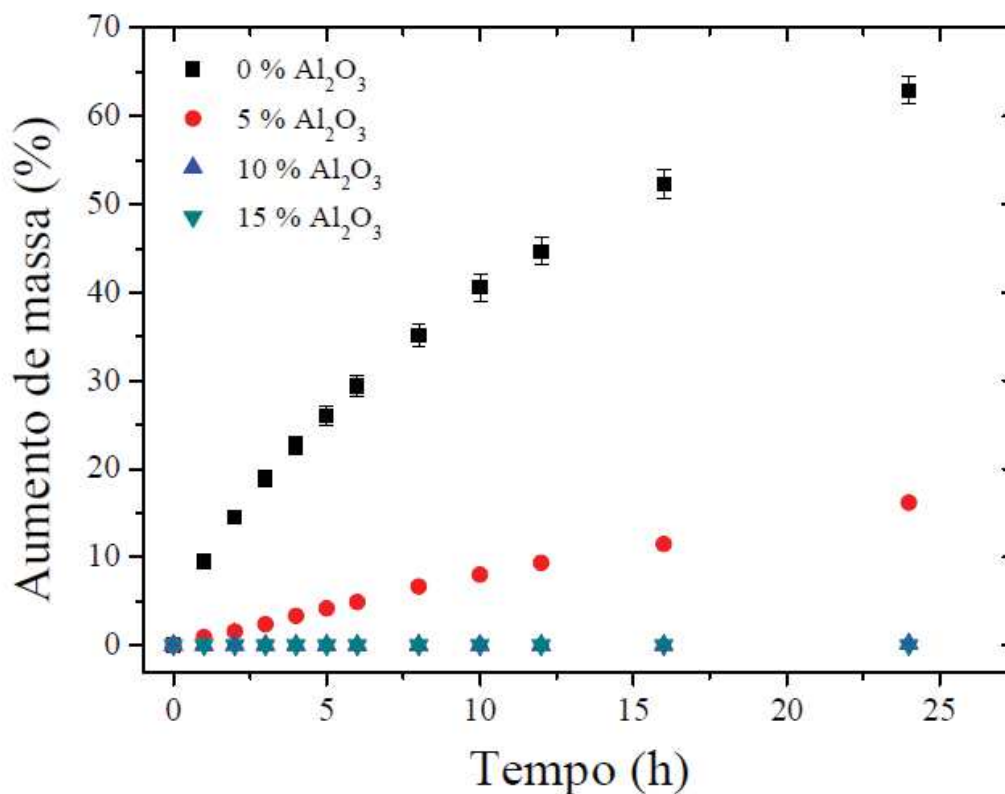


Figura 16 - Comparação do aumento de massa (absorção de água) de vidros contendo diferentes concentrações de Al_2O_3 em função do tempo de exposição a uma umidade relativa do ar de 75%. Fonte: (PEREIRA, 2016)

Neste trabalho os substratos vítreos de borofosfato utilizados foram produzidos com a adição de Al_2O_3 em proporção molar de 15% em relação à composição da matriz vítrea. A síntese das matrizes de borofosfato foram realizadas utilizando cadinhos de platina (95% Pt - 5% Au) com tampa, submetidos a temperatura de fusão de 1200 °C em forno resistivo (EDG 1800P) durante 1h. Após a fusão, o vidro fundido foi vertido em um molde de grafite à temperatura ambiente (~20 °C). Em seguida, as matrizes vítreas de borofosfato dopadas com 1%, 3% e 6% em mol de nitrato de prata (AgNO_3), foram submetidas a um tratamento térmico de recozimento, sendo colocadas em um forno pré-aquecido em temperatura de 300 °C e mantidas lá por tempos de 1, 3, 5, 8 ou 11 minutos, com atmosfera de gás de hidrogênio controlada e fluxo constante de 50 mL/min. Como já mencionado, os substratos foram produzidos e cedidos pelo professor Ricardo Schneider do departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

4.3 ESPECTRÔMETRO DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER

4.3.1 Espectroscopia de infravermelho médio e próximo

Os espectros de infravermelho médio ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) foram obtidos utilizando o espectrômetro da Bruker, modelo VERTEX 70 (Figura 17). Esse equipamento está localizado no Laboratório de Espectroscopia de Materiais da UFJF. A coleta de dados foi realizada com o equipamento configurado em uma resolução de 4 cm^{-1} e 72 *scans* por amostra. Os dados foram armazenados e tratados utilizando o software OPUS.



Figura 17 - Espectrômetro de infravermelho médio por transformada de Fourier (FT-MIR) da Bruker, modelo VERTEX 70. Fonte: (BRUKER, [s.d.]).

A Figura 18 representa os principais componentes internos de um espectrômetro de infravermelho médio e próximo da Bruker. Dada uma fonte emitindo radiação contínua na região de infravermelho médio (ou próximo), esta é irradiada em direção ao espelho E1, o qual colima a radiação na direção do interferômetro (discutido na seção 2.2.2). No interferômetro o feixe inicial é dividido pelo DF (*beamsplitter*) em dois feixes de 50% da intensidade inicial. Um dos feixes segue em direção ao espelho móvel e o outro feixe segue para o espelho fixo. Os espelhos refletem os respectivos feixes em direção ao DF. No DF os feixes são recombinados gerando um feixe resultante, o qual é direcionado ao espelho fixo E4. O espelho E4 tem como função focalizar o feixe resultante no compartimento da amostra. Por fim, a radiação transmitida pela amostra segue em direção ao detector. A calibração e o alinhamento do equipamento são feitos com um *laser* de He-Ne de comprimento de onda de 632,8 nm. O *laser* tem como função monitorar a posição do espelho móvel durante o deslocamento (GRIFFITHS, 1983).

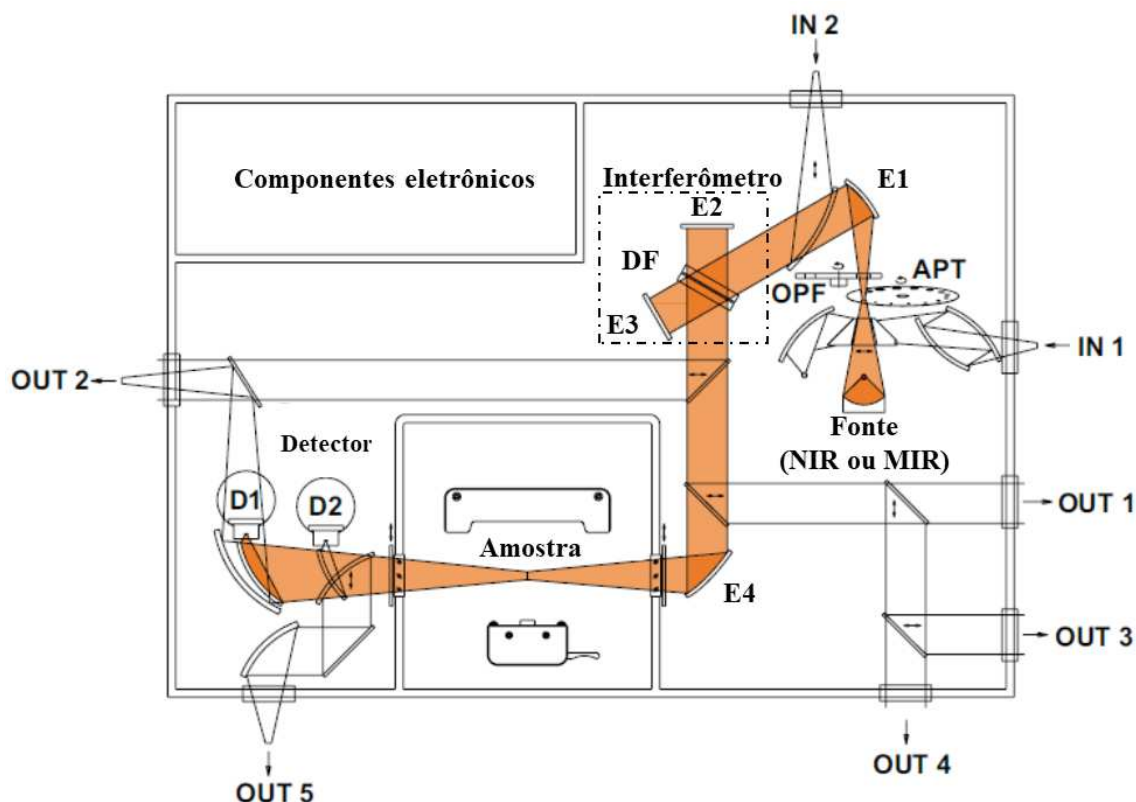


Figura 18 - Representação dos principais componentes internos de um espectrômetro de FTIR. Fonte: Adaptado de (BRUKER, [s.d.]).

Os espectros de infravermelho próximo ($10000-4000\text{ cm}^{-1}$) foram obtidos utilizando o espectrômetro da Bruker, modelo MPA (Figura 19). Esse equipamento está localizado no Laboratório de Espectroscopia de Materiais da UFJF. Os dados foram armazenados e tratados utilizando o software OPUS. Para a coleta de dados o equipamento foi configurado com resolução de 4 cm^{-1} e 64 *scans* por amostra.



Figura 19 - Espectrômetro de infravermelho próximo por transformada de Fourier (FT-NIR) da Bruker, modelo MPA.

4.3.2 Espectrômetro Raman

Neste trabalho as medidas de Raman foram realizadas utilizando o espectrômetro T64000 da Horiba Jobin Yvon, equipado com um dispositivo de carga acoplada (CCD, do inglês, *charge coupled device*) e um microscópio confocal *Olympus* modelo BX41. Este equipamento está localizado no Laboratório de Espectroscopia de Materiais da UFJF. O espectrômetro T64000 está montado em uma configuração denominada triplo subtrativo, na qual há um estágio duplo subtrativo juntamente com um espectrógrafo (Figura 20). Os monocromadores destes estágios possuem comprimento focal de 640 mm e as grades de difração são de 1800 linhas/mm. A cobertura espectral é de 0–950 nm com uma acurácia espectral de $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

Como representado na Figura 20, há uma fonte *laser* alinhada com o equipamento Raman. O feixe *laser* passa por um filtro de densidade neutra para remover a linha de plasma do *laser*, permitindo a passagem somente do comprimento de onda desejado. Em seguida, o feixe do *laser* passa por um *pinhole* e incide em um divisor de feixe. Uma parte do feixe é refletida, auxiliando no alinhamento do equipamento, a outra parte do feixe segue para o microscópio onde o feixe é focalizado sobre a amostra. Após o feixe incidir na amostra, a luz inelástica espalhada retorna através do sistema confocal do microscópio (Figura 22), passando por outro *pinhole* e seguindo para o sistema de monocromadores localizados na parte interna do equipamento.

Na parte interna (Figura 20), no estágio duplo subtrativo (ou *foremonochromator*), o feixe resultante é irradiado em dois monocromadores, os quais funcionam como um filtro sintonizável, definindo a região espectral pela movimentação das redes de difração. No estágio do espectrográfico (ou *spectrometer*), o feixe resultante incide em um terceiro monocromador, que tem como função dispersar a luz limitada no estágio anterior e enviá-la para a CCD. O equipamento possui fendas ajustáveis para controlar a entrada e saída da luz entre os estágios internos.

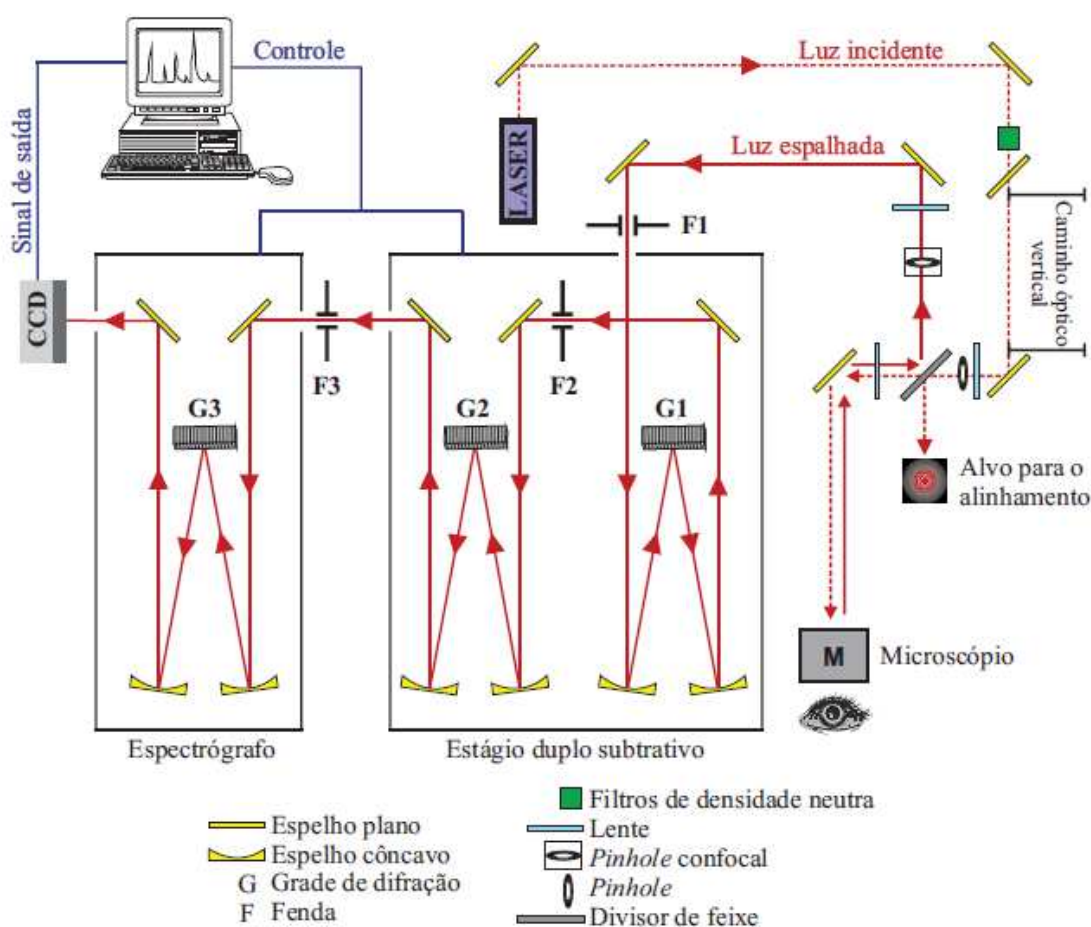


Figura 20 - Representação do espectrômetro Raman T64000 da Horiba Jobin Yvon. Fonte: (RODRIGUES, 2016).

O sistema dos monocromadores internos do espectrômetro T64000 da Horiba é representado na Figura 21. Após a radiação monocromática incidir na amostra, a luz inelástica é direcionada a uma primeira fenda (F1). Ao passar pela fenda ela é refletida em um espelho plano, o qual direciona a luz a um espelho côncavo, que colima a radiação em uma grade de difração (G) (Figura 21(a)). A rede de difração dispersa a radiação em seus comprimentos de onda constituintes sobre o segundo espelho côncavo (Figura 21(b)). Essa radiação é direcionada

para uma segunda fenda (F2) através de um espelho plano. A F2 exerce uma função de filtro, permitindo uma passagem de luz limitada entre o intervalo de comprimento de onda λ_1 e λ_2 (Figura 21(c)). A radiação direcionada através de espelhos segue para a segunda grade de difração (G2) do segundo monocromador, o qual tem como função recombinar toda a luz dispersada sobre a fenda F3. A radiação limitada entre a faixa espectral λ_1 e λ_2 que passa pela fenda F3 é direcionada para uma terceira grade de difração (G3) pertencente ao estágio espectrógrafo. A grade de difração G3 dispersa a radiação e a envia para a CCD (Figura 21(d)).

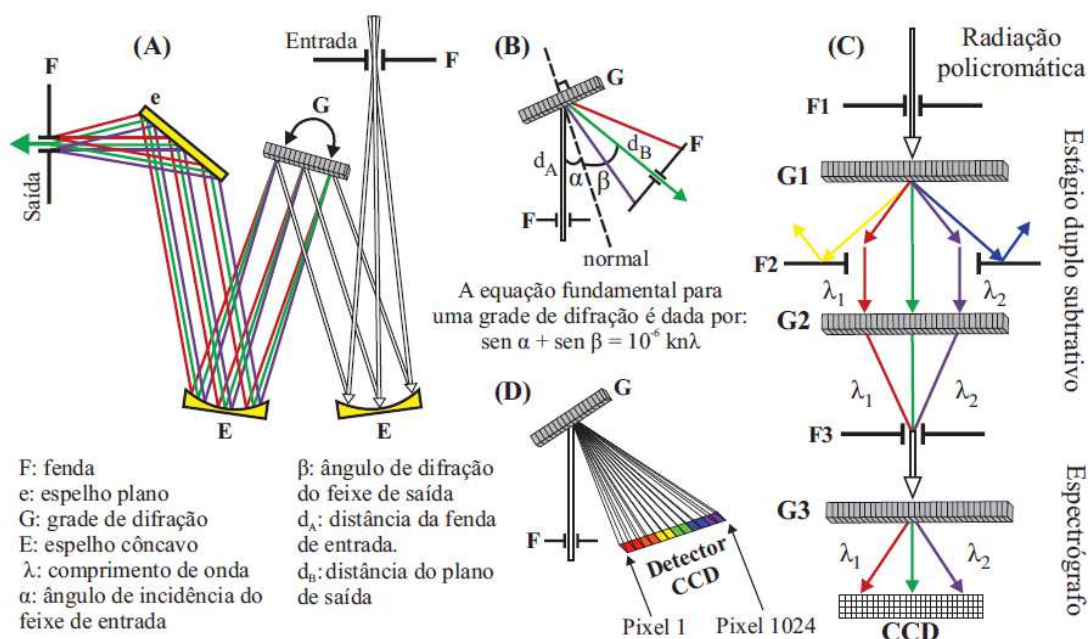


Figura 21 - Representação da configuração interna do equipamento Raman T64000. (a) Caminho óptico entre as fendas de entrada e saída do feixe, e a separação dos comprimentos de onda devido a rotação da grade de difusão. (b) Equação fundamental que determina a rotação da grade de difração e o comprimento de onda de saída. (c) Caminho óptico na configuração triplo subtrativo (d) Radiação incidente na CCD é associada a uma faixa espectral. Fonte: (RODRIGUES, 2016).

Como representado na Figura 21(b) a separação dos comprimentos de onda é estabelecida por difração e ocorre devido a rotação da rede de difração baseando-se na seguinte equação:

$$\text{sen } \alpha + \text{sen } \beta = 10^{-6} kn\lambda \quad \text{Eq. 1.39}$$

sendo, α e β os ângulos de incidência e de difração em relação a normal da rede de difração, respectivamente, 10^{-6} é uma constante referente à construção da rede, k é a ordem da difração, n é o número de ranhuras por milímetro e λ é o comprimento de onda difratado. Esta equação geral sugere que há diversos valores de λ para um mesmo ângulo de difração β .

A Figura 22 ilustra o sistema confocal do microscópio acoplado ao T64000. O feixe *laser* ao passar pelo *pinhole* (P_c) incide em um divisor de feixe (DF), refletindo parte do feixe em direção à amostra. Ao incidir na amostra a luz inelasticamente espalhada é coletada pelo sistema de microRaman através de uma geometria de retroespalhamento, retornando pela objetiva em direção ao segundo *pinhole* (P_{hc}) (Figura 22(a)). O primeiro *pinhole* têm como função proporcionar uma melhor distribuição gaussiana do feixe incidente. O segundo *pinhole* localizado sobre o plano da imagem do microscópio, atua limitando a superfície analisada e a profundidade do foco, portanto, bloqueando a luz espalhada fora do foco (Figura 22(b)).

Neste trabalho os dados foram obtidos usando uma objetiva da Olympus modelo MPLN50x, com abertura numérica (N.A., do inglês, *numerical aperture*) de 0,75 e distância de trabalho de 0,38 mm.

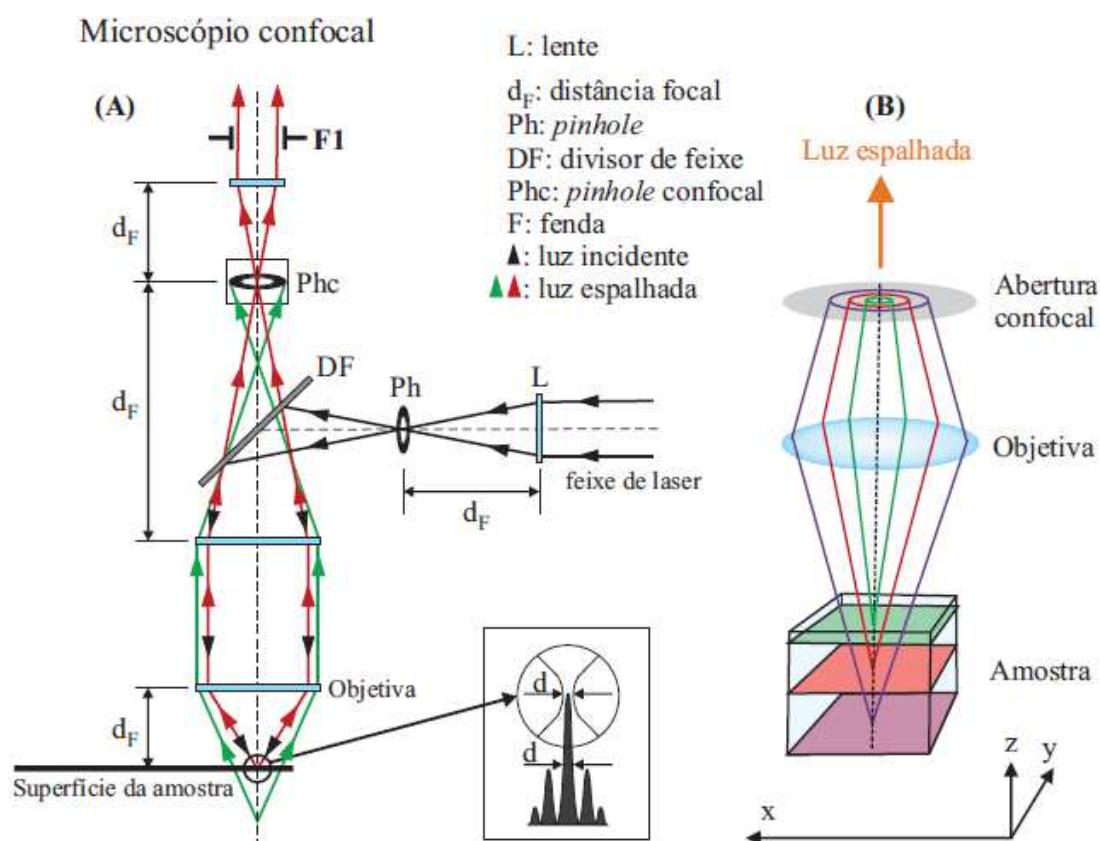


Figura 22 - Representação do sistema microRaman confocal. (a) Funcionamento da objetiva e limitações da luz incidente e espalhada gerada pelos *pinholes*. Em detalhe, ilustração da área focada e perfil gaussiano do *laser*. (b) Comportamento da luz espalhada em função da superfície e da profundidade da amostra analisada. Fonte: (RODRIGUES, 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O capítulo de resultados e discussões é dividido em três partes. Na primeira parte é apresentado um estudo da caracterização dos componentes presentes nas amostras de leites crus, bovino e caprino, com base nos resultados de espectroscopia MIR, NIR e Raman. A segunda parte mostra o estudo de identificação de fraude nas amostras de leite caprino cru adulteradas com a adição de leite bovino cru. Nesse estudo a identificação foi realizada utilizando os resultados das espectroscopias vibracionais em conjunto com os métodos de análise multivariados PCA e PLS. Na terceira parte são apresentados e discutidos os resultados do efeito SERS em amostras de leite bovino pasteurizado do tipo A.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE LEITE BOVINO E CAPRINO

5.1.1 Caracterização por espectroscopia Raman

A Figura 23 mostra uma comparação entre os espectros Raman normalizados do leite bovino cru (LB_100%) com o do leite caprino cru (LC_100%). Verifica-se na comparação dos espectros que as bandas de sinal Raman das amostras não apresentam deslocamento entre elas e que a intensidade das bandas também foi semelhante. Na Tabela 6 são detalhados os grupos funcionais e os modos vibracionais detectados pela espectroscopia Raman.

Tabela 6 - Classificação dos grupos funcionais e modos vibracionais observados nos espectros Raman das amostras de leite bovino e caprino

<i>Número de onda (cm⁻¹)</i>	<i>Grupo funcional</i>	<i>Atribuição</i>	<i>Referências</i>
1005	Carotenoides	Grupo R aromático: fenilalanina (phe)	(EL-ABASSY et al., 2011)
1062 / 1081	Ácido graxo	Estiramento simétrico (C – C)	(GALLIER et al., 2011)
1120	Ácido graxo saturado	Deformação angular fora do plano (C – C)	(GALLIER et al., 2011)
1155	Carotenoides	Estiramento assimétrico (C – C)	(EL-ABASSY et al., 2011)
1267	Ácido graxo insaturado	Insaturados <i>cis</i> (C = C) Grupo etileno com deformação angular no plano (C – H)	(SALEEM; AMIN; IRFAN, 2020)
1300	Ácido graxo saturado	Deformação angular fora do plano tipo torção (CH ₂)	(GALLIER et al., 2011; SALEEM; AMIN; IRFAN, 2020)
1442	Colesterol	Deformação angular no plano tipo tesoura (C – H) Ácido graxo saturado	(EL-ABASSY et al., 2011; GALLIER et al., 2011)
1525	Carotenoides	Estiramento (C = H)	(EL-ABASSY et al., 2011)
1655		Estiramento insaturados <i>cis</i> (C = C)	(EL-ABASSY et al., 2011; GALLIER et al., 2011)
1748	Triacilglicerol	Estiramento (C = O) Ester	(EL-ABASSY et al., 2011; GALLIER et al., 2011)
2854	Grupo acila no estado líquido	Estiramento simétrico (CH ₂)	(EL-ABASSY et al., 2011; GALLIER et al., 2011)
2893	Grupo acila no estado cristalino	Estiramento simétrico (CH ₂) por ressonância de Fermi; Estiramento assimétrico (CH ₂)	(GALLIER et al., 2011)
2959	Grupo acila	Estiramento simétrico (CH ₃) e Estiramento assimétrico (CH ₃)	(GALLIER et al., 2011)

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

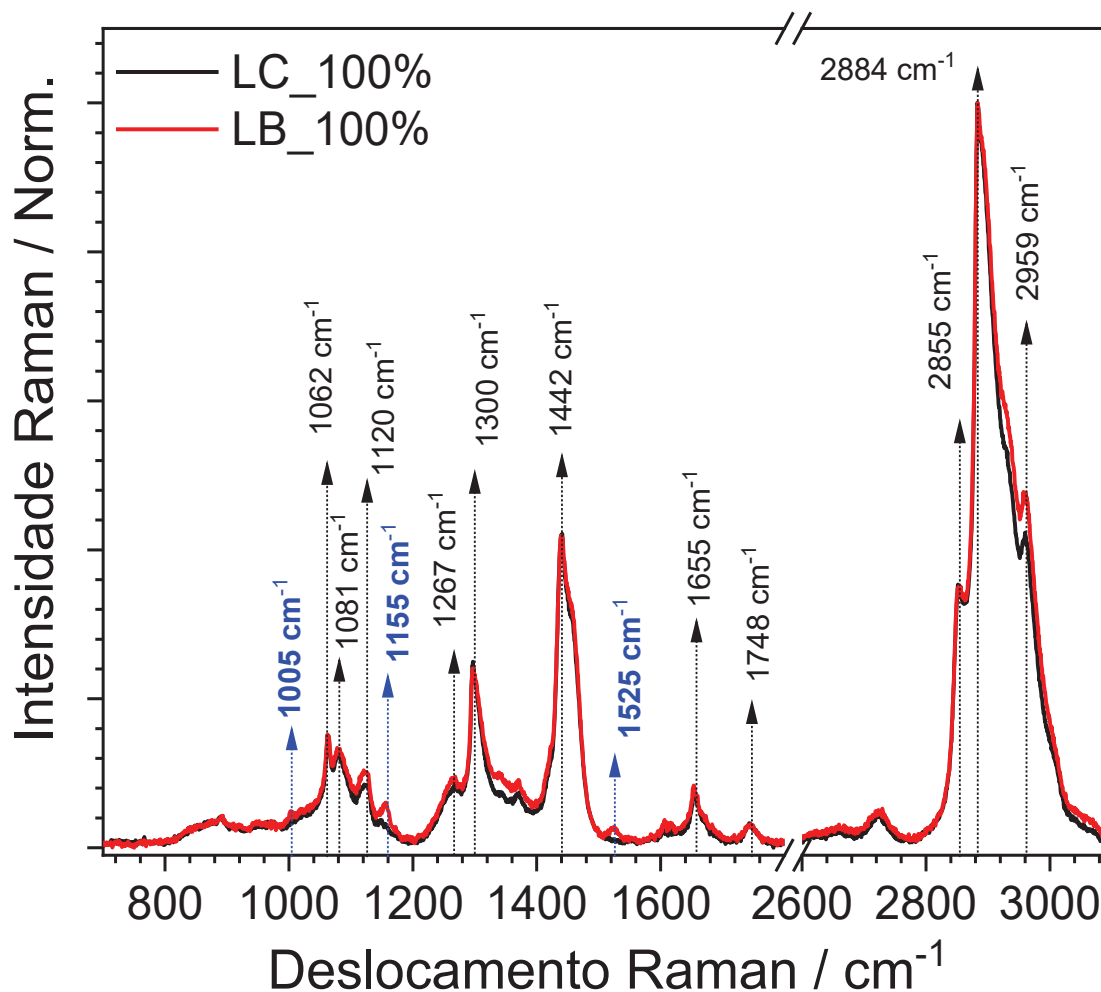


Figura 23 - Comparação dos espectros Raman das amostras de leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

De acordo com (EL-ABASSY et al., 2011; GALLIER et al., 2011; SALEEM; AMIN; IRFAN, 2020), as bandas em torno de 1062 e 1081 cm^{-1} observadas nos dois tipos de leites correspondem ao grupo de ácidos graxos, com modos vibracionais referentes ao estiramento simétrico (C – C). As bandas em torno de 1120 e 1300 cm^{-1} são atribuídas ao grupo de ácido graxo saturado, com estiramento simétrico (C – C) e deformação angular fora do plano do tipo torção (CH_2), respectivamente. As bandas em 1267 e 1655 cm^{-1} estão relacionados aos ácidos graxos insaturados, com deformação angular no plano (C – H) e com estiramento insaturado *cis* (C = C), respectivamente.

Na região de 1442 cm^{-1} , a banda intensa em ambos os espectros é gerada pela deformação angular (C – H), a qual é atribuída as moléculas de colesterol. O modo de vibração por estiramento (C = O) observado em 1748 cm^{-1} , corresponde ao triacilglicerol. A banda larga na região de 2700-3100 cm^{-1} está relacionada com as vibrações das cadeias de hidrocarbonetos

e a ligação com o grupo acila, a qual está relacionada com os glóbulos de gordura do leite (EL-ABASSY et al., 2011; GALLIER et al., 2011).

Pode-se verificar na Figura 23 que o espectro Raman do leite bovino cru possui modos vibracionais em torno de 1005 cm^{-1} , 1155 cm^{-1} e 1525 cm^{-1} , os quais não são observados no espectro Raman do leite caprino cru. Estas bandas são atribuídas ao grupo dos carotenoides. Segundo (FOX et al., 2015), as ovelhas, cabras e búfalos não transferem moléculas de carotenoides para o leite, conseqüentemente o leite destes animais apresentam uma coloração mais branca do que a observada no leite bovino. Leites contendo concentrações de carotenoide em torno de $200\text{ }\mu\text{g/L}$ apresentam coloração amarelada (FOX et al., 2015).

De acordo com (EL-ABASSY et al., 2011; FOX et al., 2015), somente a análise de tonalidade do leite não pode ser utilizada como critério para discriminar o leite de diferentes espécies ou para identificar adulteração na composição de um leite, uma vez que, a tonalidade do leite pode ser alterada com a adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em sua composição, tornando a cor do leite mais branca. Também existe casos de fraudes na tonalidade dos derivados do leite com a adição de clorofila ou dióxido de titânio (ABRANTES; CAMPÊLO; SILVA, 2014; FOX et al., 2015).

Como abordado na seção 2.5.3, a aplicação de derivada nos espectros busca realçar a região dos modos de vibrações observados em um espectro. Desta forma, na Figura 24(a) são comparados os resultados da primeira derivada do espectro Raman das amostras de leite bovino e caprino. Observa-se na comparação que a derivada do espectro do leite bovino cru apresenta variações de intensidades ligeiramente maiores nas regiões relativas aos modos de vibração dos carotenoides, 1005 , 1155 e 1525 cm^{-1} , confirmando as diferenças entre os espectros mostrados na Figura 23. A Figura 24(b) com intervalo somente entre 1000 - 1600 cm^{-1} , permite uma melhor análise das diferenças de intensidades nos espectros de primeira derivada.

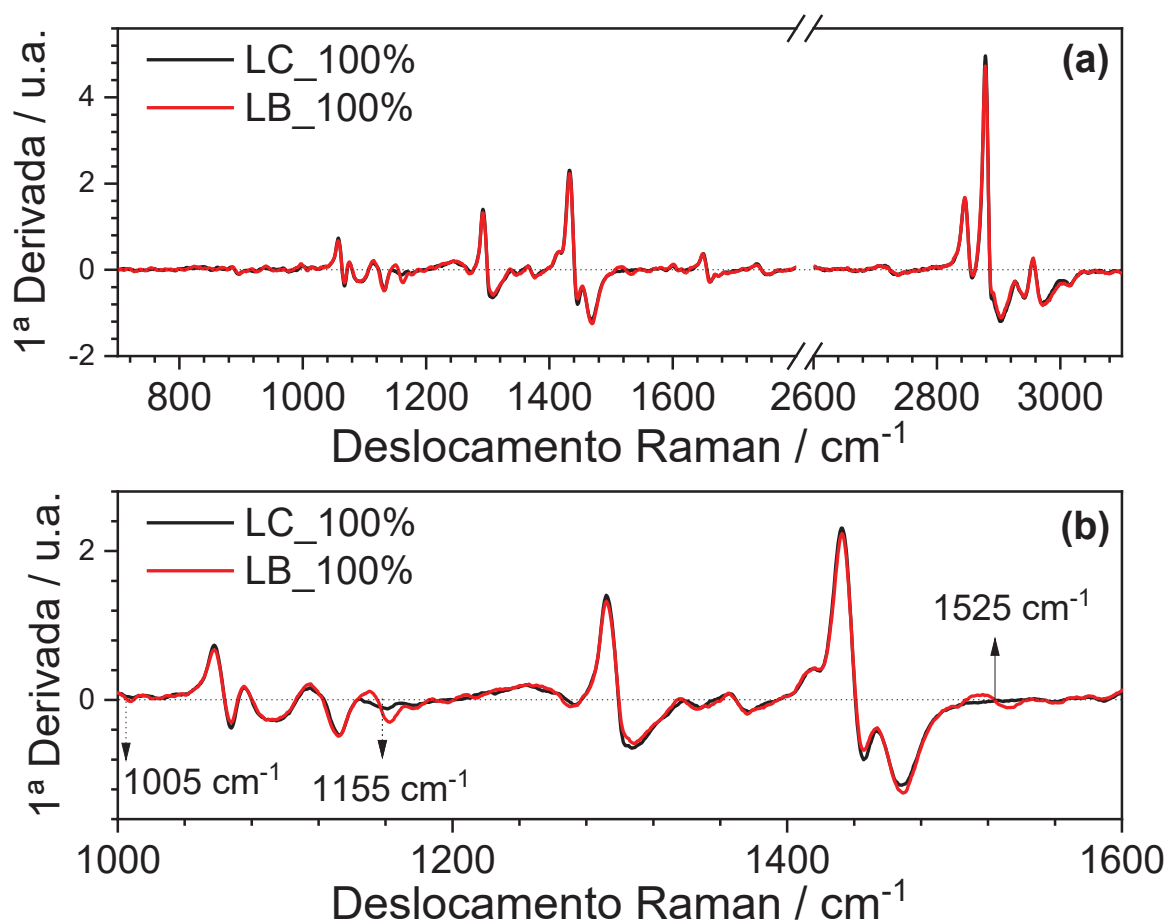


Figura 24 - Comparação dos resultados da primeira derivada dos espectros Raman do leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%). (a) região de 700–3100 cm⁻¹ e (b) região de 1000–1600 cm⁻¹. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.1.2 Caracterização por espectroscopia MIR

Os espectros normalizados de FT-MIR das amostras de leite bovino e caprino são comparados na Figura 25. Nota-se que os espectros obtidos possuem modos vibracionais nas mesmas regiões. Esse fato era esperado, já que as amostras apresentam composição química parecida. No entanto, verifica-se que o espectro de leite bovino cru apresentou maior intensidade de absorção nas bandas em torno de 2921 cm⁻¹ e 2854 cm⁻¹, quando comparado com o espectro do leite caprino cru. Esta diferença pode ser melhor observada no gráfico em detalhe da Figura 25.

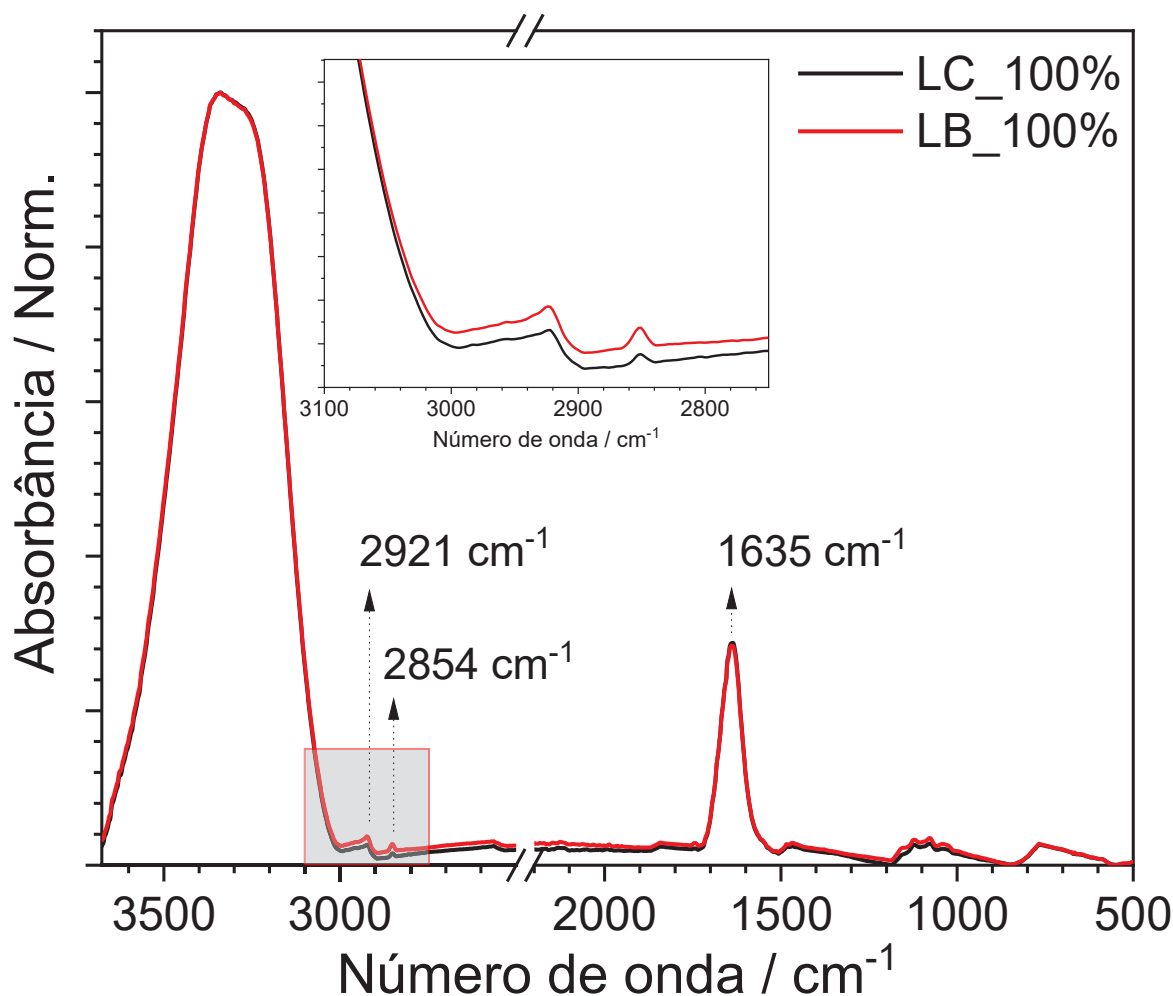


Figura 25 - Comparação dos espectros de infravermelho médio (MIR) das amostras de leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Verifica-se que as amostras de leite possuem uma banda de absorção larga entre 3676-3000 cm^{-1} , a qual é atribuída ao estiramento OH da molécula de H_2O . O pico em 1635 cm^{-1} é devido ao carbonil ($\text{C} = \text{O}$) e se estende à amida I (CARBONARO; NUCARA, 2010).

Os modos vibracionais em torno de 2921 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} com estiramentos (C_2) e (C_3), respectivamente, referem-se ao grupo acila dos ácidos graxos e estão correlacionados com a quantidade de gordura do leite (AL HAJ; AL KANHAL, 2010; BELL et al., 1997; CARBONARO; NUCARA, 2010; FOX et al., 2015). Com relação a diferença de intensidade de absorção nos modos vibracionais de 2921 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} , essa diferença pode estar relacionada a fatores como: a diferente porcentagem de gorduras presentes nesses leites, sendo entre 3,7-4,4% no leite bovino cru e de 4,0-4,5% no leite caprino cru (Tabela 1), e ao fato do leite caprino cru apresentar em sua composição maior porcentagem de ácidos graxos com cadeia curta e média em comparação com o leite bovino cru.

Nota-se neste estudo de caracterização que os espectros MIR obtidos não apresentaram os modos vibracionais das moléculas de carotenoides, as quais estão presentes no leite bovino cru. A não detecção desses modos vibracionais pode estar relacionada com o modo de preparo das amostras, o qual consistiu em homogeneizar as amostras somente com uma agitação manual. Em um trabalho apresentado por Hülya Yaman (YAMAN, 2020), o espectro MIR do leite bovino mostra os modos vibracionais dos carotenoides, no entanto, as amostras foram homogeneizadas utilizando um agitador vortex.

A primeira derivada também foi aplicada nos espectros MIR das amostras de leite cru, como mostrado na Figura 26. Nesta comparação observa-se novamente que a região referente aos modos vibracionais em 2921 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} apresentam uma sutil diferença de intensidade entre os espectros, sendo melhor observada no gráfico em detalhe da Figura 26.

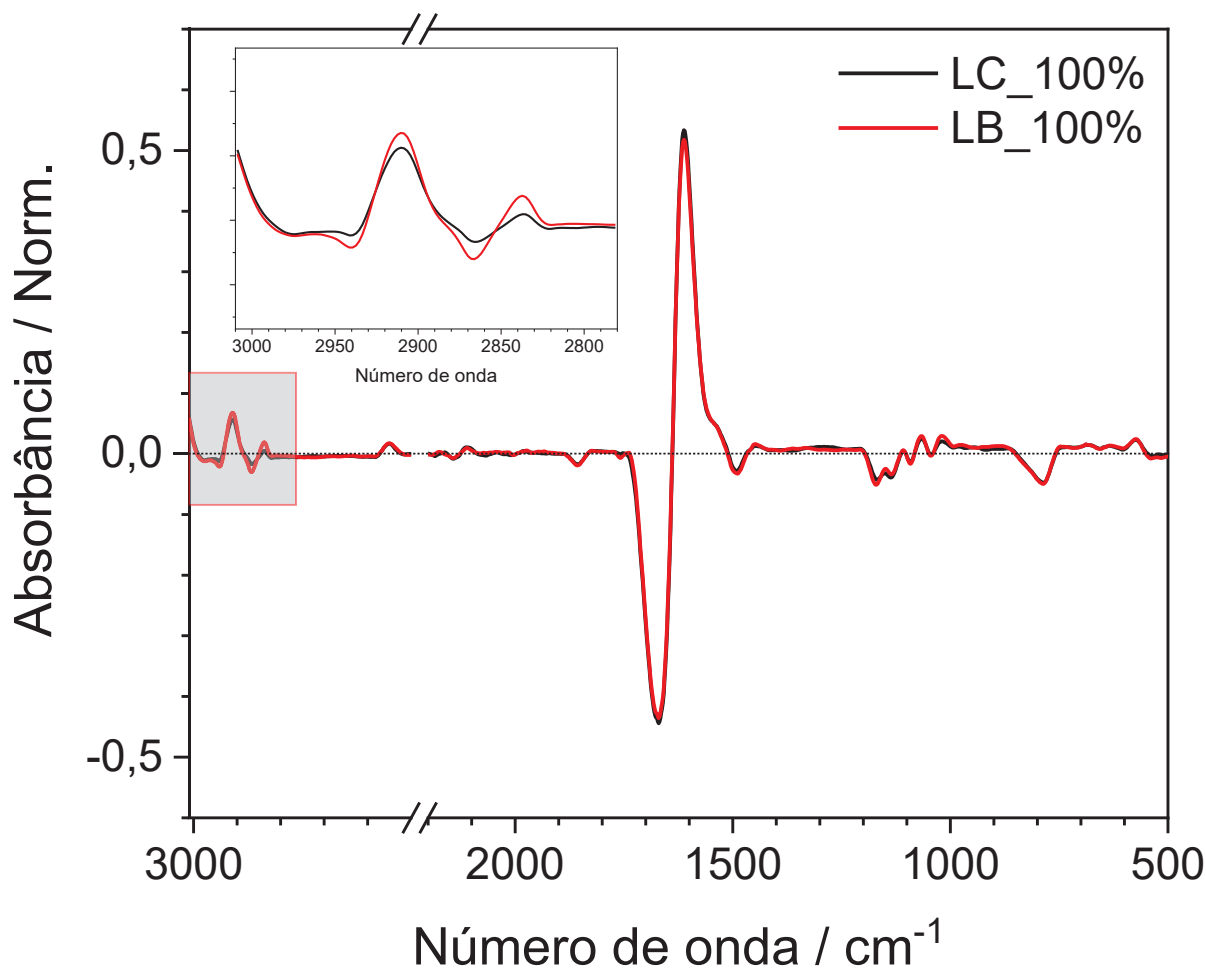


Figura 26 - Comparação dos resultados da primeira derivada dos espectros FT-MIR do leite bovino cru (LB_100%) versus leite caprino cru (LC_100%), referente a região de $3010\text{--}500\text{ cm}^{-1}$. Em detalhe, região de $3000\text{--}2780\text{ cm}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.1.3 Caracterização por espectroscopia NIR

Na Figura 27 são mostrados os espectros normalizados de FT-NIR das amostras de leite cru. Verifica-se que os espectros NIR das amostras de leite também apresentaram grande similaridade entre si. Esse fato novamente pode ser atribuído à semelhança entre os componentes presentes nos leites bovino e caprino.

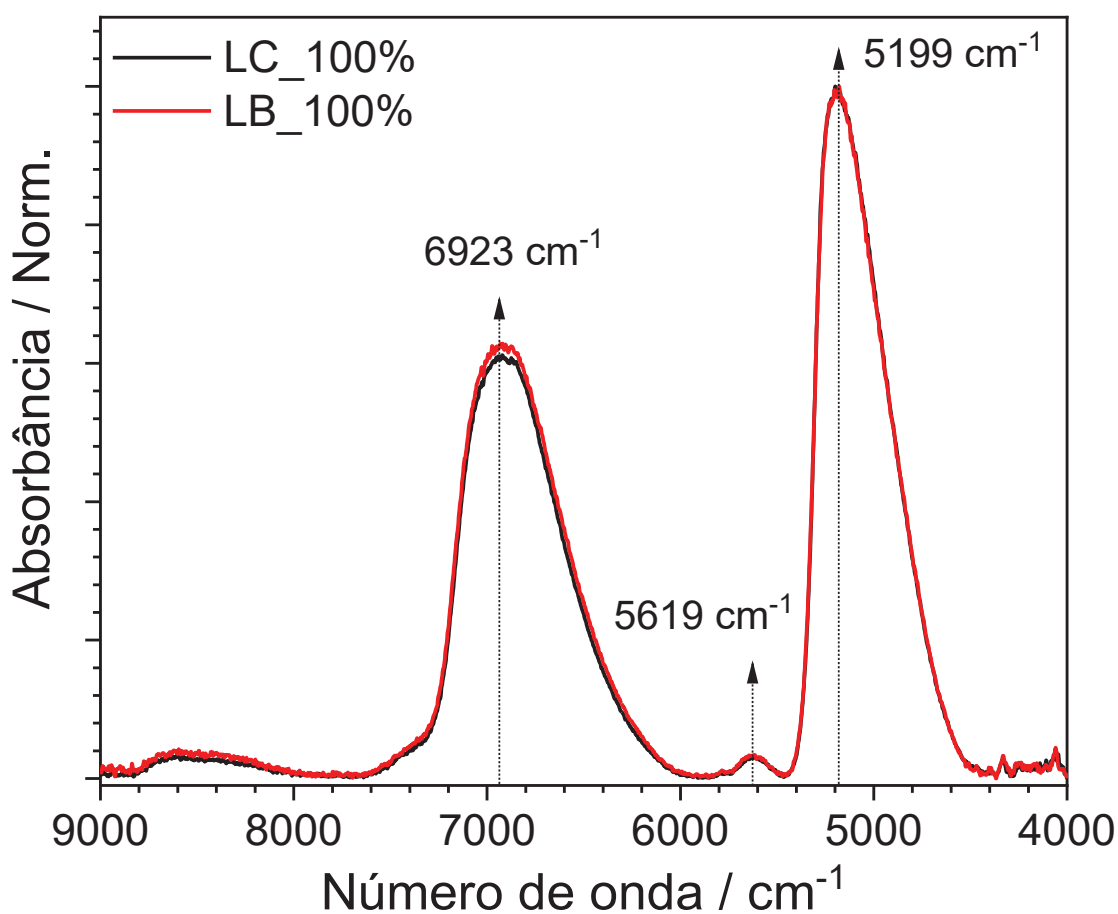


Figura 27 - Comparação dos espectros de infravermelho próximo (NIR) das amostras de leite bovino cru (LB_100%) *versus* leite caprino cru (LC_100%). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

De acordo com (ŠAŠIĆ; OZAKI, 2001; SIVAKESAVA; IRUDAYARAJ, 2002), a banda de absorção larga entre 7500-6000 cm^{-1} é atribuída a uma combinação de estiramentos simétricos e assimétricos da água, os quais acabam sobrepondo aos modos vibracionais das proteínas. A banda em torno de 5628 cm^{-1} está relacionada ao primeiro harmônico do modo de estiramento do (CH) e aos grupos de gordura de (CH) e (CH₂). O pico de absorção em torno de 5199 cm^{-1} é associado ao estiramento da hidroxila (OH) e aos modos de deformação (HOH) dos polissacarídeos (carboidratos).

Na Figura 28 compara-se os resultados da primeira derivada dos espectros NIR das amostras de leite. O gráfico em detalhe da Figura 28(a) mostra a região em torno da banda de 5199 cm^{-1} . Pode-se observar que nessa banda a amostra de leite caprino cru possui uma intensidade ligeiramente maior do que a do leite bovino cru. Essa diferença de intensidade pode estar associada com a estrutura dos polissacarídeos e com a diferente porcentagem de carboidratos presentes em cada tipo de leite, sendo de 3,6-4,2% no leite caprino cru e de 4,8-4,9% no leite bovino cru (FOX et al., 2015; SCHUSTER et al., 2006).

No gráfico em detalhe da Figura 28(b), verifica-se que na região em torno da banda de 6923 cm^{-1} , especificamente em torno de 7170 , 7035 e 6960 cm^{-1} , os espectros apresentam discretas variações de intensidade. Nesse caso, a diferença de intensidade pode estar associada com a porcentagem de água presente na composição dos leites, sendo de 85–87% no leite bovino cru e de 87–88% no leite caprino cru (AL HAJ; AL KANHAL, 2010).

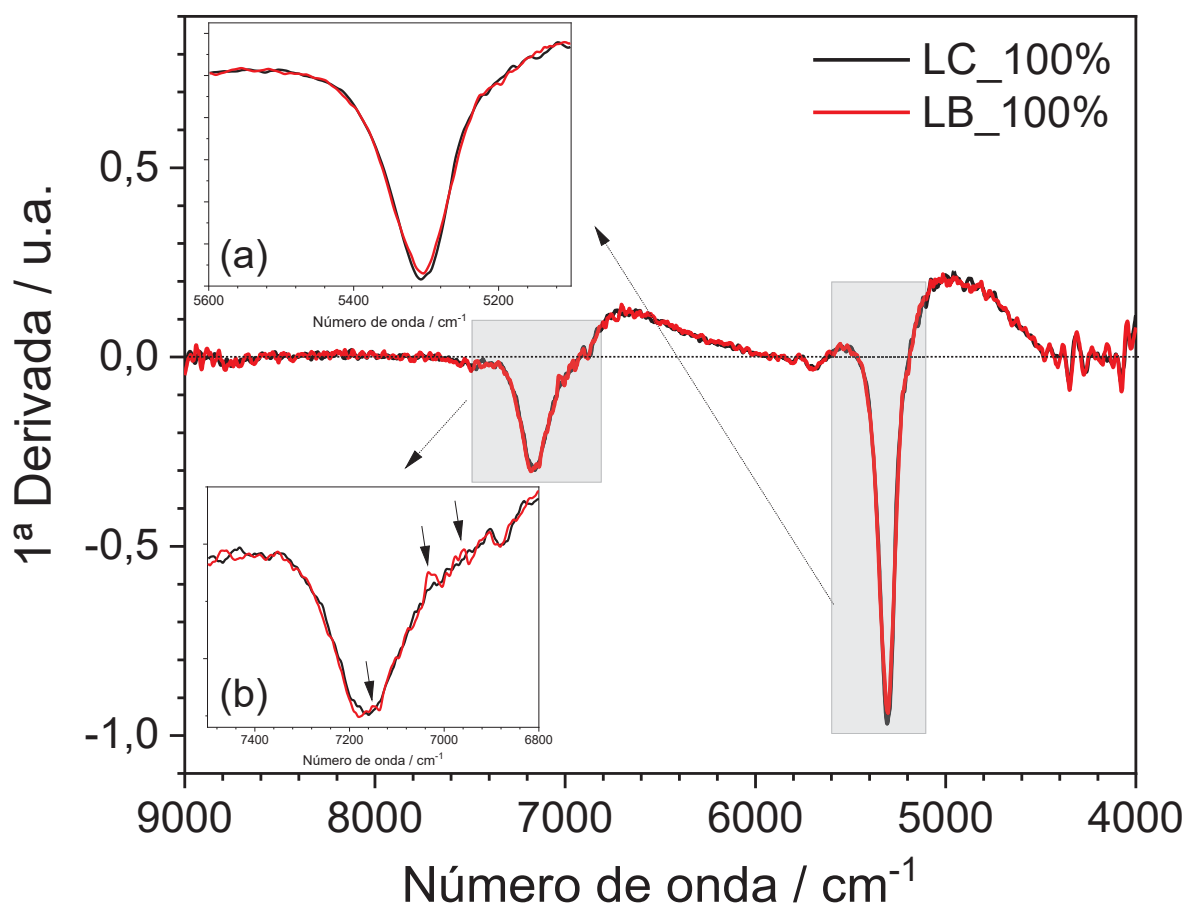


Figura 28 - Comparação dos resultados da primeira derivada dos espectros Raman do leite bovino cru (LB_100%) versus leite caprino cru (LC_100%), região de $9000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Em detalhe, região de (a) $5600\text{--}5100\text{ cm}^{-1}$ e (b) $7500\text{--}6800\text{ cm}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DA FRAUDE NO LEITE CAPRINO CRU POR ADIÇÃO DE LEITE BOVINO CRU

Como mostrado no estudo da seção 5.1, diferenciar o leite caprino cru do leite bovino cru utilizando apenas os resultados de espectroscopia MIR e NIR mostrou-se impreciso devido à grande semelhança dos espectros. Com relação a comparação dos espectros Raman, os resultados indicaram que é possível diferenciar esses dois tipos de leite, visto que a espectroscopia Raman apresenta sensibilidade suficiente para detectar os modos vibracionais do grupo de carotenoides presente somente no leite bovino cru.

Dando continuidade à pesquisa, as amostras do **lote 1** e **lote 2** (Tabela 3), as quais contêm leite caprino cru contaminado por adição de leite bovino cru em passos de adulteração de 10% e de 2%, respectivamente, foram submetidas a medidas de espectroscopia Raman, MIR e NIR. Os espectros obtidos com essas técnicas foram analisados e comparados de forma similar ao estudo da seção 5.1

A similaridade entre os espectros MIR e NIR já era esperada, porém ao comparar os espectros Raman verificou-se que também é inviável discriminar as amostras de leite adulteradas somente com uma comparação simples de espectros. A comparação dos espectros Raman das amostras do **lote 1** e dos espectros Raman, MIR e NIR das amostras do **lote 2**, assim como os resultados da primeira derivada destes espectros, são mostrados nos Apêndice A, Apêndice B, Apêndice C e Apêndice D, respectivamente.

Como não foi possível realizar uma discriminação por comparação simples dos espectros Raman, MIR e NIR de modo a detectar no leite caprino cru com a adição de leite bovino cru, se confirmou a necessidade de utilizar métodos de análises multivariadas em conjunto com os dados espectrais. Desta forma, nas seções seguintes são apresentados os resultados de discriminação e quantificação das amostras do **lote 1** e **lote 2** utilizando os métodos de análise de componentes principais e a regressão por mínimos quadrados parciais.

5.2.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA é um método estatístico que tem sido utilizado para identificar padrões em um conjunto de dados, destacando semelhanças e diferenças entre as amostras (FERREIRA et al., 1999; HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2016). Desta forma, a PCA foi utilizada neste trabalho com o intuito de discriminar as amostras de leite adulteradas (Tabela 3). A seguir são apresentados quatro resultados de PCA, sendo o primeiro resultado obtido a partir dos

espectros Raman das amostras do **lote 1** e os outros três resultados construídos com os dados de Raman, MIR e NIR das amostras do **lote 2**. Antes da construção dos modelos de PCA os espectros foram tratados realizando a média dos dados em triplicata (ou quintuplicata, no caso dos espectros Raman do **lote 2**), normalizados e submetidos a derivada de primeira ordem.

A Figura 29 mostra o gráfico de *scores* do resultado de PCA construído utilizando os espectros Raman (região de 700–1800 cm^{-1}) das amostras de leite do **lote 1**. Observa-se que a soma das duas primeiras componentes principais explica 80% da variância, sendo 67% referente a PC1 e 13% a PC2.

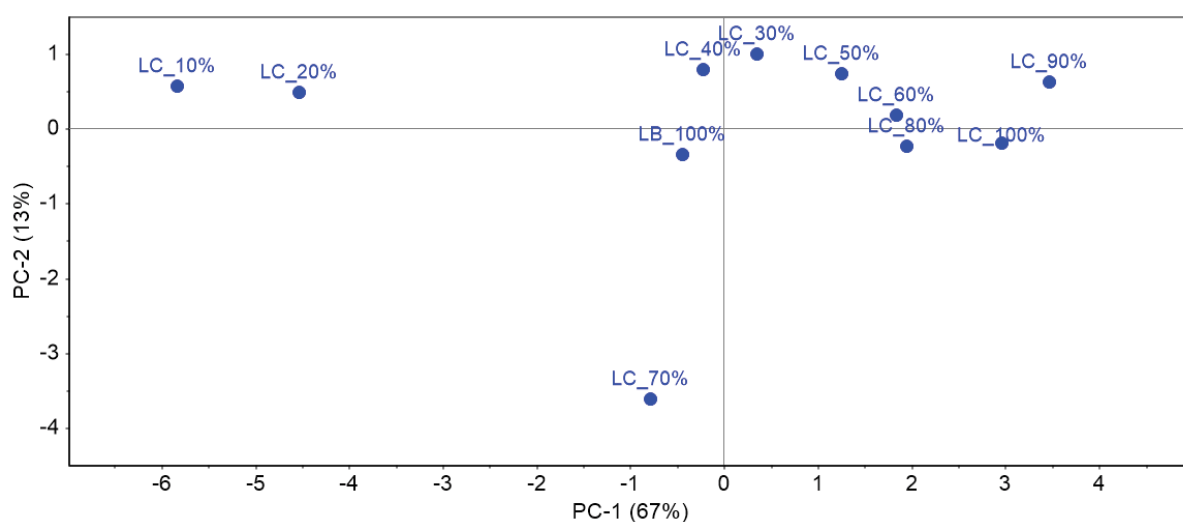


Figura 29 - Gráfico de *scores* da PC1 *versus* PC2 referente as amostras de leite do **lote 1** e construído com os dados da primeira derivada dos espectros Raman, região de 700–1800 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Na Figura 29 verifica-se que a distribuição das amostras ocorre ao longo do eixo da PC1, de forma que temos a amostra de leite caprino cru (LC_100%) localizada no quadrante positivo da PC1 e a amostra de leite bovino cru (LB_100%) no quadrante negativo da PC1, diferenciando as amostras de leite cru sem adulteração. Com relação as amostras de leite adulteradas, o modelo PCA induziu a discriminação dessas amostras de forma decrescente entre as amostras de leite sem adulteração, ou seja, quanto menor a porcentagem de leite caprino nas amostras maior a proximidade com a amostra LB_100%, ou vice-versa. Apesar das amostras com 10%, 20% e 70% de leite caprino não apresentarem a mesma tendência, o modelo PCA obtido permitiu diferenciar essas amostras adulteradas das outras amostras do **lote 1**, portanto, pode-se concluir que o uso do método de PCA associado aos espectros Raman das amostras do **lote 1**, apresentou resultado qualitativo satisfatório na distinção das amostras sem e com adulteração.

O gráfico de pesos (*loadings*) da PC1 mostra as regiões dos espectros que possuem maior importância na distinção das amostras. Verifica-se na Figura 30 que as maiores variações de intensidade ocorreram em torno das bandas de 1155 cm^{-1} , 1442 cm^{-1} e 1525 cm^{-1} . Como identificado na Tabela 6, as regiões de 1155 e 1525 cm^{-1} correspondem aos modos vibracionais dos carotenoides, os quais estão presentes na composição do leite bovino cru (FOX et al., 2015; KULA, 2016). Já a região de 1442 cm^{-1} é atribuída ao colesterol (gordura). A porcentagem de gordura varia entre esses tipos de leite, sendo ligeiramente maior no leite caprino cru, e também há diferença na proporção de ácido graxos curtos e médios (seção 1.1) (FOX et al., 2015). Os gráficos em detalhe na Figura 30 mostram as regiões dos espectros da primeira derivada que apresentaram maior contribuição na construção do modelo PCA.

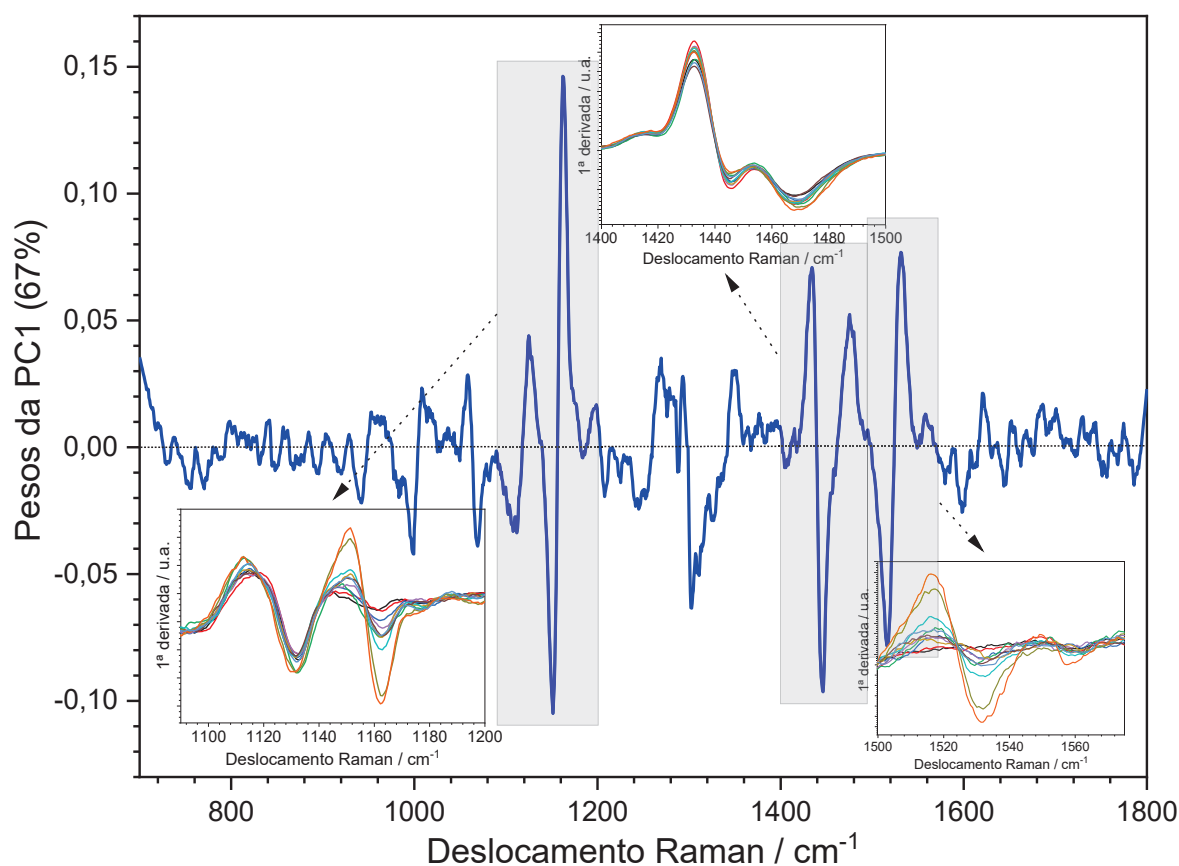


Figura 30 - Gráfico de pesos da PC1 *versus* deslocamento Raman. Resultado referente a PCA das amostras de leite do **lote 1**, construída com os dados da primeira derivada dos espectros Raman. Em detalhe, as regiões com maior contribuição no modelo, sendo: $1090\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$, $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ e $1525\text{-}1570\text{ cm}^{-1}$. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A seguir são apresentados os resultados da PCA construídos a partir dos espectros Raman, MIR e NIR, obtidos analisando as amostras de leite do **lote 2**. Os modelos de PCA foram gerados utilizando somente as amostras de 90-100% de leite caprino (Tabela 3). Optou-

se por utilizar somente as amostras com 90-100% de LC, pois fraudes com mais de 10% de adulteração costumam alterar as características sensoriais do leite.

A Figura 31 mostra o resultado da PCA das amostras de 90-100% de leite caprino do **lote 2** construído com os dados da primeira derivada dos espectros Raman (região de 750–1750 cm^{-1}). Neste caso, a soma das duas primeiras componentes principais explica 84% da variância das amostras, sendo 76% referente a PC1 e 8% a PC2.

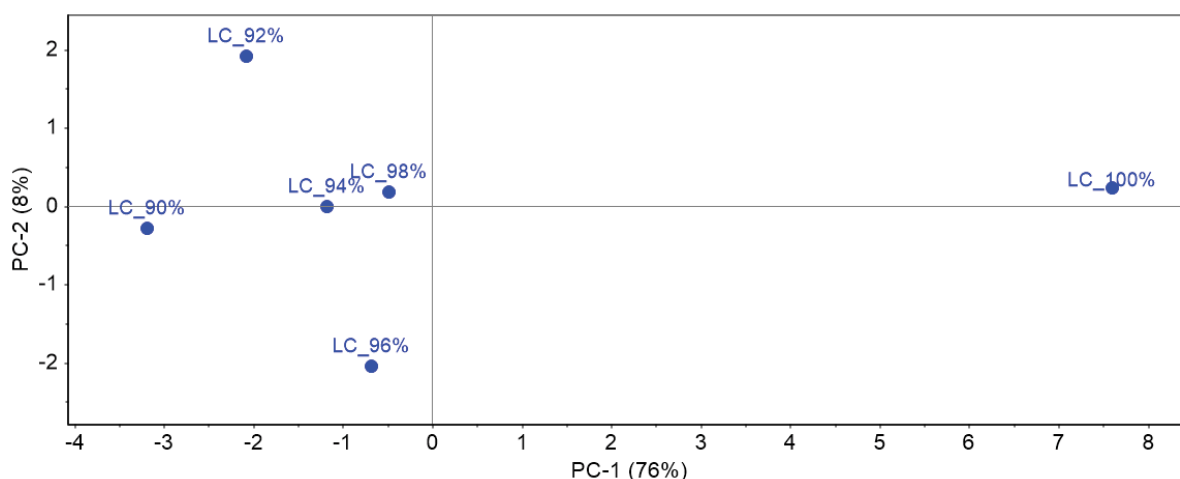


Figura 31 - Gráfico de *scores* da PC1 versus PC2 referente as amostras de leite do **lote 2** e construído com os dados da primeira derivada dos espectros Raman, região de 750–1750 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Verifica-se no gráfico de *scores* que a amostra LC_100% está localizada no quadrante positivo da PC1 e da PC2, a amostra LC_90% está no quadrante negativo da PC1 e da PC2 e as demais amostras adulteradas são distinguidas de forma decrescente ao longo da PC1, ou seja, quanto menor a porcentagem de leite caprino na amostra, maior a proximidade com a amostra LC_90%, ou vice-versa. Esse resultado indica que o uso do método de PCA associado a espectroscopia Raman, permite identificar de forma qualitativa a adulteração no leite caprino com a adição de até 10% de leite bovino.

A Figura 32 mostra o gráfico de pesos da PC1. Observa-se que nesse caso, as maiores contribuições na construção do modelo PCA são atribuídas aos modos vibracionais do carotenoide em 1155 cm^{-1} , dos ácidos graxos saturados e insaturados em torno de 1267 e 1300 cm^{-1} , respectivamente, e do colesterol em 1442 cm^{-1} .

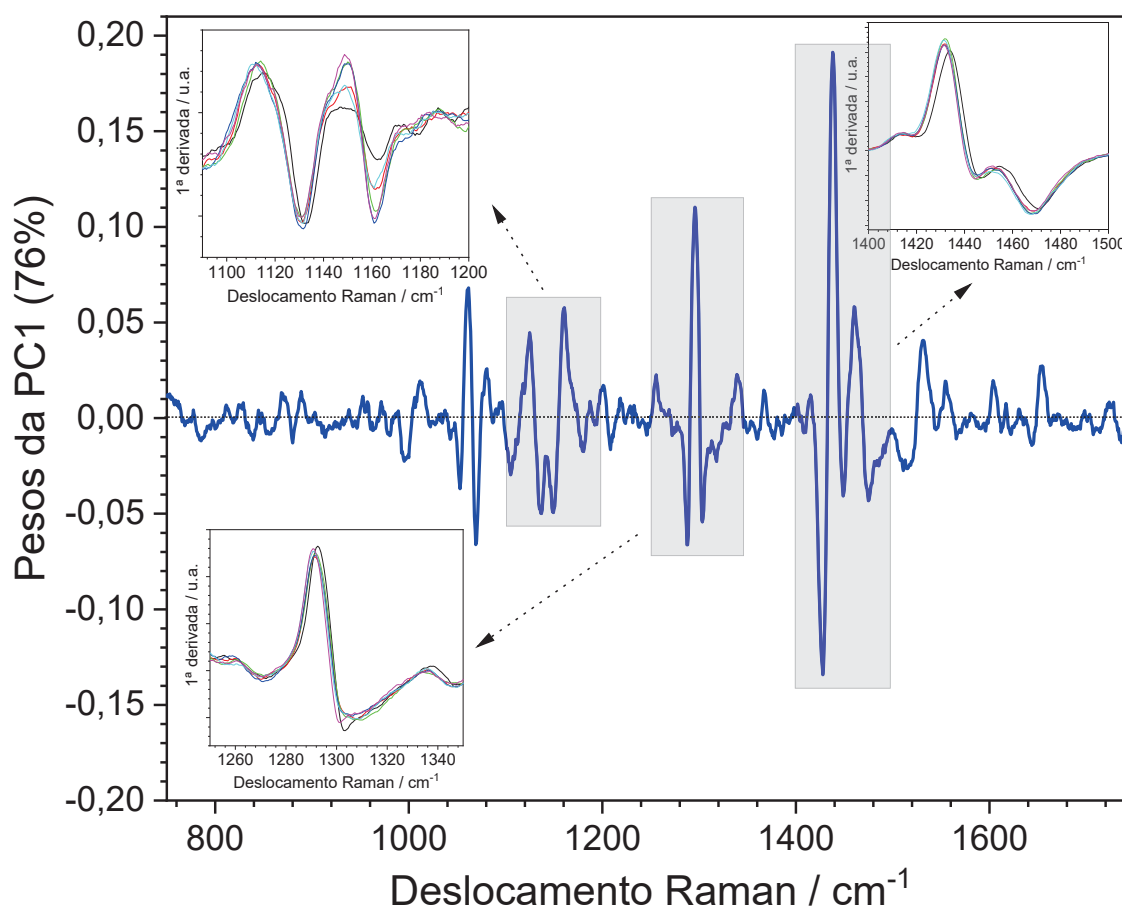


Figura 32 - Gráfico de pesos da PC1 *versus* deslocamento Raman. Dados referentes a PCA das amostras de leite do **lote 2**, construída com os dados da primeira derivada dos espectros Raman. Em detalhe, as regiões com maior contribuição no modelo, sendo: 1090-1200 cm^{-1} , 1250-1350 cm^{-1} e 1400-1500 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Comparando os resultados dos *loadings* da Figura 30 com os da Figura 32, observa-se que devido o **lote 1** conter amostras com mais de 10% de leite bovino, os modos vibracionais dos carotenoides presentes no leite bovino, resultaram em uma maior contribuição na discriminação das amostras (Figura 30). No entanto, o resultado de *loadings* da Figura 32 (**lote 2**) mostrou que os modos vibracionais do colesterol e dos ácidos graxos saturados e insaturados, resultaram em uma maior contribuição da discriminação das amostras de leite caprino cru adulteradas com a adição de até 10% de leite bovino cru. Esses resultados indicam que o uso da espectroscopia Raman associada ao método de PCA permite identificar fraude no leite caprino cru analisando a presença dos carotenoides na composição do leite caprino, e também explorando a estrutura e a concentração dos ácidos graxos presentes nos diferentes leites (FOX et al., 2015; JENNESS, 1988).

O gráfico de *scores* da PCA gerado com os dados da primeira derivada dos espectros MIR (regiões de 3676-1000 cm^{-1}) é mostrado na Figura 33. A PC1 do modelo descreve 84% dos

resultados e a PC2 descreve 10%, portanto, a soma das duas primeiras componentes descreve 94% dos resultados.

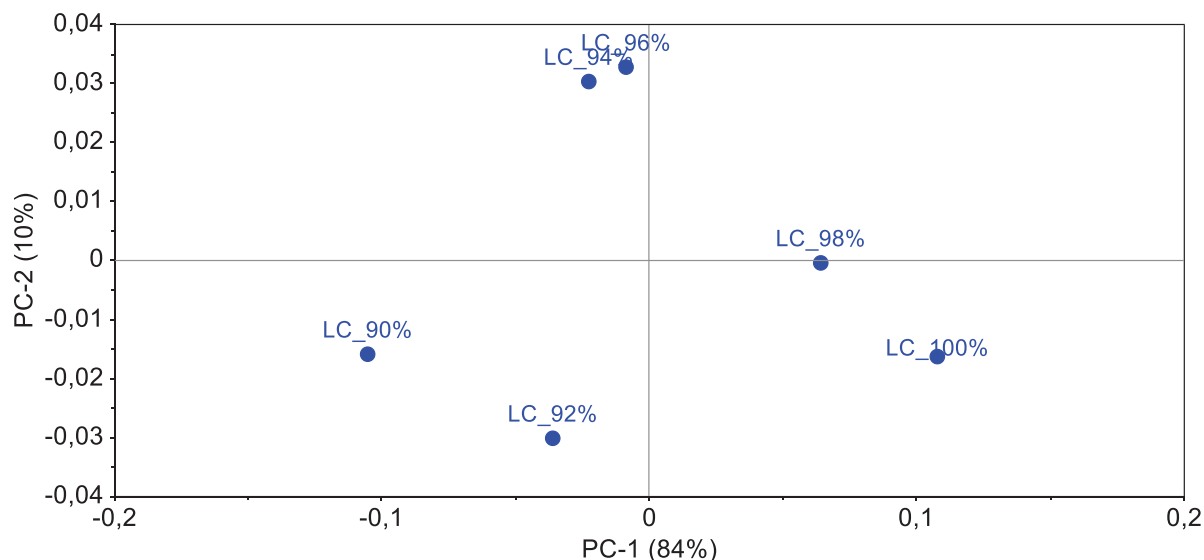


Figura 33 - Gráfico de *scores* da PC1 *versus* PC2 referente às amostras de leite do **lote 2** e construído com os dados da primeira derivada dos espectros MIR, região de 3676-1000 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Na Figura 33 o resultado da PCA ajusta a amostra LC_100% no quadrante positivo da PC1 e negativo da PC2, e as amostras adulteradas são ajustadas de forma decrescente ao longo da PC1 até a amostra de LC_90%, localizada no quadrante negativo da PC1 e da PC2. Esse resultado indica que o uso da técnica de PCA com os espectros de MIR, também é um método alternativo apropriado que permite diferenciar as amostras de leite adulteradas.

O gráfico de pesos da PC1 relativo aos resultados da PCA da Figura 33 é mostrado na Figura 34. Verifica-se que a maior contribuição na construção do modelo da PCA ocorre devido aos modos vibracionais de 2921 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} , os quais estão associados a gordura do leite e, portanto, ao perfil de ácidos graxos presentes em cada tipo de leite.

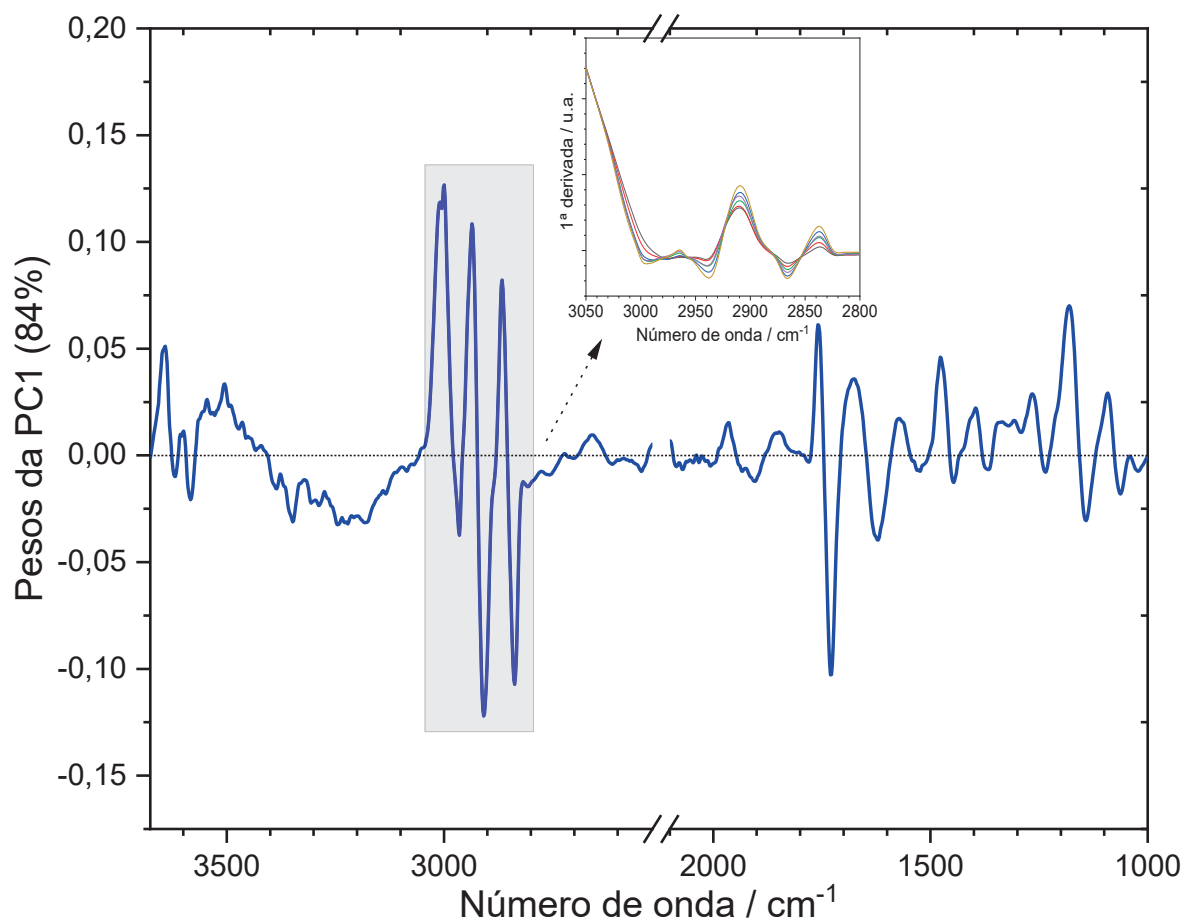


Figura 34 - Gráfico de pesos da CP1 *versus* o número de onda. Dados referentes a PCA das amostras de leite do **lote 2**, construída com os dados da primeira derivada dos espectros MIR. Em detalhe, a região de maior contribuição no modelo, sendo 3676-1000 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Nota-se no resultado de PCA utilizando os espectros MIR que a discriminação das amostras adulteradas foi realizada mesmo sem os espectros MIR apresentarem os modos vibracionais das moléculas de carotenoide presentes no leite bovino cru. Sendo assim, destaca-se a importância das estruturas de ácidos graxos presentes em cada tipo de leite, em contribuir com a discriminação das amostras.

Por último, a Figura 35 mostra o resultado da PCA utilizando os dados de primeira derivada dos espectros NIR (região de 9000–4500 cm^{-1}). A PC1 e a PC2 do modelo descrevem uma variância de 36% e 20%, respectivamente, dando uma soma de 56%.

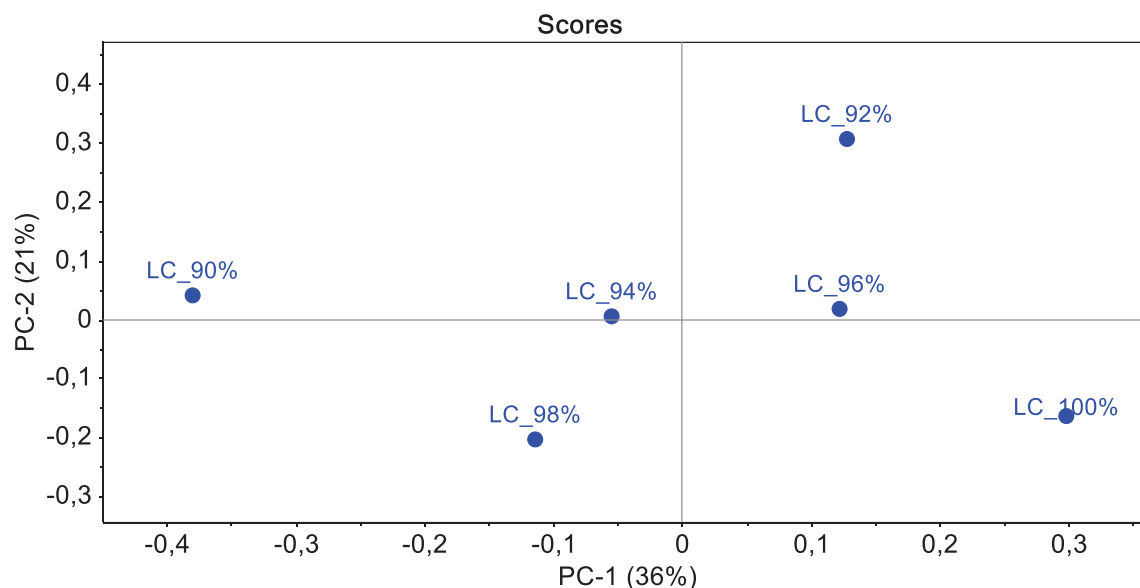


Figura 35 - Gráfico de *scores* da PC1 versus PC2, referente a amostra de leite do **lote 2**, construído com os dados da primeira derivada dos espectros NIR, região de 9000–4500 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

No gráfico de *scores* da Figura 35 o resultado da PCA obtido utilizando os dados de NIR, não apresentou o resultado esperado. Verifica-se que a amostra de LC_100% está localizada no quadrante positivo da PC1 e negativo da PC2, e a amostra LC_90% encontra-se no quadrante negativo da PC1 e positivo da PC2, diferenciando a amostra pura da amostra com maior adulteração. No entanto, as demais amostras não foram discriminadas de forma decrescente ao longo da PC1, semelhante aos resultados obtidos utilizando os espectros Raman e MIR. No gráfico de *scores* as amostras LC_94% e LC_98% estão alocadas próxima da amostra LC_90%, e as amostras LC_92% e LC_96% próxima da amostra LC_100%. Além disso, as primeiras componentes principais somam uma variância menor que 60%, indicando que os componentes (modos vibracionais) apresentaram baixa contribuição para a diferenciação das amostras de leite adulteradas.

A Figura 36 mostra o gráfico de pesos da PC1. Observa-se que as maiores contribuições ocorrem devido a banda de absorção na região em torno de 6923 cm^{-1} , a qual está relacionada aos modos vibracionais da água e das proteínas, e a região de 5199 cm^{-1} , que corresponde aos modos vibracionais da gordura.

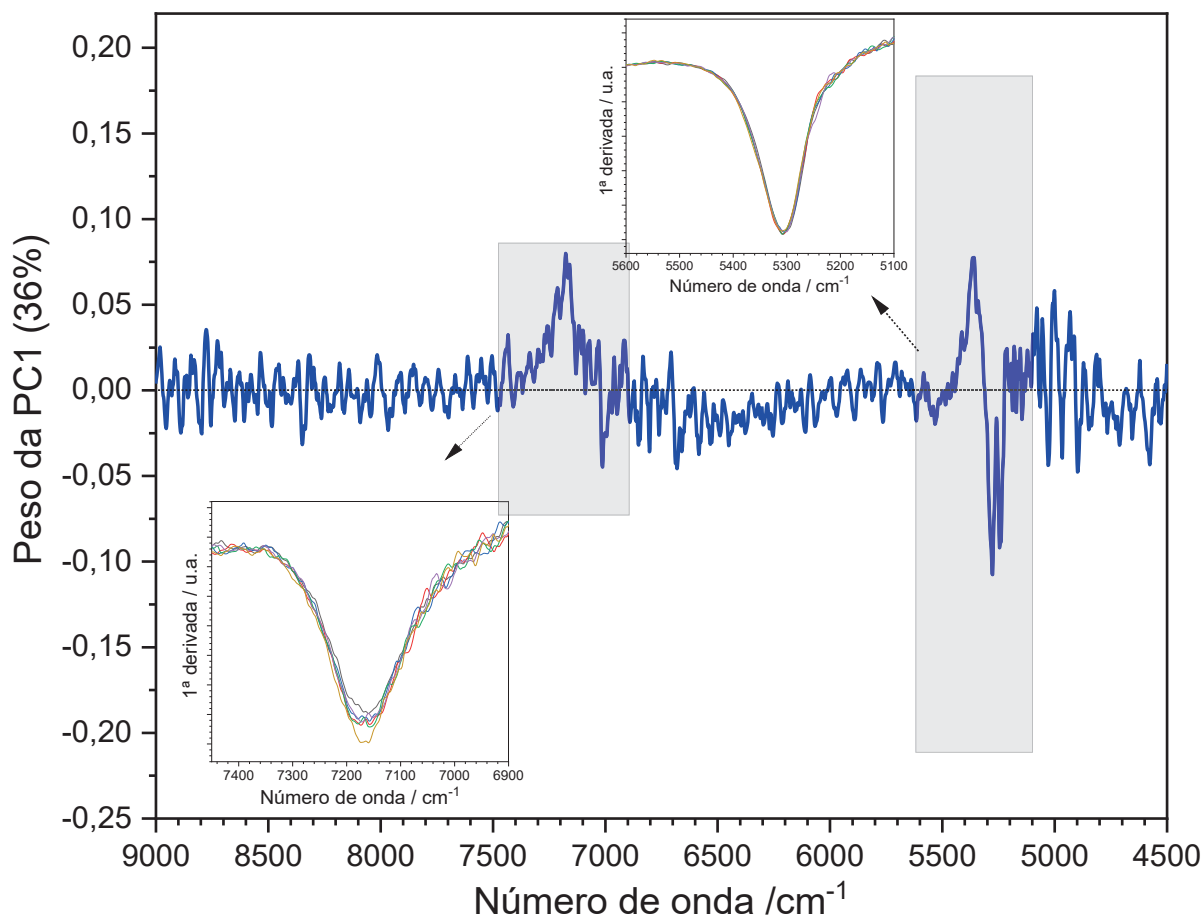


Figura 36 - Gráfico de *loadings* da CP1 *versus* o número de onda. Dados referentes a PCA das amostras de leite do **lote 2**, construída com os dados da primeira derivada dos espectros NIR. Em detalhe, as regiões de maior contribuição no modelo, sendo: 7450-6900 cm^{-1} e 5600-5100 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

5.2.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Nesta parte do trabalho serão apresentados os modelos de calibração multivariada empregando o método de regressão por PLS. Uma das aplicações da PLS tem sido sua utilização na seleção de variáveis visando à predição das características de um material, ou neste caso, a predição da porcentagem de adulteração nas amostras de leite do **lote 1** e **lote 2**. Os resultados a seguir apresentam um modelo de PLS construído com os espectros Raman das amostras do **lote 1** e outros três modelos construídos a partir dos espectros Raman, MIR e NIR das amostras do **lote 2**. Para a construção dos modelos de PLS foi realizado um pré-tratamento nos espectros, os quais foram normalizados com média qualquer e variância 1 (seção 2.5.3).

O modelo de PLS das amostras do **lote 1** foi construído utilizando 33 espectros Raman (região de 750-1800 cm^{-1}), sendo 24 espectros usados na calibração e 9 na validação. No modelo desenvolvido o número ótimo de variáveis latentes foi igual a nove, com valores de

RMSEC e RMSEP de 0,386 e 1,926, respectivamente. A Figura 37(a) mostra a relação linear da calibração e da validação a partir dos valores preditos pelo modelo PLS *versus* os valores das referências (% de leite caprino). Verifica-se que o valor do coeficiente de determinação dos valores preditos na calibração foi de $R^2 = 0,999$ e a dos valores preditos na validação foi de $R^2 = 0,978$.

Outro método adotado para verificar se não existe falta de ajuste no modelo PLS é a análise do gráfico de resíduo da calibração em função do valor predito. Quando os resíduos são distribuídos aleatoriamente, pode-se dizer que não há evidências de falta ou tendência no ajuste do modelo de previsão PLS. Desta forma, a aleatoriedade dos resíduos da calibração na Figura 37(b) não indica tendências no resultado de PLS.

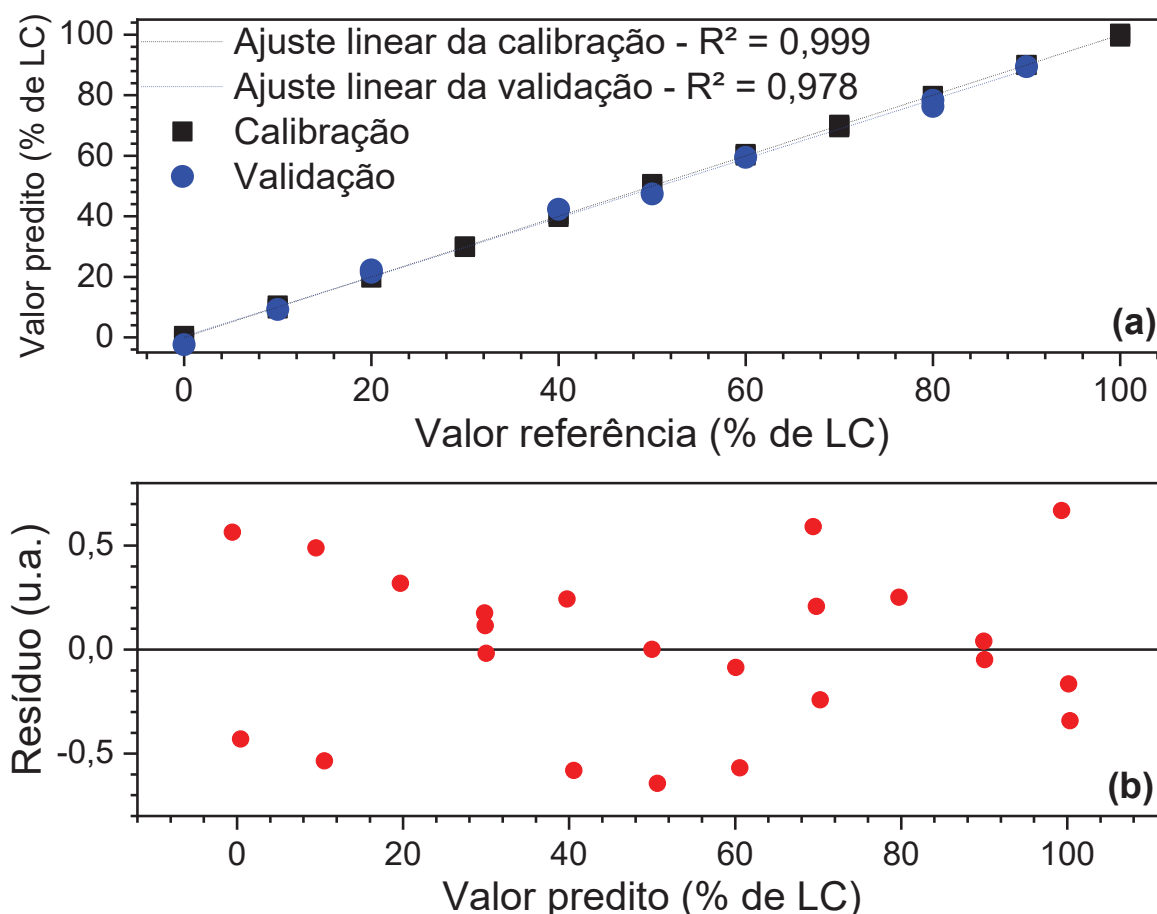


Figura 37 - Resultados de PLS obtidos com os espectros Raman das amostras do **lote 1**. (a) Valor predito *versus* valor da referência (% de leite caprino). (b) Gráfico de resíduo da calibração *versus* valor predito (% de leite caprino). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

A regressão PLS construída com os espectros Raman (região de $750-1800\text{ cm}^{-1}$) das amostras do **lote 2** é mostrada na Figura 38. O modelo foi construído com um total de 105 espectros, sendo 74 espectros utilizados na calibração do modelo e 31 na validação. O modelo

PLS foi ajustado com nove variáveis latentes, obtendo o valor de $RMSEC = 0,509$ e o $RMSEP = 1,227$. O coeficiente de determinação obtido com os valores preditos *versus* os valores de referência foi $R^2 = 0,998$ na calibração e $R^2 = 0,967$ na validação (Figura 38(a)). Na Figura 38(b) também observa-se uma aleatoriedade no resultados, indicando que não ocorreu falha no ajuste.

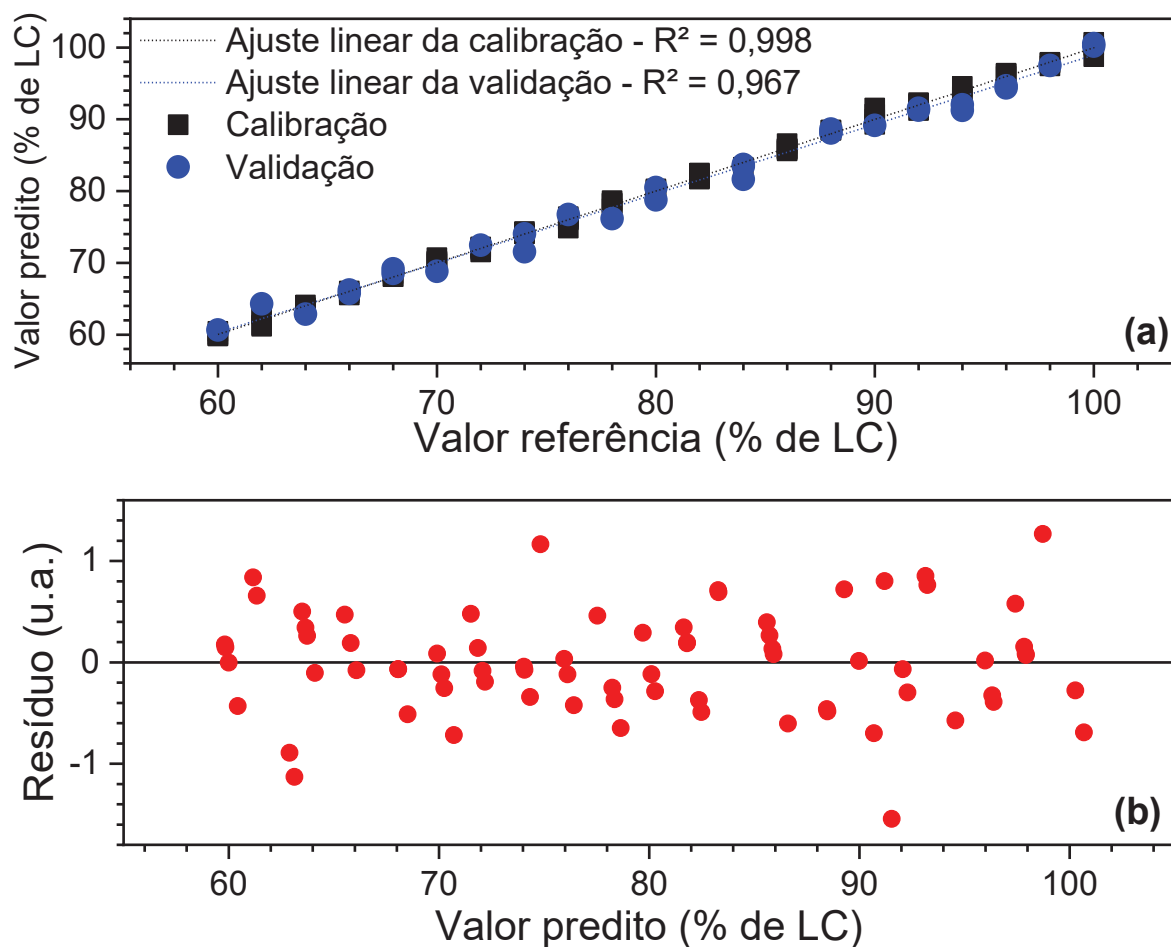


Figura 38 - Resultados de PLS obtidos com os espectros Raman das amostras do **lote 2**. (a) Valor predito *versus* valor da referência (% de leite caprino). (b) Gráfico de resíduo da calibração *versus* valor predito (% de leite caprino). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Na Figura 39 é mostrado os resultados da regressão PLS obtida utilizando os espectros MIR, região de $3676-2520\text{ cm}^{-1}$. Neste modelo foram usados 46 espectros para a calibração e 17 para a validação. Os valores de $RMSEC$ e de $RMSEP$ foram de $0,149$ e de $2,312$, respectivamente. O coeficiente de determinação da calibração foi $R^2 = 0,998$ e da validação $R^2 = 0,967$, como mostra a Figura 39(a). O gráfico de resíduos da calibração *versus* valor predito, Figura 39(b), não indica a ocorrência de falhas ou tendências nos resultados.

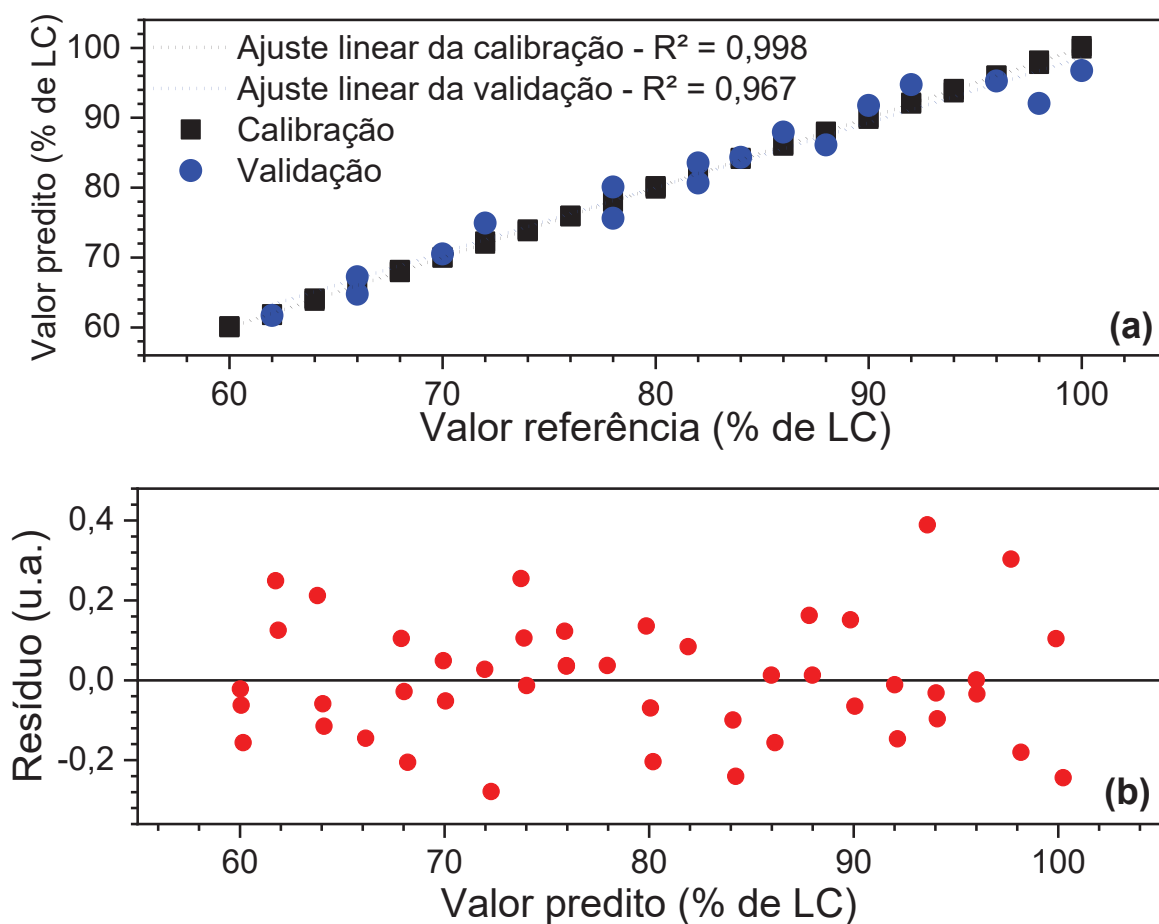


Figura 39 - Resultados de PLS obtidos com os espectros MIR das amostras do **lote 2**. (a) Valor predito *versus* valor da referência (% de leite caprino). (b) Gráfico de resíduo da calibração *versus* valor predito (% de leite caprino). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

O resultado de PLS obtido a partir dos espectros NIR, região de $9000\text{-}4500\text{ cm}^{-1}$, é mostrada na Figura 40. O modelo de PLS foi construído utilizando 46 espectros para a calibração e 17 para a validação. Obteve-se no modelo o valor de $\text{RMSEC} = 0,850$ e $\text{RMSEP} = 2,142$. Como mostra a Figura 40(a), o coeficiente de determinação na calibração foi de $R^2 = 0,995$ e na validação $R^2 = 0,917$. O gráfico de resíduos da calibração da Figura 40(b) não apresentou tendência no resultado.

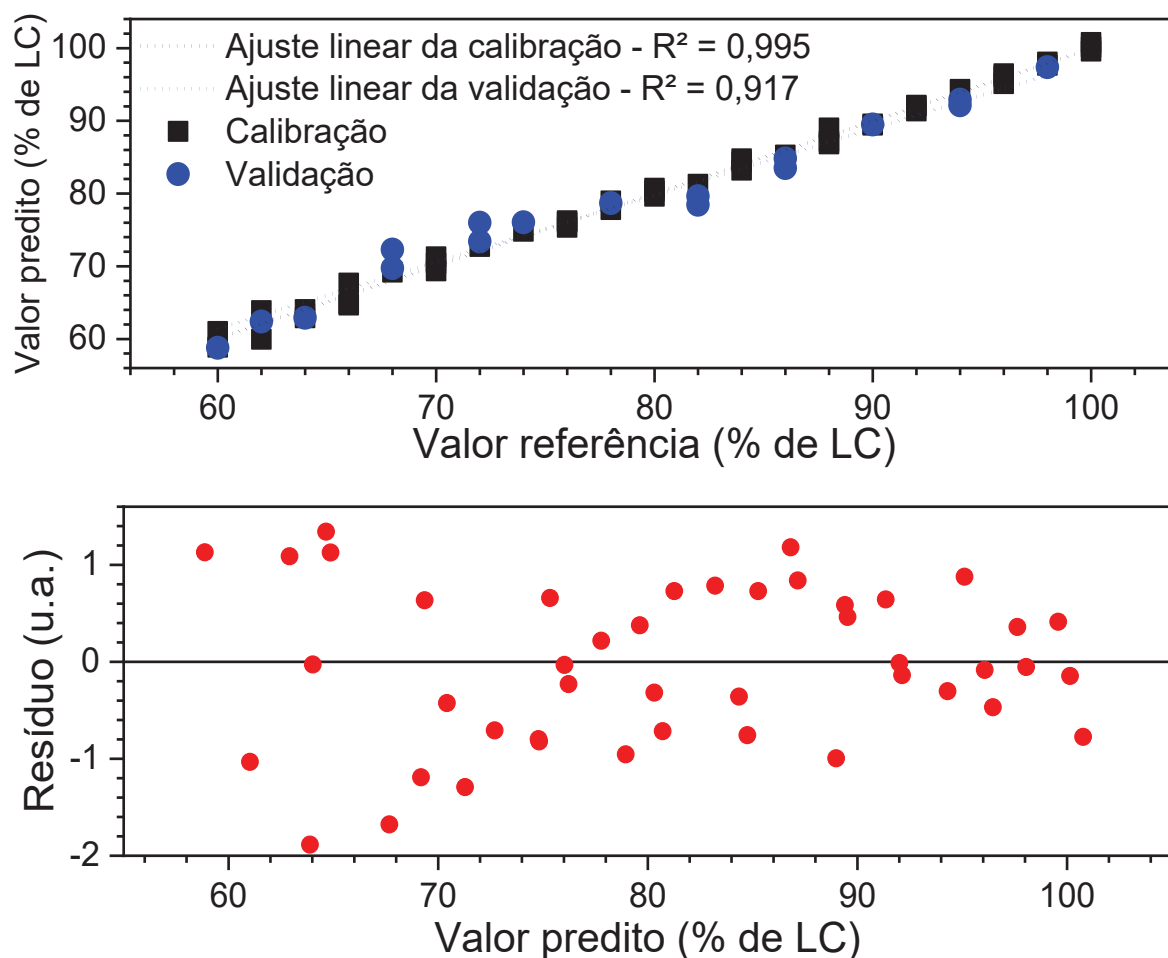


Figura 40 - Resultados de PLS obtidos com os espectros NIR das amostras do **lote2**. (a) Valor predito *versus* valor da referência (% de leite caprino). (b) Gráfico de resíduo da calibração *versus* valor predito (% de leite caprino). Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Na Tabela 7 verifica-se de forma resumida os valores de R^2 , RMSEC, RMSEP e erro relativo percentual (RE (%)), obtidos com a construção dos modelos de PLS.

Tabela 7 - Informações dos número de amostras usado em cada modelo de PLS e os valores obtidos de: coeficiente de determinação (R^2), raiz do erro quadrático médio de calibração (RMSEC), raiz do erro quadrático médio de predição (RMSEP) e erro relativo percentual (RE (%)).

Dados de espectroscopia	Calibração				Validação			
	Nº de amostras	R^2	RMSEC	RE(%)	Nº de amostras	R^2	RMSEP	RE(%)
Raman (lote 1)	23	0,999	0,386	0,63	10	0,978	1,926	3,54
Raman (lote 2)	74	0,998	0,509	0,63	31	0,967	1,228	1,49
MIR (lote 2)	46	0,999	0,149	0,19	17	0,967	2,312	2,80
NIR (lote 2)	46	0,995	0,849	1,04	17	0,917	2,143	2,71

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Observa-se na Tabela 7 que independente da técnica de espectroscopia utilizada, o coeficiente de determinação dos modelos de PLS explicam a variabilidade dos dados de calibração com $R^2 \geq 0,995$ e de validação com $R^2 > 0,960$. Com exceção da espectroscopia NIR, $R^2 = 0,917$. Além disso, o valor do erro relativo percentual na calibração dos modelos de PLS foi, $RE(\%) \leq 1$, indicando uma excelente capacidade de previsão do leite bovino como adulterante. Os valores do RMSEC $< 1,0$ e do RMSEP $\leq 2,3$, também indicam um bom grau de concordância entre os valores preditos pelos valores referências.

Portanto, os resultados de PLS obtidos sugerem que os métodos de análise e o modo de coleta dos dados utilizados neste estudo, permitem analisar e quantificar com boa precisão, a porcentagem de adulteração nas amostras de leite caprino adulteradas com a adição de leite bovino.

5.3 ESTUDO DO EFEITO DE SERS EM LEITE BOVINO PASTEURIZADO

Os substratos vítreos contendo as nanoestruturas de prata (Tabela 5) foram analisados por espectroscopia UV-Vis. Os espectros de absorção UV-Vis permitem verificar a existência de bandas de absorção características de nanoestruturas de prata (JIN et al., 2003; NOGUEZ, 2007; PASTORIZA-SANTOS; LIZ-MARZÁN, 2008).

A Figura 41 compara os espectros de absorção dos substratos vítreos dopados com 1% de íons de prata e produzidos com tratamento térmico de recozimento à 300 °C durante 0, 1, 3, 5, 8 e 11 minutos.

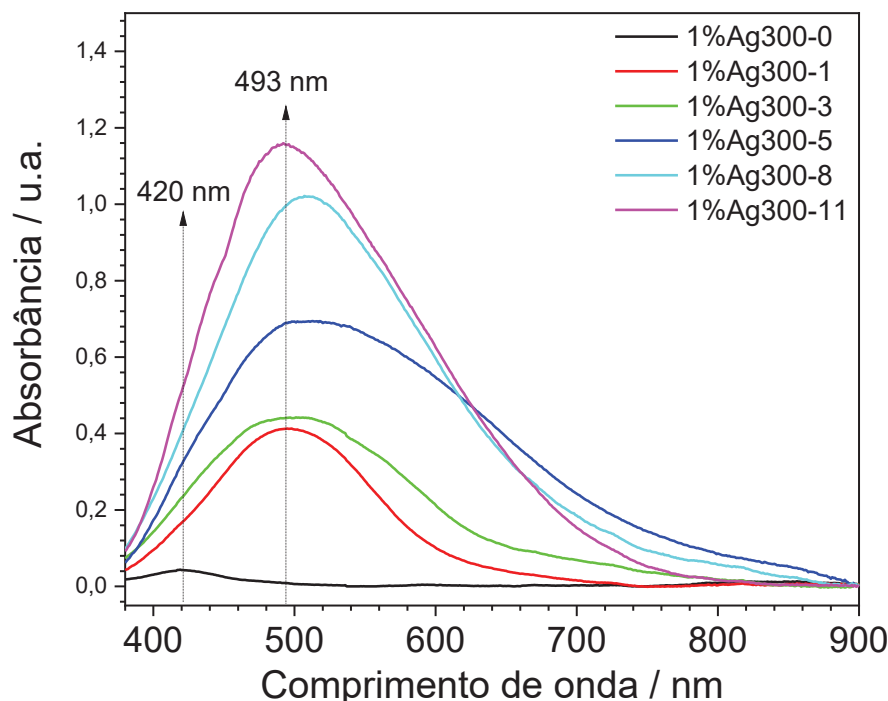


Figura 41 - Espectros de absorção UV-Vis dos substratos vítreos dopados com 1% de íons de prata (Ag) e produzidos com tratamento térmico de recozimento à 300 °C durante 0, 1, 3, 5, 8 e 11 minutos. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Observa-se nos resultados obtidos que o substrato 1%Ag300-0 (sem tratamento térmico) apresenta uma banda de baixa intensidade de absorção na região de 420 nm. Já os substratos que foram submetidos ao tratamento térmico de recozimento possuem uma larga banda de absorção em torno de 493 nm. Além disso, nota-se que a intensidade de absorção aumenta com o aumento do tempo de recozimento do substrato. O deslocamento e a intensa banda de absorção observada nos substratos tratados termicamente, indicam que devido ao processo de recozimento foram formadas nanoestruturas de prata na superfície do substrato, sendo as bandas de absorção referentes a ressonância de plasmon de superfície (SPR) (JIN et al., 2003; NOGUEZ, 2007; PASTORIZA-SANTOS; LIZ-MARZÁN, 2008; PEREIRA, 2016).

A Figura 42 compara os espectros de absorção UV-Vis normalizados dos substratos vítreos dopados com 1%, 3% e 6% de íons de prata e tratados termicamente à 300 °C durante 1 minuto.

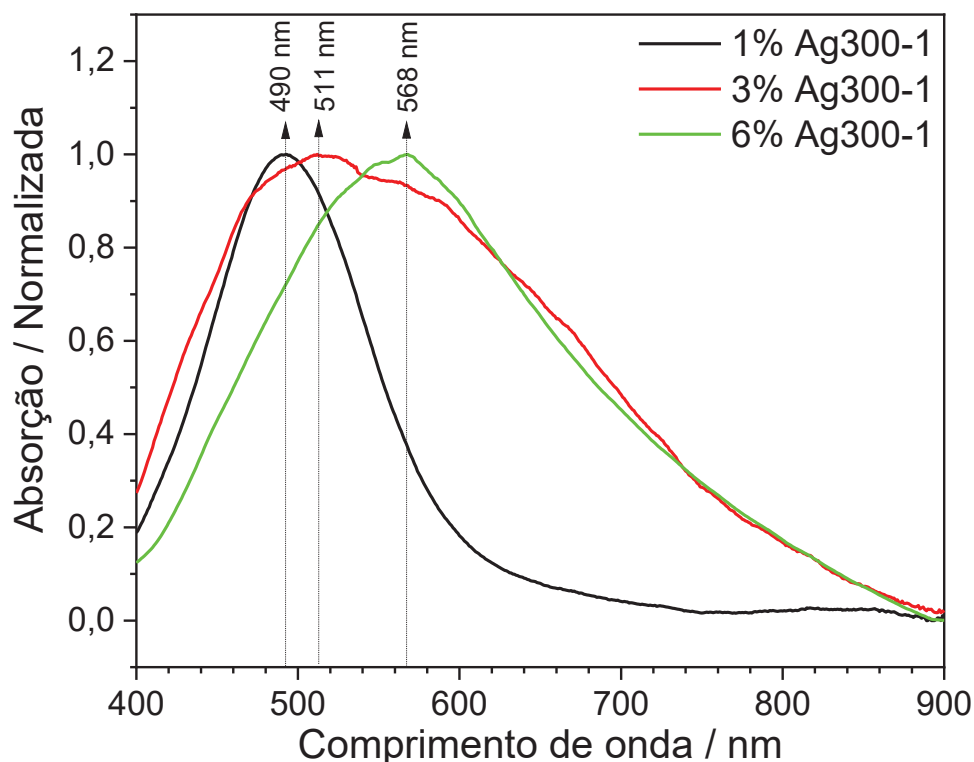


Figura 42 - Espectros de absorção UV-Vis dos substratos vítreos dopados com 1% (—), 3% (—) e 6% (—) de íons de prata (Ag), tratamento térmico de recozimento à 300 °C durante 1 minuto. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Nesses resultados novamente podemos observar que o espectro de absorção do substrato 1%Ag300-1 apresenta uma banda de absorção em 490 nm. Porém, com o aumento da porcentagem do dopante nos substratos, verifica-se que a banda de absorção se desloca para regiões de maior comprimento de onda, ocorrendo em 511 nm e 568 nm nos substratos 3%Ag300-1 e 6%Ag300-1, respectivamente. Nota-se também que ocorre um alargamento das bandas de absorção em função do aumento da porcentagem de dopante. De acordo com (JIN et al., 2003; NOGUEZ, 2007; PASTORIZA-SANTOS; LIZ-MARZÁN, 2008), a mudança de forma da banda de absorção das SPR e o deslocamento, indicam que devido a variação da porcentagem de dopante e/ou o tempo de tratamento térmico (BELUSSO et al., 2019; PEREIRA, 2016), as nanoestruturas de prata podem ter tamanhos e/ou formas diferentes.

A Figura 43 mostra o espectro Raman do leite bovino pasteurizado do tipo A, o qual foi utilizado como amostra referência no cálculo do fator de amplificação de sinal Raman. No estudo do efeito SERS em leite bovino pasteurizado, optou-se em analisar o espectro Raman do leite em três regiões, sendo: (a) 750-1350 cm^{-1} , (b) 1250-1800 cm^{-1} e (c) 2600-3100 cm^{-1} . Os espectros Raman foram obtidos irradiando as amostras com uma linha de *laser* de excitação de 488nm e com tempo de aquisição de 45 segundos.

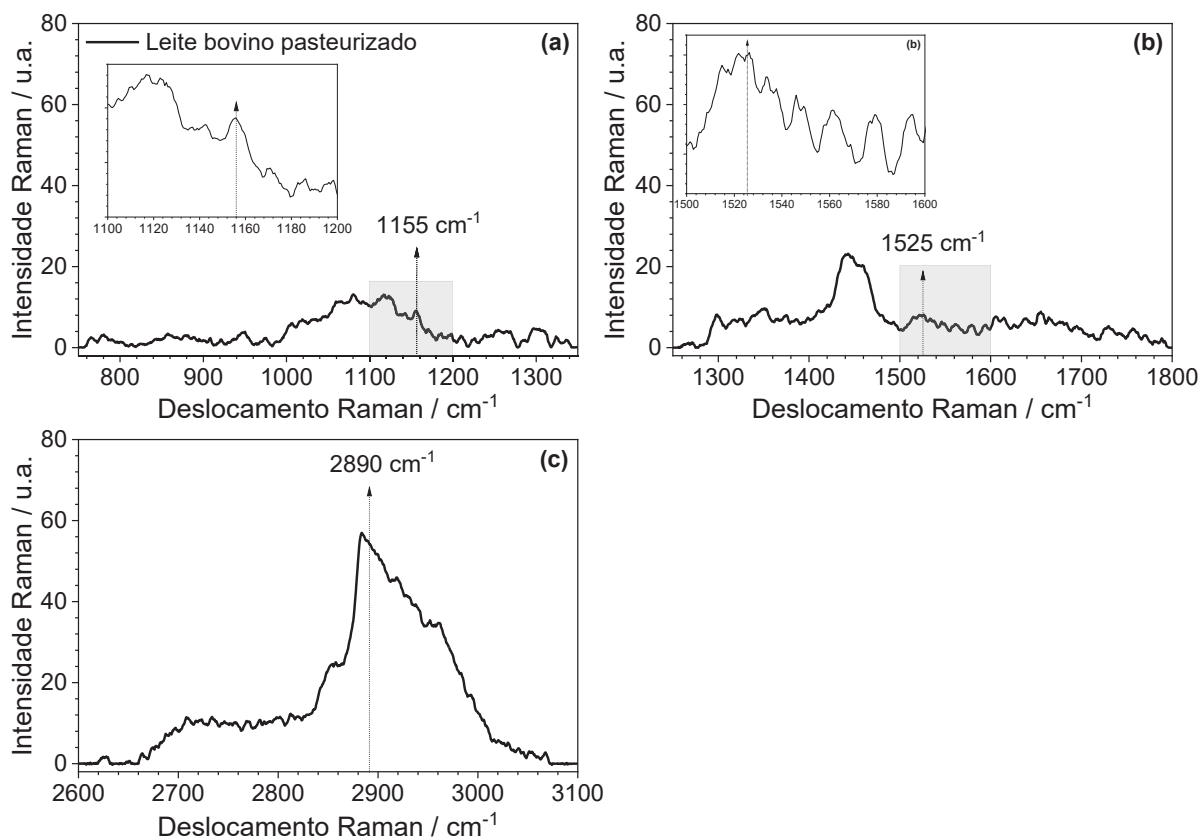


Figura 43 - Espectro Raman do leite bovino pasteurizado do tipo A. Região de (a) 750-1350 cm^{-1} , (b) 1250-1800 cm^{-1} e (c) 2600-3100 cm^{-1} . Em detalhe, (a) região de 1100-1200 cm^{-1} e (b) região de 1500-1600 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Na Figura 43 são destacados os modos vibracionais localizados na região de 1155 cm^{-1} , 1525 cm^{-1} e 2890 cm^{-1} . Os dois primeiros referente ao grupo dos carotenoides e o último ao grupo acila. Como analisado na seção 5.1.1, esses modos vibracionais são característicos do leite bovino e, portanto, foram escolhidos para calcular o fator de eficiência SERS.

Na literatura existem questionamentos e diferentes abordagens sobre como o cálculo da eficiência SERS deve ser realizado (LE RU et al., 2007; RU; ETCHEGOIN, 2009). Fatores como os padrões adotados na produção dos substratos SERS ativos, os diferentes instrumentos utilizados na caracterização das nanoestruturas metálicas e os modos de interação do adsorbato, influenciam no real valor do fator de eficiência SERS calculado (NATAN, 2006). Sendo assim, neste trabalho optou-se por estimar o fator de amplificação do sinal Raman ou fator de eficiência (EF) SERS, por:

$$EF = \frac{(I_{SERS}/C_{SERS})}{(I_{RN}/C_{RN})} \quad \text{Eq. 1.40}$$

sendo, I_{SERS} é a intensidade do pico do espectro SERS, I_{RN} é a intensidade Raman normal, C_{SERS} e C_{RN} é a concentração do leite bovino pasteurizado usado no SERS e na solução na amostra referência, respectivamente (LE RU et al., 2007; RU; ETCHEGOIN, 2009).

Os resultados SERS são apresentados em quatro seções. Nas três primeiras seções são mostrados os resultados SERS respectivos aos lotes de substratos com 1%, 3% e 6% de íons de prata. E na última seção compara-se os resultados SERS dos substratos que apresentaram maior fator de eficiência em cada lote.

5.3.1 Efeito SERS com substratos de 1%Ag300

Na Figura 44 compara-se os espectros Raman do leite bovino pasteurizado (sem substrato) com os espectros SERS do leite bovino pasteurizado depositado nos substratos do lote de 1%Ag300. Na Tabela 8 são registrados os valores do fator de eficiência SERS e em destaque estão os maiores EF estimados.

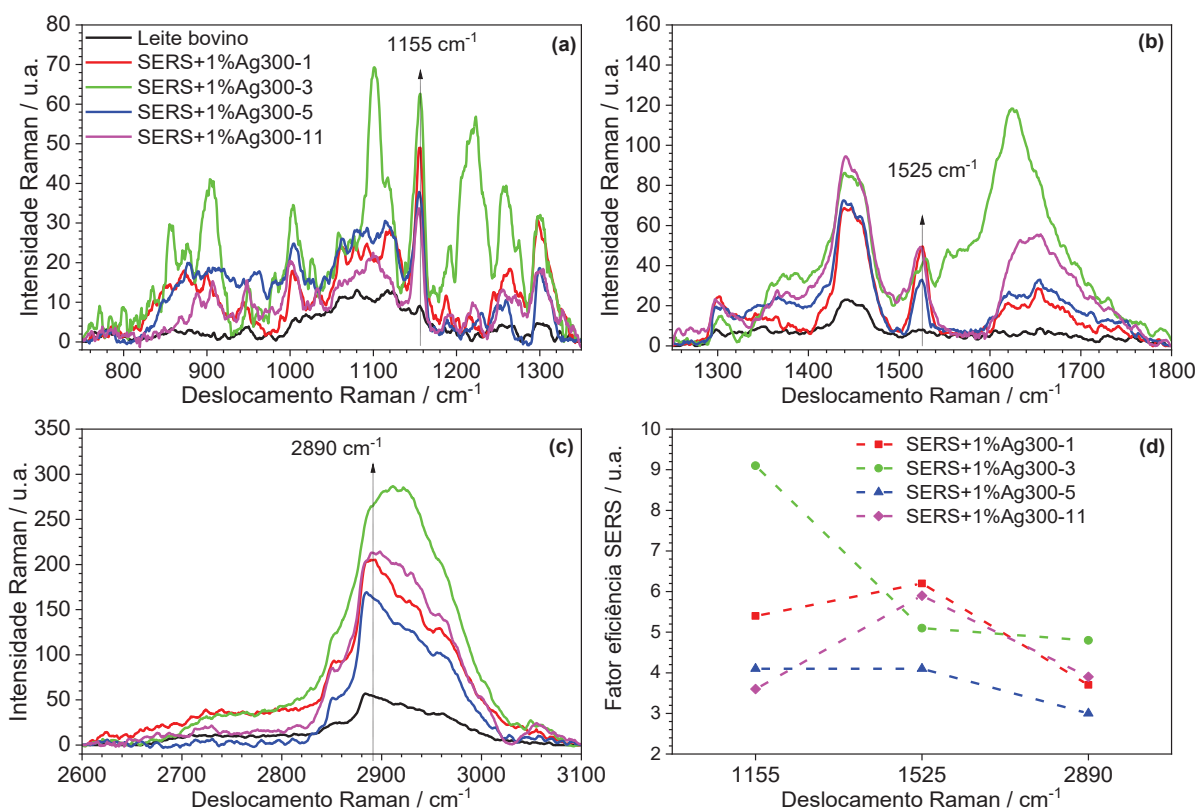


Figura 44 - Comparação do espectro Raman do leite bovino pasteurizado com os espectros SERS de leite bovino pasteurizado depositado nos substratos do lote de 1%Ag300. Região de (a) 750-1350 cm^{-1} , (b) 1250-1800 cm^{-1} e (c) 2600-3100 cm^{-1} . (d) Fator de eficiência SERS *versus* deslocamento Raman. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 8 - Fator de eficiência (EF) SERS obtidos utilizando o lote de substratos de 1%Ag300.

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Substratos				
	1%Ag300-1	1%Ag300-3	1%Ag300-5	1%Ag300-8	1%Ag300-11
1155	5,4	9,1	4,1	--	3,6
1525	6,2	5,1	4,1	--	5,9
2890	3,7	4,8	3,0	--	3,9

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Observa-se na Figura 44 que todos os substratos vítreos geraram amplificação de sinal Raman. Na Figura 44(a) a intensidade Raman na banda de 1155 cm^{-1} aumenta sem apresentar deslocamento ou alteração de forma e o maior fator de eficiência, $EF = 9,1$, ocorreu utilizando o substrato com tempo de tratamento térmico de 3 minutos (1%Ag300-3). Na Figura 44(b) nota-se que a maior amplificação de sinal Raman ocorre utilizando o substrato com tempo de tratamento de 1 minuto (1%Ag300-1) e com $EF = 6,2$, no modo vibracional de 1525 cm^{-1} . A Figura 44(c) mostra novamente que o maior efeito SERS é obtido utilizando o substrato 1%Ag300-3, com $EF = 4,8$ na banda de 2890 cm^{-1} . Na Figura 44(d) são comparados os fatores de eficiência SERS de cada substrato do lote de 1%Ag300 em função dos modos vibracionais analisados.

Os resultados de efeito SERS gerados pelos substratos dopados com 1% de íons de prata indicam que os substratos produzidos com os menores tempos de recozimento apresentam características específicas que permitem uma melhor eficiência da amplificação de sinal Raman do leite bovino pasteurizado. De acordo com (BELUSSO et al., 2019; SCHNEIDER, 2012), o processo de produção de substratos SERS ativos utilizando o método *bottom-up*, gera nanoesferas na superfície dos substratos SERS, e essas nanoesferas apresentaram tamanho menores quando submetidos a um menor tempo de recozimento.

Os resultados do efeito SERS obtidos utilizando o substrato 1%Ag300-8 apresentaram um comportamento não esperado, não sendo possível utilizar esses resultados na análise e na comparação com os demais resultados SERS.

5.3.2 Efeito SERS com substratos de 3%Ag300

Os resultados de efeito SERS do leite bovino pasteurizado obtidos utilizando os substratos vítreos do lote de 3%Ag300 são mostrados na Figura 45. A Tabela 9 contém os valores dos EF estimados.

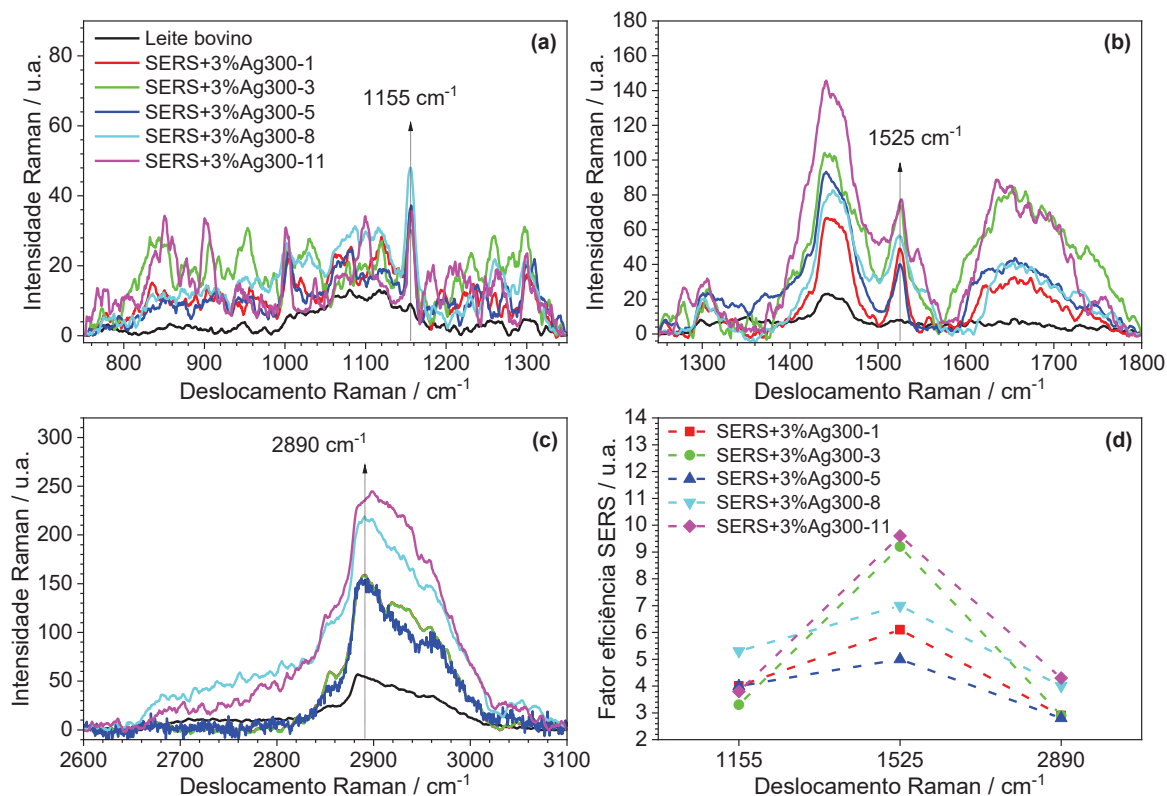


Figura 45 - Comparação do espectro Raman do leite bovino pasteurizado com os espectros SERS de leite bovino pasteurizado depositado nos substratos do lote de 3%Ag300. Região de (a) 750-1350 cm^{-1} , (b) 1250-1800 cm^{-1} e (c) 2600-3100 cm^{-1} . (d) Fator de eficiência SERS *versus* deslocamento Raman. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 9 - Fator de eficiência (EF) SERS obtidos utilizando o lote de substratos de 3%Ag300.

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Substratos				
	3%Ag300-1	3%Ag300-3	3%Ag300-5	3%Ag300-8	3%Ag300-11
1155	4,0	3,3	4,0	5,3	3,8
1525	6,1	9,2	5,0	7,0	9,6
2890	2,9	2,9	2,8	4,0	4,3

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Na banda de 1155 cm^{-1} (Figura 45(a)) verifica-se que o substrato com tempo de recozimento de 8 minutos apresentou $EF = 5,3$, sendo esse o maior fator de eficiência quando comparado com os resultados dos demais substratos. Com relação aos modos vibracionais em 1525 cm^{-1} e 2890 cm^{-1} (Figura 45(b) e (c), respectivamente), o substrato com 11 minutos de tratamento térmico gerou os maiores fatores de eficiência SERS, sendo de 9,6 e 4,3, respectivamente.

Nesse caso os resultados de efeito SERS obtidos com o lote de substratos de 3%Ag300 indicam que devido ao aumento na porcentagem de dopante, os substratos SERS produzidos com maior tempo de tratamento térmico, apresentaram características que permitiram maiores

efeitos de amplificação de sinal Raman do leite bovino pasteurizado, diferenciando dos resultados obtidos com o uso do lote 1%Ag300.

5.3.3 Efeito SERS com substratos de 6%Ag300

Os resultados do efeito SERS em leite bovino pasteurizado utilizando o lote de 6%Ag300 são mostrados na Figura 46 e na Tabela 10 são apresentados os valores estimados dos *EF*.

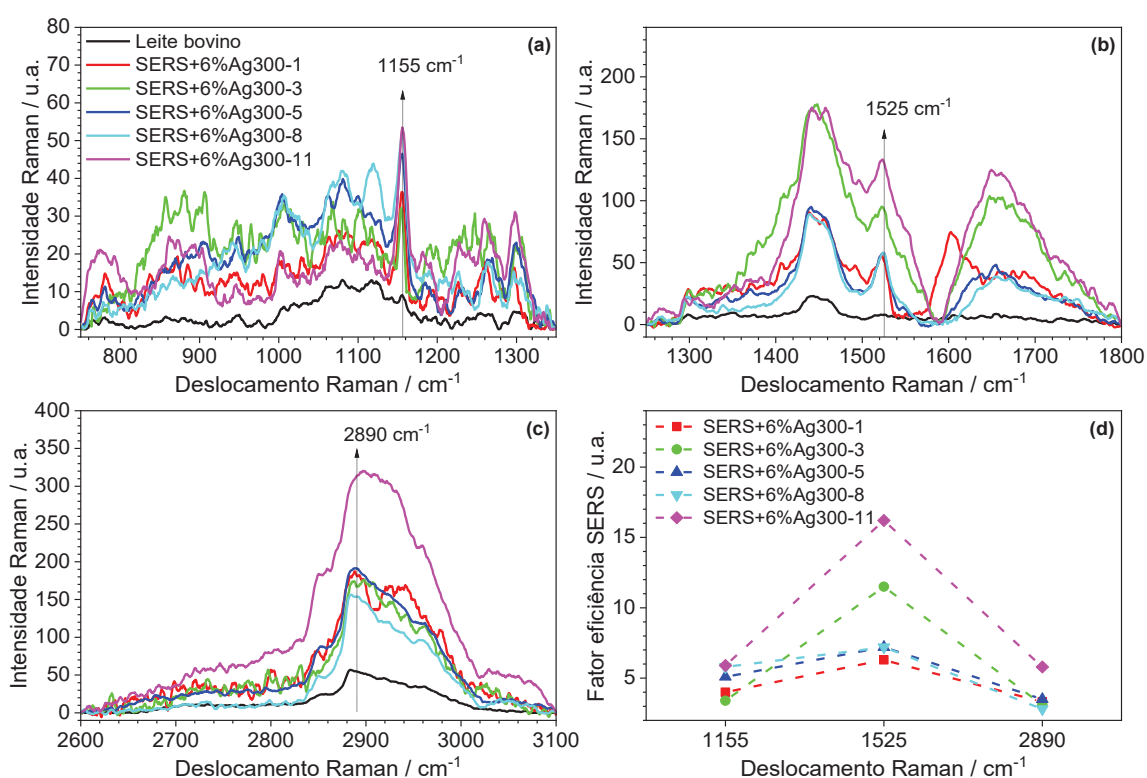


Figura 46 - Comparação do espectro Raman do leite bovino pasteurizado com os espectros SERS de leite bovino pasteurizado depositado nos substratos do lote de 6%Ag300. Região de (a) 750-1350 cm^{-1} , (b) 1250-1800 cm^{-1} e (c) 2600-3100 cm^{-1} . (d) Fator de eficiência SERS *versus* deslocamento Raman. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Tabela 10 - Fator de eficiência (*EF*) SERS obtidos utilizando o lote de substratos de 6%Ag300.

Deslocamento Raman (cm^{-1})	Substratos				
	6%Ag300-1	6%Ag300-3	6%Ag300-5	6%Ag300-8	6%Ag300-11
1155,8	4,0	3,4	5,1	5,8	5,9
1525,6	6,3	11,5	7,2	7,2	16,2
2890,4	3,3	3,1	3,5	2,8	5,8

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Observa-se na Figura 46 que todos os substrato dopados com 6% de íons de prata também geraram amplificação de sinal Raman do leite bovino pasteurizado, no entanto, nesse caso o substrato com o maior tempo de tratamento térmico, 6%Ag300-11, apresentou os maiores fatores de eficiência SERS nas três regiões analisadas. Os fatores de eficiência foram 5,9, 16,2 e 5,8 nos modos vibracionais de 1155, 1525 e 2890 cm^{-1} , respectivamente.

Os resultados do lote de 6%Ag300 condizem com os resultados do lote 3%Ag300, o qual também apresentou maiores fatores de amplificação de sinal Raman, com os substratos SERS submetidos a maiores tempos e tratamento térmico.

5.3.4 Comparação do efeito SERS dos lotes de 1%, 3% e 6% de Ag

A Figura 46 compara os espectros SERS obtidos utilizando os substratos 1%Ag300-3, 3%Ag300-11 e 6%Ag300-11, os quais relativamente apresentaram os maiores fatores de eficiência SERS em seus respectivos lotes.

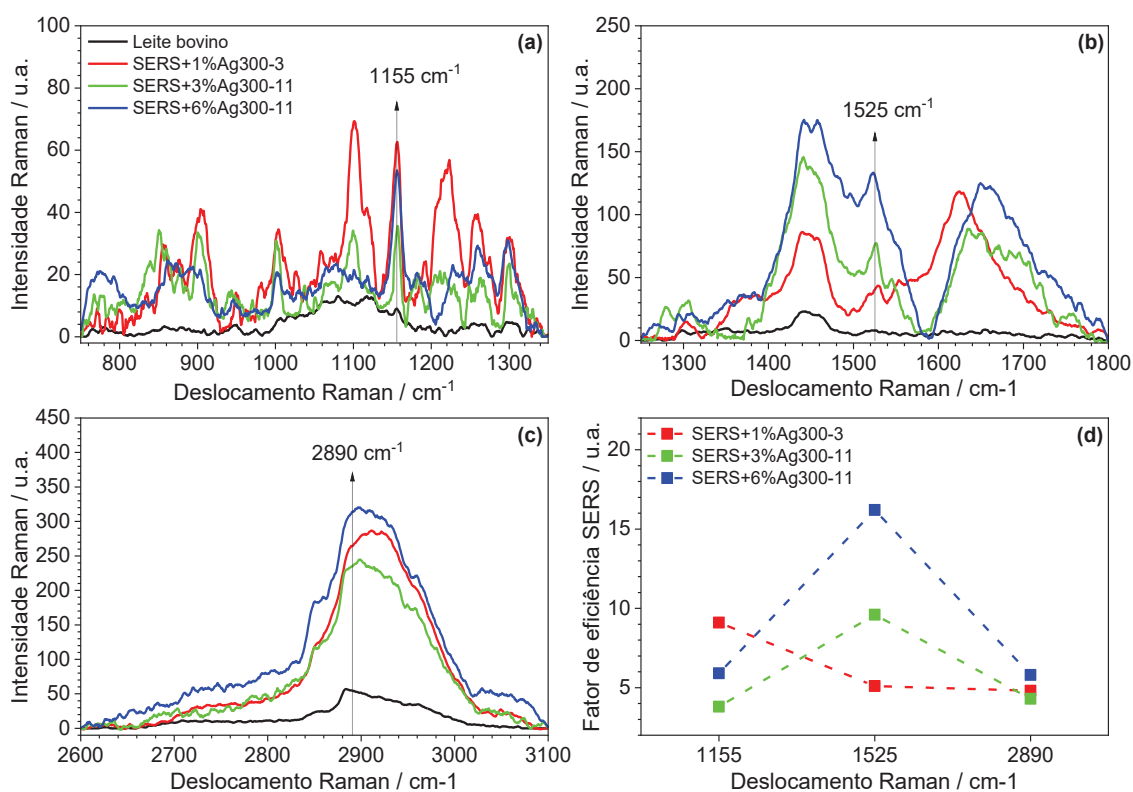


Figura 47 - Comparação do espectro Raman do leite bovino pasteurizado (—) com os espectros SERS do leite bovino pasteurizado depositados nos substratos de 1%Ag300-3 (—), 3%Ag300-11 (—) e 6%Ag300-11 (—). Região de (a) 750-1350 cm^{-1} , (b) 1250-1800 cm^{-1} e

(c) 2600-3100 cm^{-1} . (d) Fator de eficiência SERS *versus* deslocamento Raman. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Observa-se na Figura 46(a) e (d) que o modo vibracional em 1155 cm^{-1} tem o maior fator de eficiência SERS, sendo causado pelo substrato 1%Ag300-3. Já no modo vibracional em 1525 cm^{-1} (Figura 46(b) e (d)), o maior *EF* é resultante do uso do substrato 6%Ag300-11, o qual possui a maior porcentagem de dopante e o maior tempo de recozimento. Por fim, no modo vibracional em 2890 cm^{-1} (Figura 46(c)) observa-se que o maior fator de eficiência SERS também é devido ao substrato 6%Ag300-11. Entretanto, nota-se que os *EF* SERS estimados na banda de 2890 cm^{-1} apresentaram pequena variação de valores quando comparados com os *EF* estimados dos modos vibracionais em 1155 cm^{-1} e em 1525 cm^{-1} , indicando que as moléculas referentes ao modo vibracional de 2890 cm^{-1} , foram pouco susceptíveis ao efeito SERS.

Os espectros SERS de leite bovino pasteurizado mostram que todos os substratos SERS ativos utilizados no estudo permitiram amplificar o sinal Raman do leite. Porém, os diferentes valores de *EF* SERS estimados indicam que devido a variação na porcentagem dos íons de prata utilizados como dopante e/ou a variação no tempo de recozimento dos substratos, as nanoestruturas de prata crescidas na superfície dos substratos vítreos possuem diferentes tamanho e distância entre si. Além disso, o leite apresenta grande variedade de componentes presentes em sua composição, dessa forma a interação desses componentes com as nanoestruturas de pratas também resultaram em uma variação dos valores de *EF*. Portanto, verifica-se a necessidade de realizar uma análise dos substratos SERS por microscopia de força atômica e por microscopia eletrônica de varredura, para uma possível associação dos *EF* estimados com o tamanho e a dispersão das nanoestruturas de prata nos substratos.

6 CONCLUSÕES

As técnicas de espectroscopia Raman e de infravermelho utilizadas neste trabalho permitiram realizar o estudo da caracterização dos componentes presentes nas amostras de leite bovino e caprino. Com o equipamento de espectroscopia Raman, a resolução do equipamento permitiu identificar o modo de vários componentes semelhantes presentes nos dois tipos de leite, e detectou as moléculas do grupo de carotenoides presentes no leite bovino cru, permitindo diferenciar a amostra de leite bovino cru da amostra de leite caprino cru. Com relação a espectroscopia de infravermelho (MIR e NIR), apesar dos equipamentos não terem detectado os modos vibracionais das moléculas de carotenoides, os resultados mostraram pequenas variações na intensidade das bandas absorção, indicando que os equipamentos apresentaram resolução para diferenciar os componentes presentes nos leites bovinos e caprinos, em especial os grupos de ácido graxos.

No estudo da identificação de fraude no leite caprino com a adição do leite bovino, os resultados mostraram que somente com uma simples comparação dos espectros (Raman, MIR e NIR) não é possível afirmar a existência desse tipo de fraude. No entanto, ao associar os espectros de Raman e MIR com a técnica de análise de componentes principais (PCA), os resultados mostraram que esse tipo de análise é eficiente em diferenciar as amostras adulteradas com 90-100% de leite caprino. Com relação ao modelo de PCA gerado com os espectros de NIR, o resultado qualitativo obtido não foi tão preciso quanto aqueles obtidos com dado de Raman e de MIR. Supõe-se que o método adotado de coleta de dados na espectroscopia NIR, não permitiu detectar modos vibracionais relevantes para um estudo qualitativo de PCA.

A comparação dos resultados de *loadings* dos modelos de PCA do **lote 1** e **lote 2** obtidos com os espectros Raman, mostraram que em fraudes geradas pela adição do leite bovino em leite caprino, além de ser possível identificar a fraude devido a detecção das moléculas de carotenoides típica do leite bovino, as diferentes porcentagens de colesterol e de ácido graxo (saturado e insaturado) presentes em cada tipo de leite, também contribuem para a discriminação das amostras.

Com relação aos resultados quantitativos de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), os modelos de regressão obtidos apresentaram resultados satisfatórios em todos os casos analisados. Destaca-se os modelos de PLS gerados com os dados de espectroscopia Raman e MIR, os quais apresentaram valores de coeficiente de determinação na calibração de $R^2 \geq 0,995$ e na validação de $R^2 > 0,960$.

Portanto, os resultados obtidos indicam que o uso das espectroscopias vibracionais Raman e de infravermelho combinado com as técnicas de PCA e PLS podem ser úteis nas indústrias e nos órgãos de fiscalização como métodos alternativos de detecção de fraudes em leite. Um fator importante a ressaltar é que o estudo foi realizado em amostras de leite cru, sem serem submetidas a nenhum tratamento físico ou químico específico, tornando as análises rápidas e de baixo custo.

No estudo do efeito SERS as medidas de espectroscopia UV-Vis realizadas nos substratos vítreos dopados com íons de prata, indicaram bandas de absorção referentes a ressonância de plasmon de superfície, como era esperado. No entanto, o alargamento e o deslocamento da banda de absorção, indica que devido ao aumento da porcentagem de dopante e/ou a variação no tempo do tratamento térmico de recozimento, as nanoestruturas metálicas formadas na superfície dos substratos possuem diferentes tamanhos.

Em relação aos resultados de amplificação de sinal Raman do leite bovino pasteurizado, estes mostraram-se satisfatórios. Neste estudo independentemente do tempo de recozimento do substrato ou da porcentagem de dopantes, todos os substratos SERS ativos utilizados geraram à amplificação de sinal Raman do leite bovino pasteurizado. No entanto, no lote de substratos com o 1% de dopagem a maior amplificação de sinal Raman foi obtida com os substratos que foram submetidos a menores tempos de tratamento térmico. Já no lote de substratos com 3% e 6% de dopante, as maiores amplificações de sinal Raman foram resultantes dos substratos com maior tempo de recozimento. Portanto, os resultados indicam que esses substratos vítreos são eficientes em amplificar o sinal Raman do leite bovino pasteurizado, todavia, ainda há necessidade de analisar os substratos vítreos através de equipamentos como o microscópio eletrônico de varredura (MEV) e o microscópio de força atômica (AFM, do inglês, *atomic force microscopy*). Desta forma, será possível verificar a forma, o tamanho e a dispersão das nanoestruturas de prata na superfície dos substratos vítreos, permitindo assim associar a configuração ideal das nanoestruturas de prata com os maiores fatores de eficiência SERS obtidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, M. R.; CAMPÊLO, C. DA S.; SILVA, J. B. A. DA. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2014.

AL HAJ, O. A.; AL KANHAL, H. A. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 12, p. 811–821, dez. 2010.

ALABURDA, J. et al. Sulfonamidas em leite por cromatografia líquida de alta eficiência com derivação pré-coluna e detecção por fluorescência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 11, p. 1587–1592, nov. 2007.

ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 15, p. 5215–5217, 1 jun. 1977.

ALMEIDA, M. R. DE. **Avaliação da Qualidade e Variedade de Leite em Pó e Leite Condensado por Espectroscopia Raman e Análise Multivariada**. Dissertação (Mestrado em Química)—Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2011.

ANDERSSON, M. A comparison of nine PLS1 algorithms. **Journal of Chemometrics**, v. 23, n. 10, p. 518–529, out. 2009.

AROCA, R. **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

AUNE, D. et al. Dairy products and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 4, p. 1066–1083, 1 out. 2013.

BARROS NETO, B. DE; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401–1406, dez. 2006.

BELL, S. J. et al. The New Dietary Fats in Health and Disease. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 97, n. 3, p. 280–286, mar. 1997.

BELUSSO, L. C. S. et al. Synthesis of silver nanoparticles from bottom up approach on borophosphate glass and their applications as SERS, antibacterial and glass-based catalyst. **Applied Surface Science**, v. 473, n. December 2018, p. 303–312, abr. 2019.

BOYAZOGLU, J.; MORAND-FEHR, P. Mediterranean dairy sheep and goat products and their quality. **Small Ruminant Research**, v. 40, n. 1, p. 1–11, abr. 2001.

BRERETON, R. G. **Applied Chemometrics for Scientists**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

BROW, R. K. Nature of Alumina in Phosphate Glass: I, Properties of Sodium Aluminophosphate Glass. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 76, n. 4, p. 913–918, abr. 1993.

- BRUKER. **Manual - Vertex series**, [s.d.]. Disponível em: <https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FT-IR/VERTEX/Brochures/VERTEXseries_Brochure_EN.pdf>
- BRUNS, R. E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Quimica Nova**, v. 8, n. 2, p. 84–99, 1985.
- BUENO, W. A. **Manual de espectroscopia vibracional**. [s.l.: s.n.].
- BUTLER, J. A. et al. Pasteurization of Discard Mycoplasma Mastitic Milk Used to Feed Calves: Thermal Effects on Various Mycoplasma. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 10, p. 2285–2288, out. 2000.
- CARBONARO, M.; NUCARA, A. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. **Amino Acids**, v. 38, n. 3, p. 679–690, 2010.
- CARDINAL, M. F. et al. Expanding applications of SERS through versatile nanomaterials engineering. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 13, p. 3886–3903, 2017.
- CATUNDA, K. L. M. et al. Revisão De Literatura Leite Caprino: Características Nutricionais, Organolépticas E Importância Do Consumo. **Conselho Regional de Medicina Veterinária**, p. 34–55, 2016.
- CHEN, X. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy toward application in plasmonic photocatalysis on metal nanostructures. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 21, p. 54–80, dez. 2014.
- CHRISTIE, W. W. The Composition and Structure of Milk Lipids. In: **Developments in Dairy Chemistry—2**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1983. v. 5p. 1–35.
- CNA, C. DA A. E P. DO B. **Panorama do Agro - Pecuária**. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>>. Acesso em: 16 nov. 2020a.
- CNA, C. DA A. E P. DO B. **Crescimento esperado de 10,6% no Valor Bruto da Produção Agropecuária em 2020**. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/boletins/valor-bruto-da-producao-deve-alcancar-r-700-bi-em-2020-1>>. Acesso em: 25 jan. 2021b.
- CORIO, P. et al. Contribution of the Charge Transfer Mechanism to the Surface-Enhanced Raman Scattering of the Binuclear Ion Complex [Fe₂((Bpe)(CN)₁₀]⁶⁻ Adsorbed on a Silver Electrode in Different Solvents. **Langmuir**, v. 15, n. 7, p. 2500–2507, mar. 1999.
- DE KRUIF, C. G.; HOLT, C. Casein Micelle Structure, Functions and Interactions. In: **Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins**. Boston, MA: Springer US, 2003. v. 1p. 233–276.
- DECRETO Nº 66.183. **DECRETO Nº 66.183, DE 5 DE FEVEREIRO DE 1970**. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1970-1979/decreto-66183-5-fevereiro-1970-407603-publicacaooriginal-1-pe.html>>. Acesso em: 3 dez. 2020.
- DONALD L. PAVIA et al. **Introdução à espectroscopia**. 4a. edição ed. [s.l.: s.n.].

EIFERT, E. DA C. et al. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 219–228, fev. 2006.

EL-ABASSY, R. M. et al. Fast determination of milk fat content using Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 56, n. 1, p. 3–8, maio 2011.

EL-ZEINI, H. Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 15, n. 2, p. 147–153, 2006.

ELWOOD, P. C. et al. The Survival Advantage of Milk and Dairy Consumption: an Overview of Evidence from Cohort Studies of Vascular Diseases, Diabetes and Cancer. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 723S-734S, dez. 2008.

EMBRAPA. **Composição.** Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html#:~:text=Agência de Informação Embrapa Composição&text=O leite é uma combinação,proteínas%2C sais minerais e vitaminas>. Acesso em: 20 nov. 2020.

EMBRAPA. Anuário do Leite 2019: novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. **Anuario Leite**, p. 104, 2019.

F. S. ANDRADE, G.; BROLO, A. G.; TEMPERINI, M. L. A. Comparison of SERS Performances of Co and Ni Ultrathin Films over Silver to Electrochemically Activated Co and Ni Electrodes. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 39, p. 15348–15355, 2 out. 2008.

FAO. **Top Producing Countries of Goat Milk.** Disponível em: <<https://www.tridge.com/intelligences/goat-milk/production>>. Acesso em: 26 jan. 2021.

FARRELL, H. M. et al. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 2–3, p. 135–147, jun. 2006.

FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W. **Introductory Raman Spectroscopy.** 2^a ed. [s.l.] Elsevier, 2003. v. 4

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724–731, set. 1999.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações.** [s.l.: s.n.].

FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163–166, maio 1974.

FONTECHA, J. et al. Composition of goat's milk fat triglycerides analysed by silver ion adsorption-TLC and GC-MS. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1–2, p. 119–128, jan. 2000.

FORATO, L. A.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 146–150, abr. 1998.

FOWLES, G. R. **Introduction to modern optics**. Second ed. [s.l.] Dover Publications, 1898.

FOX, P. F. et al. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. 2ª Edição ed. Cham: Springer International Publishing, 2015.

GALLIER, S. et al. Composition of bovine milk fat globules by confocal Raman microscopy. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 6, p. 402–412, jun. 2011.

GARCÍA-VIDAL, F. J.; PENDRY, J. B. Collective Theory for Surface Enhanced Raman Scattering. **Physical Review Letters**, v. 77, n. 6, p. 1163–1166, 5 ago. 1996.

GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 58, n. 5, p. 767–782, maio 2003.

GEMPERLINE, P. **Practical Guide to Chemometrics**. 2nd. ed. [s.l.] CRC/Taylor & Francis, 2006.

GONTIJO, L. C. **Uso de espectrometria no infravermelho médio, calibração multivariada e seleção de variáveis por intervalos na quantificação de biodieseis em misturas com diesel**. Tese (Doutorado em Química)—Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

GRIFFITHS, P. Fourier transform infrared spectrometry. **Science**, v. 222, n. 4621, p. 297–302, 21 out. 1983.

HOLLAS, J. M. **Modern Spectroscopy**. Fourth ed. [s.l.] Wiley, 2013.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; JUNIOR, G. J. DE O. Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **E&S - Engineering and Science**, v. 1, n. August, p. 83–90, 2016.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into Principal Components. **The Journal of Educational Psychology**, v. 24, p. 417–441, 1933.

HUANG, Y.-F. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopic study of p-aminothiophenol. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 24, p. 8485, 2012.

IN. **Instrução Normativa - 51/2002**. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=20/09/2002&jornal=1&pagina=13&totalArquivos=152>>. Acesso em: 3 dez. 2020.

IN. **Instrução Normativa - 62/2011**. Disponível em: <https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-62-2011_78285.html>. Acesso em: 3 dez. 2011.

JANDAL, J. M. Comparative aspects of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 22, n. 2, p. 177–185, set. 1996.

- JEANMAIRE, D. L.; VAN DUYN, R. P. Surface raman spectroelectrochemistry. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 84, n. 1, p. 1–20, nov. 1977.
- JENNESS, R. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. 3 ed ed. Boston, MA: Springer US, 1988.
- JENSEN, R. G. **Handbook of Milk Composition**. 1st Editio ed. [s.l.] Academic Press, 1995.
- JHA, S. K. et al. Deep-UV Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering of Adenine on Aluminum Nanoparticle Arrays. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 4, p. 1966–1969, 19 fev. 2012.
- JIN, R. et al. Controlling anisotropic nanoparticle growth through plasmon excitation. **Nature**, v. 425, n. 6957, p. 487–490, out. 2003.
- JÚNIOR, F. M. E S. **Propriedades vibracionais e dielétricas da mulita Bi₂Mn₄O₁₀**. São Luíz: Universidade Federal do Maranhão, 2010.
- KAHL, M. et al. Periodically structured metallic substrates for SERS. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 51, n. 1–3, p. 285–291, ago. 1998.
- KLEINMAN, S. L. et al. Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 15, n. 1, p. 21–36, 2013.
- KOWALSKI, B. R. Chemometrics: Views and Propositions. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 15, n. 4, p. 201–203, 1 nov. 1975.
- KULA, J. Medicinal Values of Camel Milk. **International Journal of Veterinary Science and Research**, v. 2, n. 1, p. 018–025, 7 abr. 2016.
- LARKIN, P. J. **Infrared and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation**. First ed. [s.l.] Elsevier, 2018. v. 9
- LE RU, E. C. et al. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 37, p. 13794–13803, 23 set. 2007.
- LONG, D. A. **The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules**. [s.l.] Wiley, 2002.
- LYRA, W. DA S. et al. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1594–1597, 2010.
- MARANGONI, F. et al. Cow's Milk Consumption and Health: A Health Professional's Guide. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 197–208, 3 abr. 2019.
- MARIA, F. S. **Produto - Leite Marvin tipo A**. Disponível em: <<http://www.leitemarvin.com.br/produtos.php>>. Acesso em: 10 mar. 2021.

MATEOS-APARICIO, G. Partial Least Squares (PLS) Methods: Origins, Evolution, and Application to Social Sciences. **Communications in Statistics - Theory and Methods**, v. 40, n. 13, p. 2305–2317, 21 abr. 2011.

MENDES, G. DE A. **Espectroscopia ótica para discriminação de misturas de café Arábica e Robusta**. Dissertação (Mestrado em Física)—Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2018.

MENDES, T. DE O. **Métodos multivariados para a elucidação de informações analíticas em amostras complexas**. Tese (Doutorado em Física)—Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015.

MORENO, L. A. et al. Dairy products, yogurt consumption, and cardiometabolic risk in children and adolescents. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. suppl 1, p. 8–14, 14 ago. 2015.

MOSKOVITS, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy: a brief retrospective. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 6–7, p. 485–496, jun. 2005.

MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 12, p. 3515–3522, dez. 2013.

NATAN, M. J. Concluding Remarks: Surface enhanced Raman scattering. **Faraday Discussions**, v. 132, p. 321, 2006.

NIELSEN, J. R. The Raman effect. **School Science and Mathematics**, v. 29, n. 6, p. 581–589, jun. 1929.

NOGUEZ, C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 10, p. 3806–3819, mar. 2007.

NUSSENZVEIG, H. M. **Curso de física básica Ótica Relatividade Física Quântica - Vol 4**. First ed. [s.l.: s.n.].

NUSSENZVEIG, H. M. **Curso de Física Básica: Fluidos, Oscilações e Ondas, Calor - Vol 2**. 5ª edição ed. [s.l.] Edgard Blücher, 2013.

OLIVEIRA, R. A. DE; MARTINS, A. F. P.; SILVA, A. P. B. DA. Thomas Young e a teoria ondulatória da luz no início do século XIX: aspectos conceituais e epistemológicos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 41, n. 2, 18 out. 2018.

OLIVIERI, A. C. **Introduction to Multivariate Calibration: A Practical Approach**. 1st. ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2018.

OTTO, A. The “chemical” (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 6–7, p. 497–509, jun. 2005.

PASTORIZA-SANTOS, I.; LIZ-MARZÁN, L. M. Colloidal silver nanoplates. State of the art and future challenges. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1724, 2008.

PAZ, N. F. et al. Characterization of goat milk and potentially symbiotic non-fat yogurt. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 3, p. 629–635, set. 2014.

PEARSON, K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. **The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science**, v. 2, n. 11, p. 559–572, 8 nov. 1901.

PEREIRA, A. DE J. **Substratos vítreos com nanoestruturas metálicas para aplicações SERS**. Tese (Doutorado em Física)—Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2016.

PEREIRA, A. J. et al. Facile Shape-Controlled Fabrication of Copper Nanostructures on Borophosphate Glasses: Synthesis, Characterization, and Their Highly Sensitive Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Properties. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 22, p. 12265–12272, 2016.

PERKINS, W. D. Topics in chemical instrumentation: Fourier transform-infrared spectroscopy: Part I. Instrumentation. **Journal of Chemical Education**, v. 63, n. 1, p. 5–10, 1986.

PILA, J. **Carta Leite - O que 2019 pode nos antecipar para 2020 no mercado mundial de lácteos**. Disponível em: <[https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/cartas/51625/carta-leite---o-que-2019-pode-nos-antecipar-para-2020-no-mercado-mundial-de-lacteos.htm#:~:text=Nos últimos dez anos a,616%2C62 bilhões de litros.](https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/cartas/51625/carta-leite---o-que-2019-pode-nos-antecipar-para-2020-no-mercado-mundial-de-lacteos.htm#:~:text=Nos%20últimos%20anos%20a,616%2C62%20bilhões%20de%20litros.)>. Acesso em: 21 jan. 2021.

PRIZE, N. **The Nobel Prize in Physics 1930**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1930/summary/>>. Acesso em: 5 fev. 2021.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new class of spectra due to secondary radiation. Part I. **Indian J. Phys.**, p. 399–419, 1928.

RIBEIRO CLARO, P. Espectroscopia Vibracional. **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 2, p. 1–5, 2018.

RODRIGUES, L. DO N. **Sobre a natureza das excitações de partículas independente em gás de elétrons bidimensional via espectroscopia Raman ressonante**. Tese (Doutorado em Física)—Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

ROGALSKI, A. History of infrared detectors. **Opto-Electronics Review**, v. 20, n. 3, p. 77–85, 1 jan. 2012.

RONALD ROSS WATSON, ROBERT J COLLIER, V. R. P. **Nutrients in dairy and their implications for health and disease**. First ed. [s.l.] Academic Press, 2017.

RU, E. LE; ETCHEGOIN, P. **Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and related plasmonic effects**. First ed. [s.l.] Elsevier Science, 2009.

SAKANE, K. K. et al. Espectros Infravermelhos Da Creatina. **Revista Univap**, v. 17, n. 29, p. 145, 2011.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2ª edição ed. [s.l.: s.n.].

SALEEM, M.; AMIN, A.; IRFAN, M. Raman spectroscopy based characterization of cow, goat and buffalo fats. **Journal of Food Science and Technology**, 21 maio 2020.

ŠAŠIĆ, S.; OZAKI, Y. Short-Wave Near-Infrared Spectroscopy of Biological Fluids. 1. Quantitative Analysis of Fat, Protein, and Lactose in Raw Milk by Partial Least-Squares Regression and Band Assignment. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 64–71, jan. 2001.

SAUER-LEAL, E.; OKADA, F. M.; PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização físico-química de queijo prato por espectroscopia no infravermelho e regressão de mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1621–1625, 2008.

SCHNEIDER, R. **Desenvolvimento de materiais para nanodispositivos híbridos baseados em filmes nanoestruturados por processo bottom-up**. Tese (Doutorado em Química)—[s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

SCHNEIDER, R. et al. One step fabrication of glass–silver@core–shell fibers: silver-doped phosphate glasses as precursors of SERS substrates. **J. Mater. Chem. C**, v. 2, n. 42, p. 9021–9027, 21 ago. 2014.

SCHRADER, B. **Infrared and Raman Spectroscopy**. First ed. [s.l.] Wiley-VCH, 1995.

SCHUSTER, C. et al. Avaliação de equipamento alternativo para pasteurização lenta de leite previamente envasado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 828–831, dez. 2006.

SENIHA GÜNER, F.; YAĞCI, Y.; TUNCER ERCIYES, A. Polymers from triglyceride oils. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 633–670, jul. 2006.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 397–409, dez. 2004.

SILVA, A. M. DA et al. Conjuntura da pecuária leiteira no Brasil. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 14, n. 1, 2017.

SILVA, V. A. DE M. DA et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma Granja Leiteira no RS. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 1, p. 51, 27 jun. 2018.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Rapid Determination of Tetracycline in Milk by FT-MIR and FT-NIR Spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 3, p. 487–493, mar. 2002.

STUART, B. H. **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. First ed. [s.l.] Wiley, 2004.

TURCK, D. Cow's Milk and Goat's Milk. In: **World Review of Nutrition and Dietetics**. [s.l.: s.n.]. p. 56–62.

ULLAH, R. et al. Raman-spectroscopy-based differentiation between cow and buffalo milk. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 48, n. 5, p. 692–696, maio 2017.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.

WEAVER, C. M. Calcium Supplementation: Is Protecting Against Osteoporosis Counter to Protecting against Cardiovascular Disease? **Current Osteoporosis Reports**, v. 12, n. 2, p. 211–218, 27 jun. 2014.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, n. 1–3, p. 37–52, ago. 1987.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109–130, 2001.

YAMAN, H. A rapid method for detection adulteration in goat milk by using vibrational spectroscopy in combination with chemometric methods. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 8, p. 3091–3098, 17 ago. 2020.

YUE, W. et al. Electron-beam lithography of gold nanostructures for surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 22, n. 12, p. 125007, 1 dez. 2012.

ZILIO, S. C. **Óptica moderna: fundamentos e aplicações**. [s.l.] Universidade de São Paulo. Instituto de Física de São Carlos, 2009.

ZIMMER, J.; ANZANELLO, M. J. Um novo método para seleção de variáveis preditivas com base em índices de importância. **Production**, v. 24, n. 1, p. 84–93, 7 jun. 2013.

APÊNDICE A – Espectros Raman das amostras de leite do lote 1 e espectros de primeira derivada

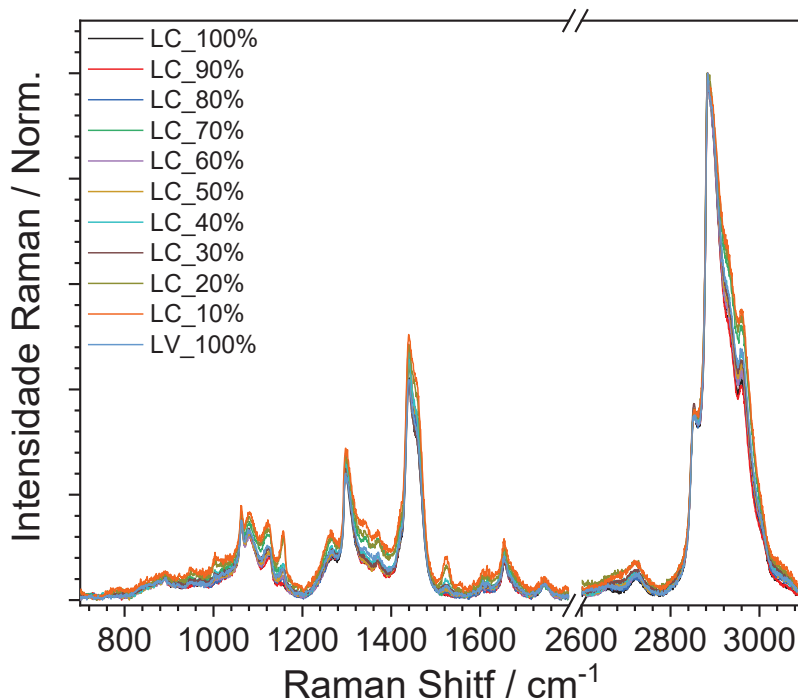


Figura 48 - Comparação dos espectros Raman das amostras do **lote 1**. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

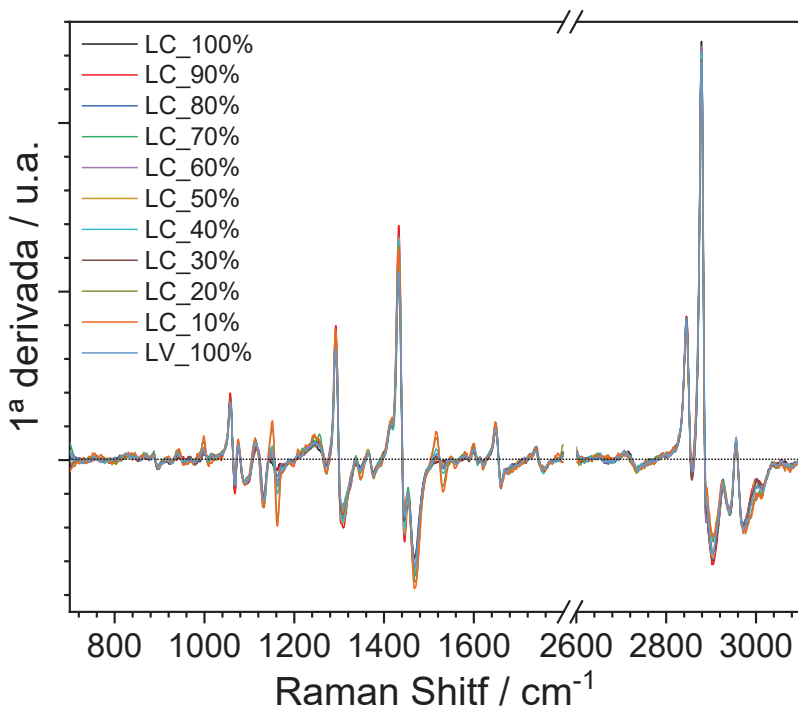


Figura 49 - Comparação dos resultados de primeira derivada dos espectros Raman das amostras do **lote 1**. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

APÊNDICE B – Espectros Raman das amostras de leite do lote 2 e espectros de primeira derivada

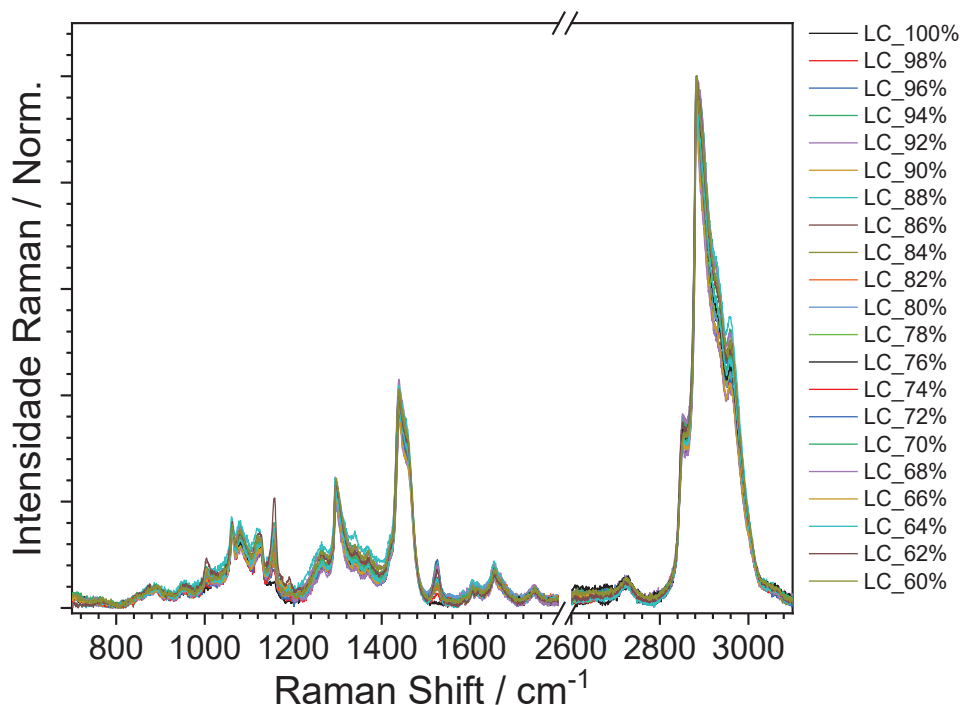


Figura 50 - Comparação dos espectros Raman das amostras do **lote 2**. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

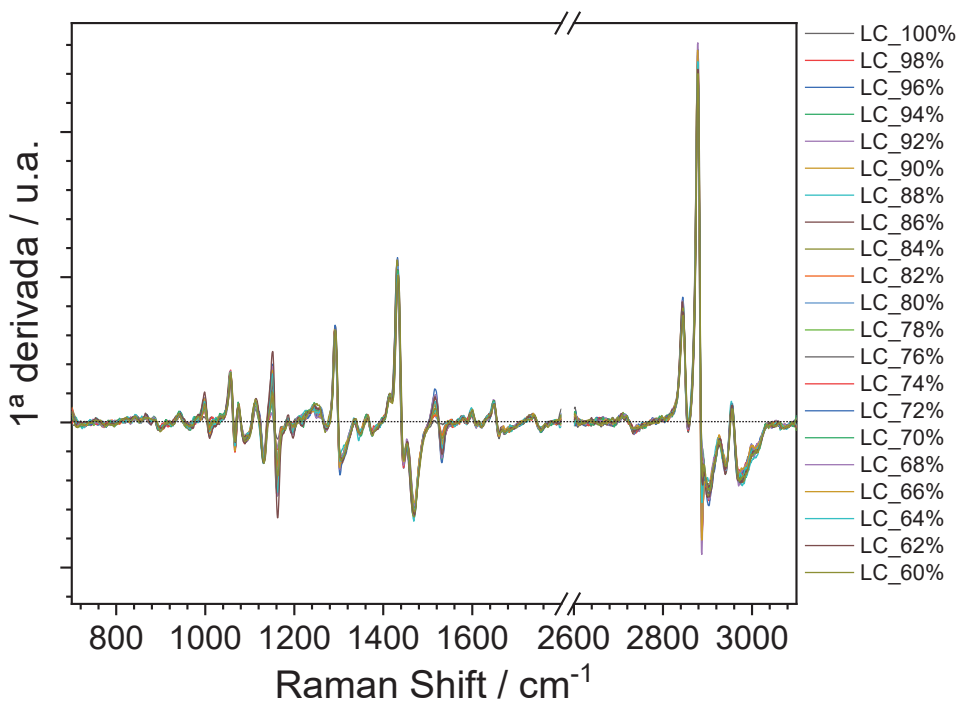


Figura 51 - Comparação dos resultados de primeira derivada dos espectros Raman das amostras do **lote 2**. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

APÊNDICE C – Espectros MIR das amostras de leite do lote 2 e espectros de primeira derivada

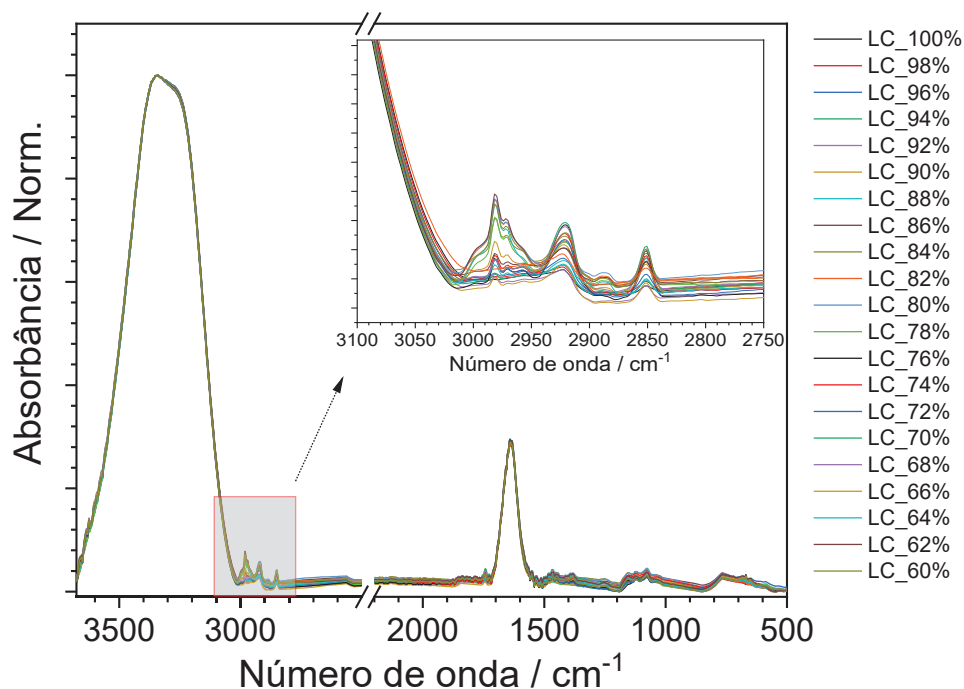


Figura 52 - Comparação dos espectros MIR das amostras do **lote 2**. Em detalhe, região de 3100–2750 cm⁻¹. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

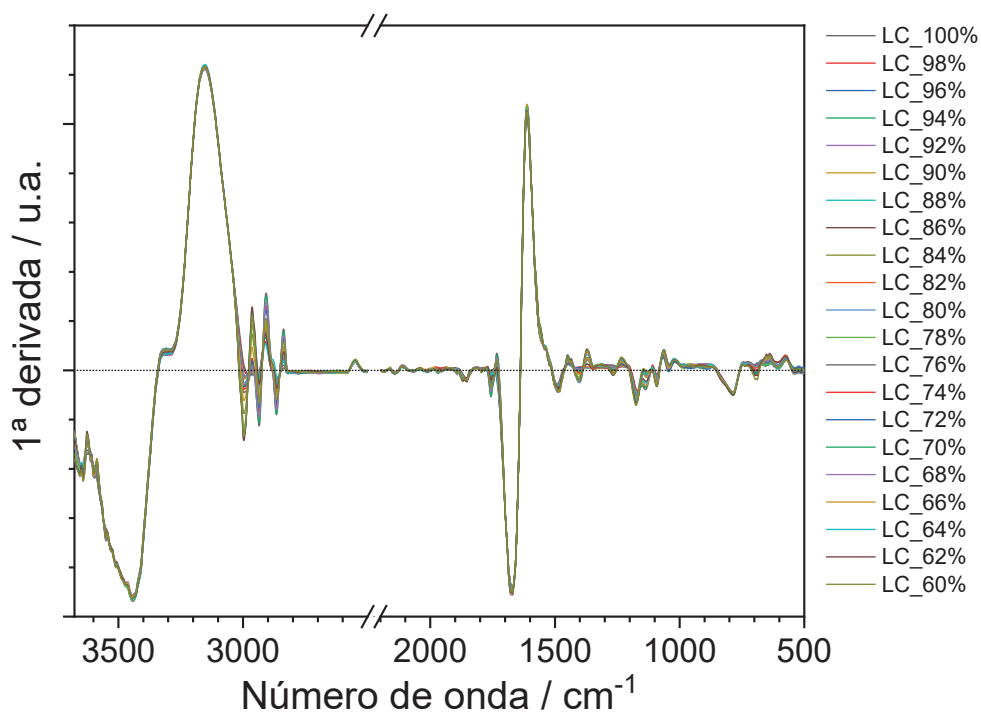


Figura 53 - Comparação dos resultados de primeira derivada dos espectros MIR das amostras do **lote 2**. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

APÊNDICE D – Espectros NIR das amostras de leite do lote 2 e espectros de primeira derivada

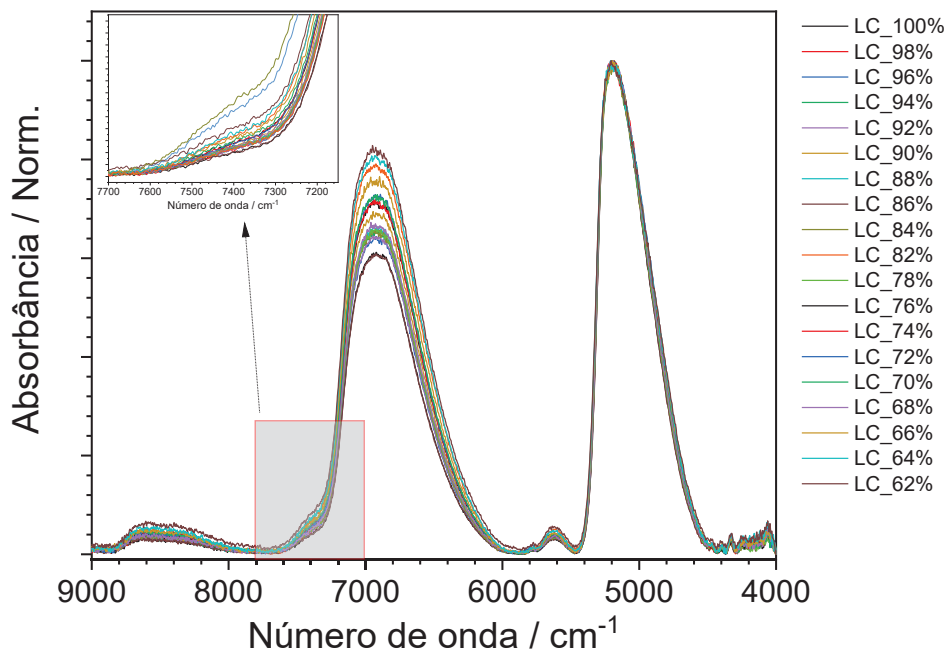


Figura 54 - Comparação dos espectros NIR das amostras do lote 2. Em detalhe, região de 7700–7200 cm^{-1} . Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

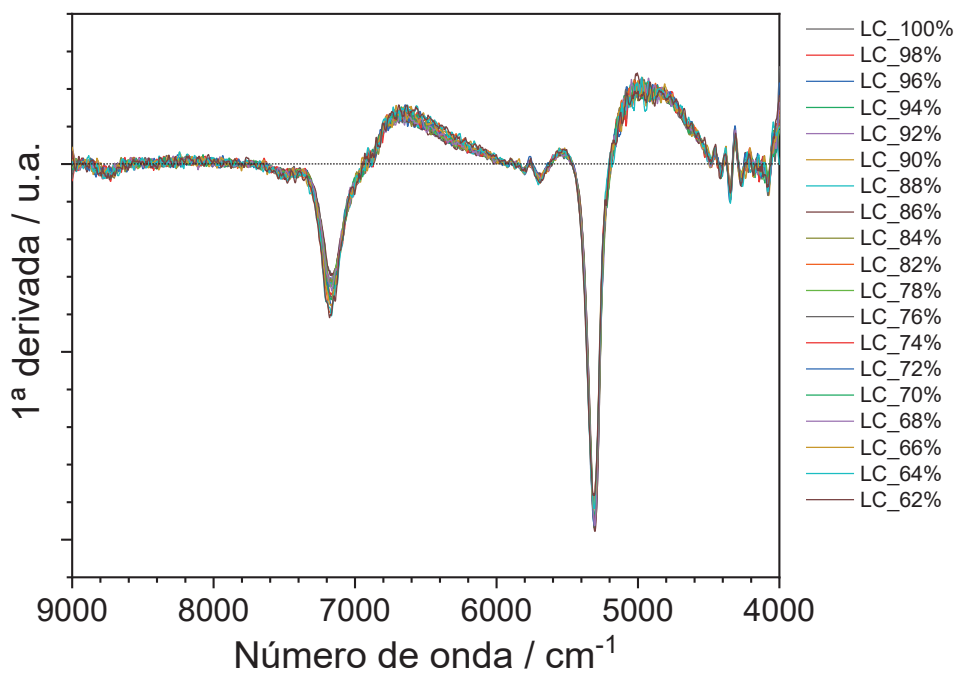


Figura 55 - Comparação dos resultados de primeira derivada dos espectros NIR das amostras do lote 2. Fonte: Elaborado pelo autor (2021).