

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE
ASSOCIADA À CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA
ANÁLISE DE AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS

Frederico Luis Felipe Soares*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração:
QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

* bolsista CAPES

São Carlos - SP

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Frederico Luis Felipe Soares, realizada em 13/04/2019:

Renato Lajarin Carneiro

Prof. Dr. Renato Lajarin Carneiro
UFSCar

Edenir Rodrigues Pereira Filho

Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho
UFSCar

Regina Vincenzi Oliveira

Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira
UFSCar

Waldomiro Borges Neto

Prof. Dr. Waldomiro Borges Neto
UFU

Guilherme Post Sabin

Prof. Dr. Guilherme Post Sabin
Souza Cruz

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas, é preciso ter perseverança, e especialmente confiança em si mesmo. Devemos acreditar que somos bons em alguma coisa, e que isso deve ser alcançado a todo custo.”

Marie Curie

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito."

Chico Xavier

A minha família, minha mãe Dulce, minha vó Maria José, e ao meu irmão Rafael pelo inestimável amor, apoio e suporte em todos estes anos, e também a Gabriella, por todo amor, companheirismo e compreensão nesta caminhada. Se não fosse por vocês, nada disso teria sido feito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e meus amigos espirituais, pois sem eles nada disso seria possível.

A minha mãe Dulce, minha vó Maria José e meu irmão Rafael, pelo amor incondicional, carinho e lições de vida. E a Gabriella, por todo o apoio, companheirismo e compreensão, que mesmo nas situações em que, a curto prazo, nós estávamos distantes fisicamente, sempre esteve ao meu lado apoiando e ajudando.

Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação, confiança, convivência e amizade ao longo destes anos. Hoje, boa parte da minha formação profissional, devo a você.

Aos valorosos amigos do GQA e LABBES e LABIE que pude conhecer e conviver com o passar dos anos, Jorgito, Benê, Marcão, BJ, Alexandrino, Thatá, Tássia, Camila, Camilovski, Geiser, Deroco, Wilson. Espero não ter sido injusto e esquecido de alguém, mas todos foram muito importantes na minha formação.

Ao Prof. Douglas Rutledge, por me aceitar em seu laboratório durante meu doutorado sanduíche. Posso dizer que, apesar da curta estadia, esta experiência foi bastante proveitosa, não apenas no lado profissional quanto no pessoal.

Aos meus amigos fora da universidade, Isaias, Priscila, Thathynhah, Felipe, Natália, Grégoire e Miguel que conseguiam me ajudar a relaxar, mesmo quando as coisas aparentemente não iam bem.

Aos meus colegas de Brasília, que mesmo com a distância nunca deixaram de me apoiar e incentivar.

Aos funcionários do Departamento de Química, em especial às secretárias da Pós-Graduação, Luciani, Ariane e Cristina, pela atenção e colaboração.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida, tanto aqui quanto no meu estágio no exterior. E ao CNPq e FAPESP pelo apoio à pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	Alternating Least Squares (Quadrados Mínimos Alternados)
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BSS	Blind Source Separation (Separação Cega de Fontes)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLS	Classical Least Squares (Mínimos Quadrados Clássicos)
EFA	Evolving Factor Analysis (Análise de Fatores Evolucionária)
EMA	European Medicines Agency (Agência de Medicamentos Europeia)
GPHF	Global Pharma Health Fund (Fundo Global de Saúde Farmacêutica)
IC	Independent Component (Componente Independente)
ICA	Independent Component Analysis (Análise por Componentes Independentes)
JADE	Joint Approximate Diagonalization of Eigenmatrices (Diagonalização Conjunta Aproximada de Automatrizes)
<i>k</i>-NN	<i>k</i> -Nearest Neighbor (<i>k</i> -Vizinhos mais próximos)
LoF	Lack of Fit (Falta de Ajuste)
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MCR	Multivariate Curve Resolution (Resolução Multivariada de Curvas)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)

MILCA	Mutual Information Least-dependent Component Analysis (Análise de Componentes Menos-dependentes por Informação Mútua)
NIPALS	Nonlinear Iterative Partial Least Squares (Mínimos quadrados parciais iterativos não-lineares)
PARAFAC	Parallel Factor Analysis (Análise de Fatores Paralelos)
PC	Principal Component (Componente Principal)
PCA	Principal Component Analysis (Análise por Componentes Principais)
PLS	Partial Least Squares regression (Regressão por mínimos quadrados parciais)
PLS-DA	Partial Least Squares – Discriminant Analysis (Análise discriminante por mínimos quadrados parciais)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy (Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície)
SIMCA	Soft Independent Modelling of Class Analogy (Modelagem Suave Independente de Analogias entre Classes)
SIMPLISMA	Simple-to-use Interactive Self-modeling Mixture Analysis (Análise de misturas por automodelagem interativa simples de usar)
SMX	Sulfametoxazol
SVD	Singular Value Decomposition (Decomposição de Valores Singulares)
TMP	Trimetoprima
US FDA	United States Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos)

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 – Descrição das amostras utilizadas de acordo com a marca e o local de produção.	50
TABELA 4.1 – Planejamento experimental do tipo composto central com os valores codificados e para cada experimento.	81
TABELA 4.2 – Tabela dos resultados do planejamento composto central para SMX e TMP.	86
TABELA 4.3 – Tabela ANOVA para TMP para o modelo proposto pela equação 4.1.	88
TABELA 4.4 – Tabela ANOVA para SMX recalculado para o número de coeficientes significativos.	89
TABELA 4.5 – Recuperação de TMP em amostras de leite com diferentes níveis de dopagem.	99

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Representação esquemática do experimento realizado por Raman.	8
FIGURA 1.2 – Espalhamento Rayleigh, Stokes e o Anti-Stokes.....	10
FIGURA 1.3 – Espalhamento Stokes e o Anti-Stokes da crocoíta. Adaptado de ³⁷	11
FIGURA 1.4 – Representação esquemática de uma separação por CCD.....	20
FIGURA 1.5 – Estrutura molecular da sulfametoxazol e trimetoprima.	25
FIGURA 2.1 – Representação gráfica das Componentes Principais.....	31
FIGURA 2.2 – Esquema de decomposição da matriz de dados X.	31
FIGURA 2.3 – Representação esquemática do ANOVA-PCA.	34
FIGURA 2.4 – Possíveis gráficos de escores resultantes da ANOVA-PCA. a) fator não significativo, b) fator significativo, c) fator não significativo, mas com informação adicional	36
FIGURA 2.5 – Representação esquemática do MCR-ALS	37
FIGURA 2.6 – Representação esquemática de dados simulados e seus histogramas de distribuição: a) sinais puros e b) misturas de sinais com diferentes proporções	41
FIGURA 2.7 – Representação esquemática do tratamento de dados simulados por PCA e ICA: a) dispersão dos dados originais, b) escores recuperados por PCA, c) proporções recuperadas por ICA, d) sinais originais, e) loadings recuperados por PCA e f) sinais recuperados por ICA	42
FIGURA 3.1 – Mapa do Brasil com os locais de produção para as cervejas analisadas: Sete Lagoas (NM), Petrópolis (PT), Jacareí (JC), Itú (IT), Jaguariúna (JA) e Agudos (AG)	50
FIGURA 3.2 – Representação esquemática da síntese das AuNPs	51
FIGURA 3.3 – Esquema do aparato utilizado para a dispersão das nanopartículas	52

FIGURA 3.4 – Representação esquemática do tratamento quimiométrico: a) dados SERS- CCD; b) Tensor de dados contendo todas as amostras; c) Matriz aumentada e representação do tratamento utilizando MCR-ALS e ICA	55
FIGURA 3.5 – Caracterização das AuNPs por MET: a) imagem de MET e b) histograma de frequência do tamanho de partícula com o tamanho médio e o desvio padrão	56
FIGURA 3.6 – Microscopia eletrônica de varredura da placa cromatográfica: a – c) pingando a solução de Au NPs; d – e) pulverizando a solução de Au NPs	58
FIGURA 3.7 – Placas de CCD para 4 marcas de cerveja reveladas por luz UV _{254nm} utilizando diferentes solventes	59
FIGURA 3.8 – SERS-CCD da amostra de cerveja separada por etanol.....	60
FIGURA 3.9 – Espectro SERS da amostra de cerveja em 4 diferentes pHs em diferentes regiões da placa de CCD: a) 8 mm, b) 14 mm, c) 17 mm, d) 20 mm e e) 24 mm	61
FIGURA 3.10 – Espectros SERS integrados recuperados pelo modelo MCR-ALS	64
FIGURA 3.11 – a) Perfil de concentração (perfis cromatográficos) recuperados pelo modelo MCR-ALS e, b) magnificação das amostras 45 a 48 e c) 15 a 19.....	65
FIGURA 3.12 – Gráfico de scores da PC1 contra a PC2 utilizando MCR-ALS/PCA	66
FIGURA 3.13 – Sinais recuperados pelo modelo ICA.....	68
FIGURA 3.14 – a) Proporções (perfis cromatográficos) recuperadas pelo modelo ICA e, b) magnificação das amostras 45 a 48 e c) 15 a 19.....	70
FIGURA 3.15 – Gráfico de scores da PC1 contra a PC2 utilizando ICA/PCA.	71
FIGURA 4.1 –Representação esquemática da mesa posicionadora realizando medida na placa de SERS-CCD.....	80

FIGURA 4.2 – Representação de uma imagem hiperspectral gerada a partir da análise de SERS-CCD.....	82
FIGURA 4.3 – Espectros Raman e SERS dos fármacos a) SMX e b) TMP.	84
FIGURA 4.4 – a) Placa de CCD após a separação e revelação por câmara de UV, e b) espectros SERS das manchas observadas na placa.	85
FIGURA 4.5 – Superfície de respostas a) empírica obtida a partir das respostas para TMP e, b) obtida a partir da equação 4.3 para SMX.	90
FIGURA 4.6 – Espectros SERS com variação no pH da solução de a) SMX e b) TMP.....	91
FIGURA 4.7 – Mapa de concentração relativa para SMX nos métodos a) MCR-ALS e c) ICA e curvas analíticas para SMX dos métodos b) MCR-ALS e d) ICA.	93
FIGURA 4.8 – Sinais recuperados e mapa de concentração relativa para SMX em leite: a) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para SMX, b) mapa de escores para SMX, c) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para Interferente 1, d) mapa de escores para Interferente 1, e) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para Interferente 2, b) mapa de escores para Interferente 2.	94
FIGURA 4.9 – Mapa de concentração relativa para TMP nos métodos a) MCR-ALS e c) ICA e curvas analíticas para TMP dos métodos b) MCR-ALS e d) ICA.	96
FIGURA 4.10 – Espectro recuperado mais similar ao espectro SERS para a) MCR-ALS e ICA, e o mapa de concentração relativa (perfil cromatográfico) para o padrão contendo $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TMP recuperado por b) MCR-ALS e c) ICA.	97
FIGURA 4.11 – Sinais recuperados e mapa de concentração relativa para TMP em leite: a) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para TMP, b) mapa de escores para TMP, c) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para Interferente 1, d) mapa de escores para Interferente 1, e)	

espectro SERS recuperado por MCR-ALS para Interferente 2, b) mapa de escores para Interferente 2.	98
FIGURA 5.1 – Representação esquemática do tratamento quimiométricos utilizado.....	107
FIGURA 5.2 – Caracterização das AuNPs por MET: a) imagem de MET e b) histograma de frequência do tamanho de partícula com o tamanho médio e o desvio padrão	108
FIGURA 5.3 – Placas de CCD para uma amostra de vinho tinto reveladas por luz UV _{254nm} utilizando diferentes solventes: a) acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (20:2:2:4 v/v/v/v) ²⁰² , b) etanol, c) acetato de etila, d) acetona.	109
FIGURA 5.4 – SERS-CCD da amostra vinho tinto utilizando diferentes solventes: a) acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (20:2:2:4 v/v/v/v) ²⁰² , b) etanol, c) acetato de etila, d) acetona.	110
FIGURA 5.5 – SERS-CCD da amostra vinho tinto com a fase móvel em diferentes pHs: a) etanol:H ₂ O (9:1 v/v), b) etanol:HCl (0,1 mol·L ⁻¹) (9:1 v/v), c) etanol:NaOH (0,1 mol·L ⁻¹) (9:1 v/v).....	111
FIGURA 5.6 – SERS-CCD da amostra vinho tinto a) sem adição de NaCl, b) com 0,02 mol·L ⁻¹ de NaCl, e c) com 0,04 mol·L ⁻¹ de NaCl.	113
FIGURA 5.7 – Primeira componente independente (IC1) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	115
FIGURA 5.8 – Segunda componente independente (IC2) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	116
FIGURA 5.9 – Terceira componente independente (IC3) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	117
FIGURA 5.10 – Quarta componente independente (IC4) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	118
FIGURA 5.11 – Quinta componente independente (IC5) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	119

FIGURA 5.12 – Sexta componente independente (IC6) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	120
FIGURA 5.13 – Sétima componente independente (IC7) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	121
FIGURA 5.14 – Oitava componente independente (IC8) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	122
FIGURA 5.15 – Nona componente independente (IC9) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	123
FIGURA 5.16 – Décima componente independente (IC10) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.	124
FIGURA 5.17 – Gráfico de a) escores, e b) loadings para a matriz de SO ₂ + variação residual, com círculos de intervalo de confiança de 95 %. As amostras em azul representam o nível -1, e em vermelho +1.....	126
FIGURA 5.18 – Gráfico de escores (a e c), e loadings (b e d) para a matriz de O ₂ dissolvido + variação residual (a e b); e pH + variação residual (c e d), com círculos de intervalo de confiança de 95 %. As amostras em azul representam o nível -1, e em vermelho +1.....	127
FIGURA 5.19 – Gráfico de a) escores, e b) loadings para a matriz de temperatura + variação residual, com círculos de intervalo de confiança de 95 %. As amostras em azul representam a temperatura de 4 °C, em vermelho, temperatura de 24 °C, e em verde, temperatura de 40 °C.	128
FIGURA 5.20 – Gráfico de escores (a, c e e), e loadings (b, d e f) para a matrizes de interação de segunda ordem para os três primeiros fatores, com círculos de intervalo de confiança de 95 %. As amostras em vermelho representam o nível -1, e em verde +1.....	129

RESUMO

ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE ASSOCIADA À CROMATOLOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS - A espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), apresenta as vantagens da espectroscopia Raman convencional com a possibilidade de detectar compostos em menores concentrações devido ao aumento na intensidade Raman gerada pelo sistema molécula-nanopartícula. A cromatografia de camada delgada (CCD) é uma técnica de separação rápida, fácil e que pode ser associada a diversas técnicas analíticas com o intuito de identificar e detectar os compostos separados. A SERS-CCD é uma técnica pouco estudada, mas que apresenta as vantagens de ambas as técnicas de maneira sinérgica. A utilização de nanopartículas adsorvidas nas placas de CCD reveladas possibilita adquirir espectros Raman dos compostos separados mesmo em baixas concentrações. Neste trabalho, propõe-se a utilização da SERS-CCD em três diferentes aplicações de interesse alimentar: autenticação de produto, segurança alimentar e estudo de estabilidade. 1) Na autenticação de produto, foram analisadas amostras de cerveja Pilsner com o intuito de se obter padrões de agrupamentos relativos a marca e local de produção. As amostras foram separadas em placas de CCD e borrifadas pela solução coloidal de nanopartículas de ouro para análises SERS ao longo da linha de separação. Comparou-se dois métodos quimiométricos de decomposição de dados e recuperação de sinais, a resolução de curvas multivariadas (MCR) e análise por componentes independentes (ICA). A partir dos picos cromatográficos obtidos, pôde-se realizar uma análise de *fingerprint* das amostras e identificou-se padrões de agrupamento a partir da marca e local de fabricação. 2) Como aplicação em segurança alimentar, teve-se como objetivo desenvolver e otimizar uma método analítica para a quantificação de dois fármacos de uso veterinário (sulfametoxazol e trimetoprima) em amostras de leite. Um planejamento composto central foi aplicado investigando a concentração de NaCl nas nanopartículas e a pré-

concentração das mesmas para otimizar o sinal analítico. As imagens hiperspectrais geradas a partir da análise por SERS-CCD foram tratadas com diferentes métodos quimiométricos. Para trimetoprima foi obtido recuperações de 82 a 118%. Devido à complexidade da amostra, não foi possível obter valores quantitativos confiáveis para sulfametoxazol. 3) Para o estudo de estabilidade, avaliou-se cineticamente uma amostra de vinho tinto submetida a diferentes condições de degradação. Para isso, utilizou-se um planejamento experimental de 2^3 com as variáveis pH da solução, quantidade de O_2 dissolvido e a presença de agente antioxidante. As amostras foram submetidas a três temperaturas de estocagem (4, 24 e 40 °C) e avaliadas durante 45 dias. Os cromatogramas SERS foram analisados utilizando ICA, e a partir dos picos cromatográficos obtidos, pôde-se realizar uma ANOVA-PCA onde identificou-se as variáveis temperatura e agente antioxidante como as mais significativas para a alteração da amostra.

ABSTRACT

SURFACE ENHANCEMENT RAMAN SPECTROSCOPY COUPLED TO THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY FOR ANALYSIS OF FOOD SAMPLES - Surface enhancement Raman spectroscopy (SERS) presents the advantages of conventional Raman spectroscopy with the possibility to detect compounds in low levels due to the enhancement on Raman intensity, generated by the molecule-nanoparticle system. Thin-layer chromatography (TLC) is a fast and easy separation technique, that can be coupled to several analytical techniques in order to identify compounds. TLC-SERS is a relatively new technique, with only a few works published; however it presents the advantages of both techniques synergically. The use of nanoparticles adsorbed onto the TLC plate enables to obtain Raman spectra of the separated compounds even in low concentrations. Therefore, this work proposes the use of TLC-SERS in three different application of food interest: product authentication, food safety and stability studies. 1) In product authentication, it was analyzed Pilsner beer samples in order to obtain pattern recognition related to brand and brewery. Samples were prepared in TLC plates and sprayed with gold nanoparticle to promote SERS analysis regarding the elution line of the target analytes. The obtained results were compared by two chemometric methods of data decomposition and signal recovering: multivariate curve resolution (MCR) and independent component analysis (ICA). From the obtained chromatographic peaks was possible to perform fingerprint analysis and identify clustering pattern concerning sample brand and brewery location. 2) As food safety application, the aim was to develop and optimize an analytical methodology to quantify two veterinary drugs (sulfamethoxazole and trimethoprim) in bovine milk. Central composite design was applied evaluating NaCl concentration and nanoparticles pre-concentration to optimize the analytical signal. The hyperspectral images obtained from TLC-SERS were processed using different chemometric methods. For trimethoprim, it was obtained recoveries of 82 – 112% in milk samples. Due to the high

complexity of the samples, it was not possible to obtain reliable quantitative values for sulfamethoxazole. 3) For the stability study, it was kinetically assessed one red wine sample under different degradation conditions. For this, it was used a 2^3 design of experiments varying pH, dissolved O_2 and the presence of anti-oxidant agent. Samples were left in three stocking temperatures (4, 24 and 40 °C) and evaluated during 45 days. SERS chromatograms were analyzed using ICA, and from the chromatographic profile, it was possible to perform ANOVA-PCA where it was identified temperature and the presence of anti-oxidant agent as the most significant variables.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Análise de alimentos	2
1.1.1. Autenticação de alimentos	3
1.1.2. Segurança alimentar.....	4
1.1.3. Estocagem de alimentos	5
1.2. Espectroscopia Raman	6
1.3. Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície.....	13
1.4. SERS-CCD.....	18
1.5. Amostras de alimentos.....	21
1.5.1. Cerveja.....	21
1.5.2. Leite.....	24
1.5.3. Vinho.....	26
2. MÉTODOS QUIOMÉTRICOS.....	30
2.1. Análise por Componentes Principais (PCA)	30
2.2. Análise de Variância – Análise Componentes Principais (ANOVA-PCA).....	33
2.3. Resolução Multivariada de Curvas por Quadrados Mínimos Alternados (MCR-ALS).....	36
2.4. Análise por Componentes Independentes (ICA)	40
2.5. Rotinas utilizadas	45

3.	ANÁLISE DE FINGERPRINTS DE CERVEJAS DO TIPO PILSNER.....	48
3.1.	Introdução e objetivos	48
3.2.	Parte Experimental.....	49
3.2.1.	Materiais.....	49
3.2.2.	Amostras.....	49
3.2.3.	Síntese e caracterização das AuNPs.....	51
3.2.4.	Fabricação do Spray.....	52
3.2.5.	Separação por CCD.....	53
3.2.6.	Análise SERS.....	54
3.2.7.	Tratamento quimiométrico.....	54
3.3.	Resultados e discussão	56
3.3.1.	Caracterização da AuNPs e do substrato para SERS-CCD.....	56
3.3.2.	Otimização das condições de análise SERS-CCD	58
3.3.3.	Aplicação da SERS-CCD para análise de <i>fingerprint</i> de cervejas do tipo Pilsner	61
3.3.3.1.	Análise utilizando MCR-ALS.....	63
3.3.3.2.	Análise utilizando ICA	68
3.4.	Conclusão.....	73
4.	QUANTIFICAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO.....	76
4.1.	Introdução e Objetivos	76

4.2. Parte Experimental.....	77
4.2.1. Reagente.....	77
4.2.2. Síntese das nanopartícula	78
4.2.3. Preparação das soluções e das amostras	78
4.2.4. Procedimento CCD.....	79
4.2.5. Procedimento SERS-CCD	79
4.2.6. Otimização das condições de análise.....	80
4.2.7. Métodos quimiométricos.....	81
4.3. Resultados e Discussão	83
4.3.1. Ensaio preliminares	83
4.3.2. Planejamento Experimental	86
4.3.3. Efeito do pH da solução.....	90
4.3.4. Quantificação de SMX	91
4.3.5. Quantificação de TMP	95
4.4. Conclusões	100
5. ESTUDO MULTIVARIADO DA ESTABILIDADE DE VINHO	
TINTO	102
5.1. Introdução e Objetivos	102
5.2. Parte Experimental.....	103
5.2.1. Otimização das condições de separação dos compostos	103
5.2.2. Revelação das amostras por lâmpada UV.....	103
5.2.3. Formação de nanopartículas de prata.....	103

5.2.4. Análise SERS.....	104
5.2.5. Planejamento de degradação forçada do vinho tinto.....	104
5.2.6. Métodos quimiométricos.....	106
5.3. Resultados e Discussão	107
5.3.1. Caracterização das AgNPs.....	107
5.3.2. Otimização das condições de análise SERS-CCD	108
5.3.3. Estudo multivariado da degradação forçada de vinho tinto	114
5.3.4. Análise utilizando ANOVA-PCA	124
5.4. Conclusões	130
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	134
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Análise de alimentos

A busca de alimentos de alta qualidade para o consumo é uma preocupação mundial tão antiga quanto a própria civilização¹. A ciência dos alimentos foi desenvolvida com o intuito de estudar os alimentos consumidos, buscando compreender os fenômenos físicos, químicos e biológicos que ocorrem nestes produtos². A química dos alimentos é uma vertente da ciência dos alimentos onde é estudada a composição e propriedades destes a partir de mudanças químicas envolvidas nos diversos processos de desenvolvimento do produto, como estocagem, manuseio e processamento³. A partir dessa problemática, busca-se encontrar estratégias que possam melhorar a estabilidade, custo, valor nutricional, qualidade e segurança alimentar dos produtos.

Apesar da composição básica dos alimentos ser bastante conhecida (água, carboidratos, lipídeos, proteínas, e uma pequena parcela de vitaminas, minerais e outros compostos orgânicos), as amostras alimentícias apresentam uma grande complexidade em sua composição⁴. Além disso, é possível encontrar uma ampla variabilidade nas amostras, e em diversos estados físicos, como sólidos, líquidos, emulsões, entre outras⁵.

Todos esses fatores corroboram para o desenvolvimento de novos métodos analíticos visando a detecção da maior quantidade de compostos ou propriedades possíveis para uma única amostra, denominadas como análises por “*fingerprint*”⁶. Diferente de uma abordagem clássica, na qual almeja-se a detecção e/ou quantificação de um único composto químico presente na amostra, a análise por *fingerprint* compara todos os resultados obtidos inter e intra-amostra e assim identifica padrões de similaridade no conjunto estudado. Esta estratégia pode ser aplicada para identificar e autenticar a origem de uma amostra, a presença de

adulterantes não específicos ou acompanhar as mudanças ocorridas na amostra a partir de efeitos externos.

1.1.1. Autenticação de alimentos

A autenticação de alimentos baseia-se na confirmação que o produto consumido apresenta as mesmas características que as indicadas em seu rótulo. Ela pode ser empregada: para identificações geográficas, de processamento ou variedades do alimento⁷.

Alguns alimentos apresentam um alto valor agregado baseado na região de origem de sua produção. Isso ocorre, pois os fatores externos, como condições climáticas e do solo, influenciam de maneira significativa no sabor e na qualidade do alimento⁸. As análises de alimentos por *fingerprints* podem ser utilizadas para confirmar e discriminar a região de origem da amostra. Longobardi et. al. utilizaram a ressonância magnética nuclear (RMN) para agrupamento de amostras de lentilha provenientes do Canadá e da Itália⁹. Os autores utilizaram ferramentas quimiométricas de classificação, como PLS-DA (análise discriminante por mínimos quadrados parciais), SIMCA (modelagem suave independente de analogias entre classes) e *k*-NN (*k*-vizinhos mais próximos) para criar modelos de separação baseados nas regiões de origem das lentilhas, apresentando uma boa discriminação das amostras.

O processamento de alimentos é uma prática comum, onde seu estado natural é alterado para aumentar a segurança alimentar no tempo de mercado do produto¹⁰. Entretanto, tais métodos alteram o sabor e qualidade do produto, sendo necessário um controle de qualidade do processo. Prieto et. al. realizaram medidas de infravermelho próximo para avaliar amostras de salmão antes e depois do processo de depuração¹¹. O processo de depuração é uma prática aplicada em peixes e frutos do mar, na qual o alimento é imerso por longos períodos em água do mar tratada e filtrada. Este processo diminui a quantidade de microrganismos no alimento, evitando os riscos em seu consumo. Os autores observaram diferenças significativas no perfil espectral das amostras depuradas comparadas

com as mesmas não-depuradas, possibilitando um bom modelo de classificação por PLS-DA.

Alimentos de origem vegetal apresentam subespécies (ou variedades) que contêm diferentes propriedades organolépticas. Cada variedade apresenta características distintas que influenciam na escolha do consumidor, sendo importante o desenvolvimento de métodos que possam discriminar e autenticar cada variedade. Oliveira et. al. utilizaram RMN para identificar e discriminar 5 variedades de laranja¹². O método utilizado possibilitou identificar as variedades das laranjas e acompanhar a degradação de cada uma quando armazenadas em duas temperaturas (14 °C e 24 °C).

1.1.2. Segurança alimentar

Para garantir a segurança alimentar, as agências regulamentadoras estabelecem normativas para regular e controlar a qualidade dos produtos comercializados¹³. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são os órgãos responsáveis por regular os produtos alimentícios.

A contaminação e a adulteração da amostra podem ocorrer de duas formas: adicionando compostos no alimento de forma a mascarar alguma irregularidade do produto ou adulterando o alimento com outros alimentos com características ou valores inferiores. Em 2008, pelo menos 6 bebês foram mortos devido à adulteração de fórmulas infantis por melanina¹⁴. A melanina é utilizada para mascarar a quantidade de proteína presente na amostra, impedindo que métodos clássicos diferenciem o nitrogênio natural, proveniente do leite, do nitrogênio presente na melanina. Yang et. al. desenvolveram um método por espectrometria de massas por dessorção em superfície à pressão atmosférica para detecção de traços de melanina em derivados do leite¹⁵. Os autores obtiveram limites de quantificação na ordem de 10^{-15} g·mm², possibilitando detectar de maneira rápida e eficiente a presença do contaminante.

Em 2013 foi encontrado, em alguns países da Europa, adulterações de produtos alimentares descritos como carne bovina, contendo carne de equinos por ser um substituto de menor valor¹⁶. Boyaci et. al. utilizaram a espectroscopia Raman aliada a análise por componentes principais (PCA) para identificar adições de carne de equino em carne bovinas em diferentes níveis de adulteração, com uma técnica analítica rápida, simples e fácil de ser implementada¹⁷.

1.1.3. Estocagem de alimentos

Um alimento deve conservar suas propriedades dentro do prazo de validade de forma a garantir a segurança do consumidor sem alterar consideravelmente sua textura, sabor e aroma. Entretanto, durante este período o produto pode sofrer pequenas alterações na sua composição devido a reações de degradação. Diversos fatores podem influenciar a degradação dos produtos alimentares¹⁸. Alguns fatores externos são: temperatura; tempo; composição da atmosfera; tratamentos químicos, físicos ou biológicos empregados no alimento; contaminação e exposição a luz. Existem também fatores intrínsecos do próprio alimento que resultam em processos de degradação, como a composição química e biológica do alimento, quantidade de oxigênio dissolvido e pH¹.

Desta forma, torna-se necessário estudos de degradação para compreender os mecanismos de deterioração do alimento e desenvolver métodos possíveis para contornar o problema, ou ainda, estabelecer limites de segurança e qualidade de consumo do produto¹⁹.

Christensen et. al. avaliaram o processo de estocagem de queijo processado utilizando fluorescência molecular e análise de fatores paralelos (PARAFAC)²⁰. Os autores acompanharam a estocagem durante 10 meses, com e sem emissão de luz sobre as amostras e com três diferentes temperaturas. Quatro fluoróforos foram detectados, dois referentes ao queijo fresco e dois ao queijo envelhecido, sendo que o tempo de armazenamento e a temperatura foram os fatores que mais alteraram a amostra. Ammari et. al. monitoraram a degradação forçada de três óleos vegetais por infravermelho médio²¹, na qual as amostras foram submetidas

a três temperaturas e monitoradas por 3 horas. Por análise de componentes independentes (ICA), foi possível observar sinais de degradação relativos a formação de hidroperóxidos, aldeídos e cetonas, além da transformação de ligações *cis* em *trans* após 1 hora.

Além dos exemplos supracitados, existem na literatura outras técnicas analíticas empregando o uso do *fingerprint* para análises de amostras alimentares. Boa parte dos estudos apresenta as medidas cromatográficas líquida e gasosa para obtenção de *fingerprint*²². Apesar de serem técnicas analíticas que possibilitam a obtenção de uma grande quantidade de informação, são instrumentos que tem alto custo, necessitam de um demorado tempo de análise e consumo de solventes orgânicos.

Como alternativa, a espectroscopia Raman apresenta diversas vantagens como, análises rápidas, com grande quantidade de informação com um preparo de amostra reduzido²³.

1.2. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica espectroscópica que fornece informações sobre os modos vibracionais de uma molécula. Desta forma, é possível obter dados sobre a estrutura molecular e algumas informações físicas do composto determinado. Ela pode ser utilizada como técnica de caracterização (de forma similar ao infravermelho), para identificar substâncias (ou conjunto de compostos) a partir de um padrão espectral (“*fingerprint*”), ou para medidas quantitativas ou semi-quantitativas²⁴.

Como toda técnica espectroscópica, a espectroscopia Raman baseia-se na interação entre a radiação e a matéria. Esta interação pode ocorrer a partir da absorção, emissão, ou do espalhamento dos fótons²⁵. Quando há absorção de fótons, a molécula sofre uma alteração de seu estado, eletrônico, vibracional ou rotacional, alcançando níveis maiores do que seu estado basal. Alguns exemplos de equipamentos que detectam este fenômeno são os espectrofotômetros na região

do UV-visível e na região do infravermelho. O primeiro causa mudanças do estado eletrônico da molécula, enquanto que o outro induz mudanças no estado vibracional ou rotacional²⁶.

Para retornar em seu estado basal, a molécula pode liberar a energia absorvida através de fenômenos como: relaxamento não radiativo, fluorescência ou fosforescência²⁷. O primeiro ocorre quando há uma alta população de partículas excitadas em um único nível, e a colisão entre elas gera perdas de níveis rotacionais, sem emissão de radiação. O segundo acontece a partir do retorno do fóton presente no estado excitado para o seu estado fundamental, liberando a energia referente a essa transição. O último, advém de uma mudança inicial de estado do fóton excitado para um estado excitado intermediário, porém de menor energia (essa transição ocorre de maneira não radiativa). Seguido pelo relaxamento subsequente até o seu nível basal, emitindo radiação referente a diferença de energia entre o estado excitado intermediário e o estado fundamental²⁸.

O espalhamento da radiação baseia-se na observação de fótons com energias iguais ou próximas da energia incidida sobre a amostra, porém com diferente trajetória. Para o espalhamento da radiação, o fóton que interage com a matéria não precisa ter energia igual a diferença de energia entre dois estados da molécula (como ocorre com a absorção). Quando a radiação é espalhada, os fótons são dispersos (espalhados) de duas formas, elástica ou inelástica. O espalhamento elástico ocorre quando os fótons espalhados apresentam a mesma energia e, portanto, o mesmo comprimento de onda que os fótons incididos. Este tipo de espalhamento é conhecido como espalhamento Rayleigh. Entretanto, uma pequena parte dos fótons pode apresentar uma energia maior ou menor em relação ao fóton incidente, quando isso ocorre é denominado de espalhamento inelástico, conhecido como Stokes e anti-Stokes ou ainda efeito Raman²⁹.

O fenômeno de espalhamento Raman foi primeiramente previsto por Smekal em 1923^{30,31} e comprovado teoricamente por Kramers e Heisenberg em

1925^{32,33}. Em 1928, Sir Chandrasekara Venkata Raman observou experimentalmente o efeito que receberia seu nome³⁴ e que lhe renderia um prêmio Nobel de Física em 1930.

O experimento consistia em um arranjo bastante simples. Raman utilizou a radiação solar, focada com um microscópio, como fonte de radiação que era emitida sobre um líquido transparente purificado. No microscópio, havia um filtro de comprimento de onda mais energético (como o violeta). A radiação espalhada passava por um filtro de coloração diferente (amarelo) e era detectada pelo seu próprio olho. A Figura 1.1 mostra uma esquema do procedimento experimental realizado por Raman³⁵. Caso apenas o espalhamento Rayleigh fosse observado, não seria possível detectar qualquer fonte luminosa a partir do segundo filtro, uma vez que a radiação espalhada seria de coloração violeta e essa seria absorvida pelo filtro amarelo. Entretanto, o que Raman observou experimentalmente foi uma parcela de luz que atravessava o filtro amarelo, com coloração esverdeada. Essa radiação, de comprimento de onda diferente comprovava a presença de espalhamentos inelásticos.

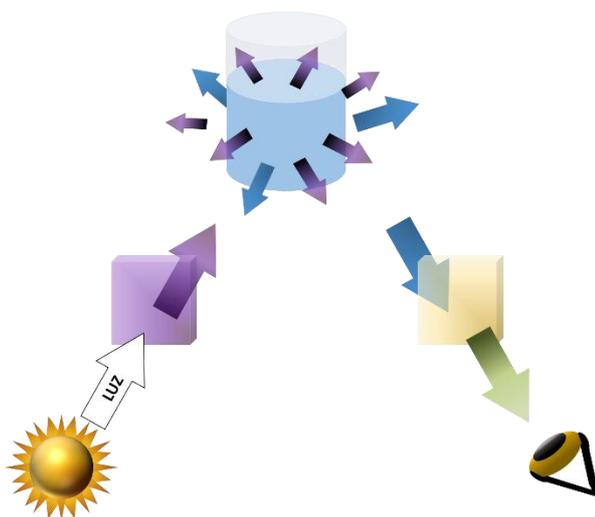


FIGURA 1.1 – Representação esquemática do experimento realizado por Raman

No espalhamento Raman, o fóton irradiado interage com a nuvem eletrônica de uma molécula, causando uma distorção da mesma. Durante esta interação, a radiação emitida causa uma polarização dos elétrons da molécula que

são momentaneamente excitados a um estado de maior energia. Neste estado, o complexo “radiação-molécula” tem um tempo de vida extremamente curto, suficiente apenas para alterar a geometria das nuvens dos elétrons, porém sem alteração no núcleo. Este estado eletrônico intermediário não pode ser explicado pelos estados eletrônicos da molécula, e por isso recebe o nome de estado virtual²⁷. Devido à alta instabilidade do complexo, a radiação é imediatamente emitida na forma de fótons espalhados.

Durante a interação radiação molécula, o fóton (de energia $h\nu_0$) excita momentaneamente a molécula a seu estado virtual, e três possibilidades podem ocorrer com relação a energia da molécula. A molécula pode retornar a seu estado inicial sem qualquer interferência da radiação com a luz emitida, este é o espalhamento Rayleigh. A molécula pode receber parte da energia do fóton retornando a um estado vibracional de maior energia (e_v). Neste caso, o fóton espalhado apresenta uma menor energia que o fóton incidido ($h\nu_0 - e_v$) e conseqüentemente um maior comprimento de onda, este tipo de espalhamento Raman é denominado de espalhamento Stokes. E por fim, a molécula pode doar parte de sua energia (e_v) para o fóton, assim, ao retornar para seu estado eletrônico inicial a molécula encontra-se em um estado vibracional menos energético que antes da interação, e o fóton apresenta uma maior energia ($h\nu_0 + e_v$), este tipo de espalhamento é chamado de espalhamento Anti-Stokes.

No espalhamento Anti-Stokes, a molécula retorna para um estado vibracional de menor energia, portanto é necessário que a mesma se encontre em um estado de vibracional excitado antes da interação. De acordo com a distribuição de Boltzman, à temperatura ambiente a maior parte das moléculas encontra-se no seu estado fundamental³⁶. Isto implica que, à temperatura ambiente a intensidade do espalhamento Anti-Stokes é menor que o espalhamento Stokes. A Figura 1.2 apresenta as transições moleculares envolvidas nos espalhamentos Rayleigh e Raman.

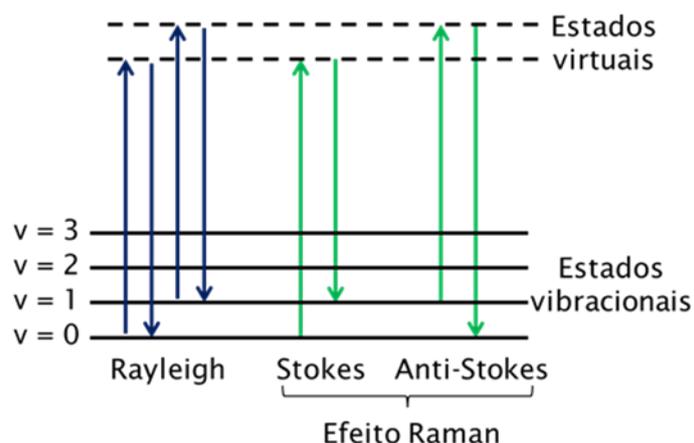


FIGURA 1.2 – Espalhamento Rayleigh, Stokes e o Anti-Stokes

Desta forma, em um espectro Raman completo, é possível observar um pico intenso centralizado referente ao espalhamento Rayleigh, e dois espectros espelhados de mesmo perfil, mas com diferentes intensidades em comprimentos de onda maiores (espalhamento Stokes) e menores (espalhamento Anti-Stokes) comparados ao espalhamento Rayleigh. Como o espalhamento Anti-Stokes apresenta uma baixa intensidade, a maioria dos equipamentos utilizam apenas a região Stokes do espalhamento Raman.

Assim como as demais espectroscopias, o espectro Raman pode ser mostrado a partir da intensidade do espalhamento Raman em função do comprimento de onda do fóton, da frequência ou do número de onda. Entretanto, estas medidas são dependentes do comprimento de onda da radiação incidente. Diversos tipos de laser, com diferentes comprimentos de onda são utilizados como fonte de radiação para equipamentos de espectroscopia Raman, e por isso convencionou-se utilizar o deslocamento Raman (ou '*Raman Shift*') como o eixo das abscissas no espectro Raman. O deslocamento Raman é obtido subtraindo-se a energia do fóton incidido da energia do fóton espalhado. Essa diferença em energia é convertida em número de onda e equivale à energia do estado vibracional na qual a molécula voltou após espalhar a radiação incidente. Assim os picos obtidos terão sempre o mesmo valor de Raman Shift independente do comprimento de onda da radiação emitida, ou ainda incidida. Vale ressaltar que,

selecionou-se o número de onda como medida de referência pela praticidade de correlacionar os picos presentes em um espectro Raman com o espectro infravermelho, i. e., um estiramento C=C de uma molécula terá um valor de Raman Shift bastante próximo com o número de onda do seu espectro infravermelho, facilitando assim a caracterização dos picos.

A Figura 1.3 demonstra um espectro Raman com os espalhamentos Stokes e Anti-Stokes do mineral crocoíta, utilizando um laser de 514,5 nm em função do comprimento de onda, frequência, número de onda e Raman Shift, adaptado de Nasdala et. al.³⁷. Na figura, é possível notar a diferença de intensidade entre o espalhamento Stokes e Anti-Stokes.

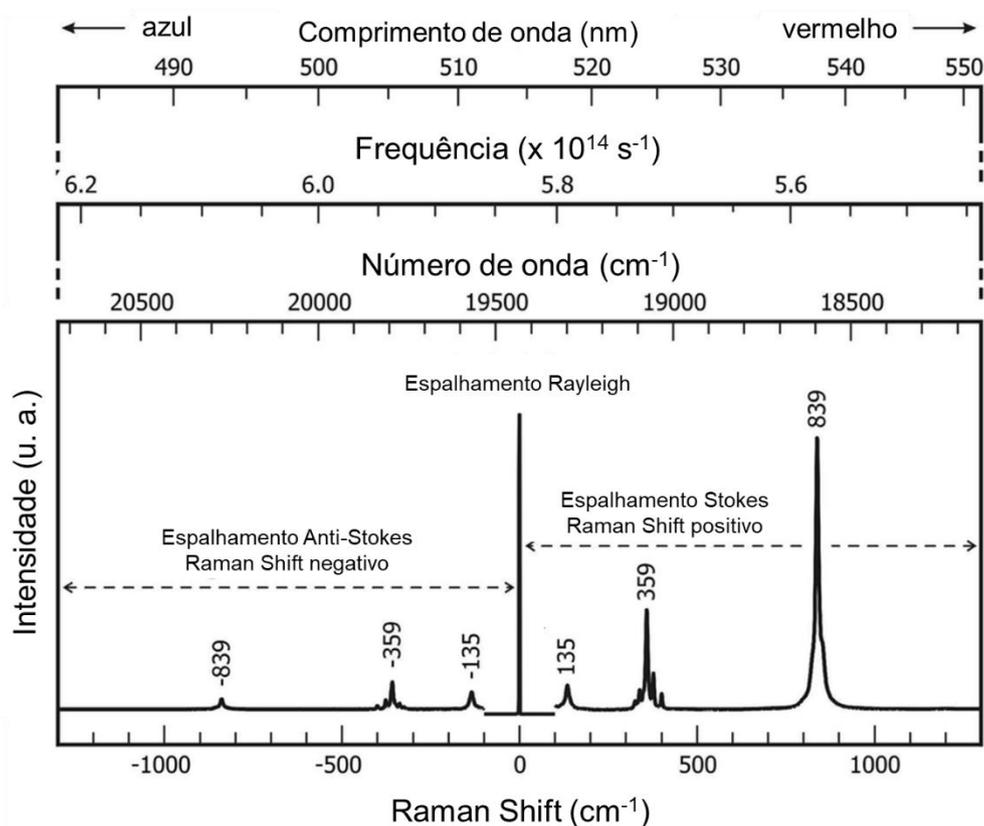


FIGURA 1.3 – Espalhamento Stokes e o Anti-Stokes da crocoíta. Adaptado de³⁷

Um equipamento de espectroscopia Raman apresenta duas configurações mais usuais, baseadas na forma como o equipamento diferencia os comprimentos de onda espalhada pela amostra, podendo ser dispersivo ou com transformada de Fourier. Os equipamentos dispersivos apresentam uma configuração óptica mais

simples e mais robusta, sendo bastante utilizada em equipamentos de análise em campo. Os espectrômetros com transformada de Fourier possibilitam a aquisição de vários espectros em um curto intervalo de tempo, melhorando a sua sensibilidade (em virtude da razão sinal/ruído) e a resolução espectral³⁸. Ambos equipamentos apresentam um laser monocromático como fonte de excitação, um monocromador (para equipamentos dispersivos) ou um interferômetro (em equipamentos de transformada de Fourier), um amostrador e um detector. O tipo de detector e a óptica empregada depende do tipo de laser usado na fonte³⁹.

O laser monocromático empregado como fonte de excitação varia do ultravioleta (UV) até o infravermelho. Devido à simplicidade da sua óptica, os equipamentos dispersivos apresentam uma maior variedade de fontes de radiação, com lasers variando de 200 a 1064 nm. Entretanto, muitos instrumentos com transformada de Fourier utilizam lasers acima de 1000 nm. Este é um parâmetro importante na instrumentação da espectroscopia Raman, uma vez que a quantidade de fótons espalhados varia à quarta potência em relação à energia da radiação. Lasers na região do UV-visível, geralmente constituídos de íons argônio ou de criptônio, geram um grande espalhamento Raman. Mas por terem uma alta energia podem promover a excitação eletrônica da molécula analisada e produzir fluorescência de fundo, dificultando a medida por espectroscopia Raman²⁵. Lasers na região do infravermelho próximo, como laser de diodo ou de ítrio-alumínio-garneto ($Y_3Al_5O_{12}$) dopado com neodímio (Nd:YAG), apresentam menor quantidade de espalhamento Raman, mas não apresentam emissões significativas de fluorescência de fundo⁴⁰.

Por ser um técnica robusta, reprodutível e que sofre pouca interferência d'água, a espectroscopia Raman pode ter sua instrumentação alterada acoplando-se acessórios que possibilitem realizar diferentes tipos de análise dependendo da necessidade⁴¹. Um acessório bastante utilizado, na espectroscopia Raman, é a microscópio óptico. Ao acoplar um espectrômetro Raman a uma câmera de microscópio, geralmente uma câmara de CCD (charged-coupled device), o laser

empregado na fonte é focalizado pelas lentes do microscópio, onde é possível direcionar em pontos únicos da amostra. Este tipo de abordagem permite uma análise espacial da amostra, tanto de forma visual (pelo microscópio) quanto espectral. Assim, é possível obter informações químicas de pontos específicos da amostra, ou ainda realizar um imageamento da mesma, onde cada pixel (ponto da imagem) apresenta um espectro Raman atrelado a ele, sendo empregado em diversos campos de análises, como imageamento celular⁴², estudos de homogeneidade de produtos farmacêuticos⁴³ ou caracterização de pinturas e artefatos arqueológicos⁴⁴.

1.3. Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície

A espectroscopia Raman é uma técnica analítica rápida, não-destrutiva e não-invasiva na qual se obtêm o espectro vibracional com as informações químicas, além de também obter informações físicas de praticamente qualquer matriz em qualquer estado da matéria. No entanto, uma desvantagem da técnica é seu alto limite de detecção quando comparado com outras técnicas⁴⁵.

Uma maneira de se contornar este problema é a utilização da espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), uma vez que esta técnica possibilita um aumento na quantidade de fótons espalhados pelo efeito Raman. A SERS também aumenta a supressão da fluorescência com a interação entre o analito e a superfície metálica, resultando em aumentos de sinal na ordem de $10^3 - 10^8$ no espalhamento Raman possibilitando um espectro amplificado para detectar até uma única molécula⁴⁶.

Em 1974, o químico Martin Fleischman observou um aumento significativo no sinal Raman da piridina adsorvida em eletrodos de prata⁴⁷. Neste estudo eletrodos de prata com uma rugosidade aumentada foram confeccionados a partir de subsequentes ciclos de oxidação e redução do metal em soluções aquosas de cloreto de prata, com o objetivo de estudar a adsorção da piridina nesses eletrodos. Espectros Raman da piridina com maior intensidade foram observados, no

trabalho os autores concluíram que a mudança na orientação da piridina durante a adsorção no eletrodo poderia gerar um espectro Raman diferente que apresentava uma maior intensidade.

Mais tarde, em 1977, dois grupos desenvolveram de forma independente uma explicação acerca do aumento de sinal observado por Fleischman. Jeanmarie e Van Duyne estenderam o estudo do eletrodo rugoso de prata para outras moléculas heterocíclicas e propuseram um efeito eletromagnético para explicar o aumento na intensidade do sinal Raman, baseado em um aumento no campo eletromagnético próximo ao eletrodo gerado pela interação com a molécula. Albrecht e Creighton estudaram a quantidade de ciclos necessários para se observar o efeito do espectro Raman aumentado. A partir dos dados coletados, os autores propuseram uma transferência de carga entre o analito e o metal como principal fator gerador do aumento na intensidade.

Essas duas teorias são as principais vertentes que tentam explicar o aumento do sinal causado pelo efeito SERS. Uma teoria denominada aumento eletromagnético e a outra denominada aumento químico. Enquanto a primeira utiliza o aumento no campo magnético gerado na superfície do metal para explicar o aumento no sinal, a segunda baseia-se na interação do analito adsorvido com o metal, e como este efeito pode alterar a estrutura eletrônica da molécula analisada. Apesar disso, ainda o completo entendimento dos mecanismos que geram o aumento do sinal Raman continuam sendo um tópico de pesquisa.

O aumento eletromagnético é o mecanismo de interação que mais contribui para o espalhamento Raman. Quando a radiação incide sobre a superfície metálica, os elétrons de condução presentes nas últimas camadas eletrônicas do metal oscilam de maneira coletiva⁴⁸. Essa oscilação, também denominada de superfície *plasmon* ressonante localizada, gera um campo magnético intenso localizado próximo da superfície do metal e também gera uma diferença de potencial na partícula metálica, criando um momento de dipolo induzido na superfície do metal.

A frequência da oscilação ressonante na superfície dos *plasmons*, na qual os elétrons de condução absorvem e espalham a radiação com maior eficiência, dependem de diversos fatores⁴⁹:

- natureza do metal: Au, Ag e Cu possuem bons valores de constantes dielétricas o que facilitam a formação do campo elétrico na superfície;
- constante dielétrica do meio: quanto maior a constante dielétrica do meio ao redor das nanoestruturas, maior o aumento do sinal;
- tamanho das partículas: os tamanhos das nanopartículas devem ser entre 10 a 100 nm para que ocorra um aumento de sinal. De acordo com a teoria eletromagnética, quanto maior o tamanho da partícula, maior o aumento do sinal. Entretanto, existe um tamanho máximo onde além deste diâmetro as nanopartículas começam a suprimir os fótons espalhados⁵⁰;
- forma do metal: dependendo do formato obtido para a nanopartícula, é possível observar um aumento eletromagnético e obter espectro SERS com apenas uma nanopartícula⁵¹;
- concentração do metal: para aumento significativo do sinal, é necessário que o analito se encontre em uma região de contato de duas ou mais nanopartículas metálicas, o chamado “*hot spot*”⁵².

Uma vez que esses fatores estejam otimizados, é possível obter um campo eletromagnético suficiente para gerar um aumento de sinal na faixa de 10^4 - 10^8 .

O aumento químico é um efeito menos intenso do que o aumento eletromagnético. Enquanto o efeito eletromagnético resulta em aumentos na ordem de 10^4 , o efeito químico resulta em sinais 10 – 100 maiores do que o espectro Raman convencional. Além disso, o efeito químico ocorre de maneira menos frequente, e atua apenas como fator multiplicativo do sinal conjuntamente com o aumento eletromagnético⁵³.

Diferente do aumento eletromagnético que é bem conhecido e estudado na literatura, o aumento químico ainda não é bem compreendido. Entretanto, sabe-se que este efeito pode ocorrer de três maneiras: aumento a partir de uma excitação

ressonante da molécula; ressonância por transferência de carga entre a molécula e o metal; e mudanças não ressonantes na polarizabilidade da molécula devido a sua adsorção na superfície do metal⁵⁴.

O aumento obtido a partir da excitação ressonante da molécula é o mecanismo químico mais difícil de ser obtido e por isso o menos estudado. O aumento é gerado quando o laser incidente tem energia próxima a energia de um estado eletrônico formado pelo complexo metal-analito. Quando a radiação incide sobre o complexo, os modos vibracionais do mesmo são intensificados e exibem uma grande quantidade de fótons espalhados. Entretanto, este efeito só é evidenciado na região de ressonância da molécula, assim ao ocorrer uma ressonância do tipo π - π , apenas estes modos vibracionais são intensificados e o restante permanece constante⁵⁵.

Diferente do aumento gerado pela transferência de carga entre a molécula e o metal, onde todos os modos vibracionais da molécula sofrem uma intensificação do sinal, neste mecanismo um elétron do metal é excitado por um fóton incidente. O elétron é então transferido para a molécula adsorvida, resultando em um íon negativamente carregado. Quando ocorre a relaxação da molécula, o elétron retorna para o metal gerando uma molécula vibracionalmente excitada, que emite um fóton com comprimento de onda diferente do incidente⁵⁶.

Por fim, o aumento químico estático ocorre devido à formação de um novo sistema químico, complexo metal-molécula. Este novo sistema gera uma mudança na polarizabilidade e no modo vibracional de parte da molécula ligada ao metal. Estima-se que a molécula presente no sistema analito-metal realiza uma retroligação do tipo π com os orbitais do metal, formando um sistema estável e com alta polarizabilidade, possibilitando assim, um aumento no espalhamento Raman⁵⁷.

Portanto, a SERS é baseada na interação entre o analito e uma superfície metálica e esta interação resulta em uma maior polarizabilidade da nuvem eletrônica da molécula adsorvida, gerando um aumento no número de fótons

espalhados com comprimento de onda diferente do incidido. A SERS já foi observada em diferentes moléculas e com diferentes tipos de metais (com tamanho, morfologia e ambiente diversos). Esta técnica mostrou-se eficiente para a detecção de moléculas em níveis de concentração muito abaixo da espectroscopia Raman convencional, de micro-molar a nano-molar, podendo ser aplicada em diversas finalidades, tais como: determinação de intermediários em reações catalíticas, biossensores, análises ambientais, entre outras⁵⁸. Em análises de alimentos, boa parte dos trabalhos utiliza algum composto químico relacionado a ciência dos alimentos como moléculas modelo para estudos de adsorção e comparação com o Raman convencional⁵⁹, que servem como base para o emprego da SERS como método de análise qualitativo ou quantitativo.

Boa parte dos trabalhos de SERS em amostras alimentícias que tem como objetivo estudar a ciência dos alimentos, seja como forma de detecção ou caracterização da amostra, tem como foco a análise de contaminantes. O Sudan I (ou Amarelo Solvente CI 14) é um corante alimentar amplamente utilizado em especiarias, como curry e pimenta. Entretanto, foi banido em diversos países após a agência internacional de câncer classificar essa substância como possivelmente carcinogênica. Di Anibal et. al. utilizaram a espectroscopia SERS e análise por componentes principais para detectar de forma exploratória a presença deste corante em amostras de páprica⁶⁰. Cheung et. al. empregaram diversas técnicas quimiométricas de análise de regressão e SERS para quantificar Sudan I em amostras de pimenta na faixa de concentração de 10^{-3} até 10^{-4} mol·L⁻¹ ⁶¹.

Após o escândalo da melanina em 2008, alguns trabalhos desenvolveram métodos para quantificar este compostos em leite utilizando a espectroscopia SERS. Em 2010, Liu et. al. utilizaram um substrato comercial para análises por SERS (Klarite) para detectar melanina e ácido cianúrico em amostras de leite. Os autores conseguiram uma faixa de detecção de $6,3 \times 10^{-6}$ até $3,1 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹ após uma simples extração líquido-líquido com acetonitrila⁶². Giovanozzi et. al. conseguiram uma menor faixa de concentração, $9,7 \times 10^{-7}$ a $1,6 \times 10^{-5}$ mol·L⁻¹,

utilizando solução coloidal de ouro sintetizada no laboratório⁶³. Para isso, os autores adicionaram uma etapa de precipitação de proteínas antes da extração líquido-líquido e pré-concentração das nanopartículas realizando uma centrifugação, seguido pela remoção de sobrenadante.

Apesar do recente crescimento na análise de amostras alimentícias por SERS, boa parte dos trabalhos foca em análises de ameaças ou contaminantes químicos e biológicos presentes nestes alimentos, e pouquíssimos trabalhos analisam componentes alimentícios das amostras⁶⁴. Isto ocorre devido à alta seletividade da SERS em detectar classes específicas de compostos (como corantes) e a dificuldade de análises simultâneas. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem a multi-deteção por SERS.

1.4. SERS-CCD

A espectroscopia Raman amplificada por superfície apresenta uma alta sensibilidade e seletividade dos compostos analisados⁶⁵. Entretanto, a alta seletividade também pode se tornar uma desvantagem quando uma adsorção de mais de um composto na superfície metálica é requerida. Para análises de *fingerprint* espectral, espera-se que uma grande quantidade de compostos presentes em uma amostra forneça informação relevante para o espectro, de modo que este possa representar de forma confiável a amostra analisada. Muitas vezes torna-se necessário aliar métodos de separação ou preparo de amostra para adquirir uma maior quantidade de informação espectral para uma única amostra ao se utilizar o SERS. Nos últimos anos, várias técnicas de separação, como por exemplo cromatografia líquida (LC)^{66,67}, cromatografia gasosa (GC)^{68,69}, eletroforese capilar⁷⁰, polímeros molecularmente impressos^{71,72} e cromatografia de camada delgada (CCD)⁷³ foram associados a SERS para aumentar a sua eficiência e aplicabilidade.

Dentre elas, uma técnica que tem recebido maior atenção nos últimos anos é a cromatografia de camada delgada. A CCD é uma técnica barata, simples e que apresenta uma grande gama de aplicações: desde monitoramento de reações orgânicas até análises clínicas⁷⁴. Além disso, a CCD é uma técnica extremamente versátil e que devido a sua simplicidade pode ser associada a diversos tipos de técnicas instrumentais mais sofisticadas, como por exemplo espectrometria de massas, espectroscopia no infravermelho e Raman⁷⁵.

Em CCD, um filme fino de material adsorvente com espessura de 0,10 até 0,25 mm reveste um suporte rígido (normalmente, placas de vidro ou folhas de alumínio). A camada que recobre o suporte é a fase estacionária do sistema, e pode ser feito de sílica, óxido de alumínio ou até celulose⁷⁶. A sílica é o suporte mais utilizado em análises de CCD por obter uma elevada área superficial, que possibilita uma maior interação com os analitos e a fase estacionária. Os suportes de óxido de alumínio podem ser modificados para apresentarem uma maior característica ácida ou básica, entretanto devido a sua reatividade podem decompor a molécula alvo durante o processo de separação⁷⁷. A celulose não apresenta um poder de separação tão eficiente quanto os suportes mencionados, porém é empregado em algumas situações devido a praticidade no seu manuseio e baixo custo⁷⁸.

A amostra a ser analisada é aplicada na ponta da placa cromatográfica por meio de capilares finos, mantendo-se a menor área de aplicação possível para uma melhor resolução de separação. A placa contendo a amostra é então transferida para um reservatório de solvente contendo a fase móvel. A fase móvel, geralmente constituída de um solvente ou uma mistura de solventes, é selecionada previamente de forma a garantir a melhor separação das substâncias presentes na amostra. A fase móvel percorre por capilaridade a placa cromatográfica, realizando a migração dos compostos pela afinidade com o solvente utilizado.

Assim, os compostos presentes na amostra eluem através da fase estacionária com diferentes velocidades de acordo com a interação entre os

componentes da amostra e a fase estacionária, estas forças de interação se opõem à força de arraste da fase móvel retardando o avanço dos componentes da amostra. A diferença entre o retardo para cada composto presente na amostra gera diferentes padrões de separação, em que em cada região (*spot*) é possível identificar um composto (ou grupo de compostos) presentes na amostra. A Figura 1.4 é uma representação esquemática do procedimento de separação por CCD.

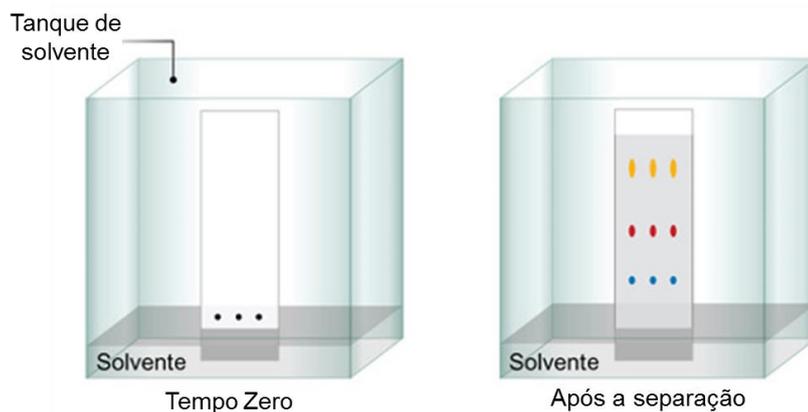


FIGURA 1.4 – Representação esquemática de uma separação por CCD

As bandas cromatográficas separadas na placa cromatográfica podem ser visualizados por diversos métodos, como por exemplo: radiação UV, revelação química, ou por derivação da amostra. No uso moderno da CCD, a revelação das placas tem sido realizada associando-se com outras técnicas analíticas instrumentais, como por exemplo as técnicas espectroscópicas⁷⁹.

Como a espectroscopia Raman apresenta uma baixa sensibilidade, a utilização de nanopartículas metálicas na superfície do material adsorbente das placas de CCD permite o aumento no sinal Raman gerando o fenômeno SERS com espectros pontuais ao longo da dimensão de eluição cromatográfica da placa de CCD. Este tipo de método é conhecido como SERS-CCD⁸⁰.

A combinação da espectroscopia Raman com a CCD é um método de separação e identificação com alto potencial analítico. Os compostos orgânicos separados pela placa cromatográfica geralmente apresentam um espalhamento Raman e picos seletivos enquanto as fases estacionárias utilizadas na CCD não

apresentam um espalhamento Raman significativo. Assim pode-se utilizar esse método para a caracterização dos compostos e análises de *fingerprint*⁷³ ou de forma quantitativa⁸¹. As placas de CCD analisadas ao longo da linha de separação (do ponto de aplicação da amostra até a frente do solvente) possibilitam a geração de um cromatograma-SERS com uma maior quantidade de compostos detectados por SERS, e que dependendo da sua concentração não seriam detectados por câmaras de revelação ou outros métodos convencionais.

Na química analítica, este sistema pode ser utilizado para facilitar a detecção por SERS de diferentes compostos presentes em uma matriz complexa e assim, obter diferentes perfis espectrais para uma mesma amostra. Esta método favorece estudos exploratórios e de quantificação para matrizes com uma grande quantidade de compostos ativos no SERS⁸².

Por ser um método de separação extremamente simples e barato e que não necessita de uma instrumentação elaborada, a CCD associada a SERS mostrou-se uma técnica bastante promissora, tendo uma grande área de aplicações, como: monitoramento de reações químicas⁸³, detecção de biomarcadores⁸⁴, análise de tintas de pinturas⁸⁵ e análises ambientais⁸⁶. Apesar de SERS-CCD ter sido utilizada para análise de alimentos⁸⁷⁻⁹⁰, o uso desta técnica é relativamente nova e mais estudos são necessários para se compreender seu verdadeiro potencial e áreas de aplicação. Nesta tese, será empregado a método de SERS-CCD em três diferentes aplicações na análise de alimentos: 1) na classificação e separação de amostras baseadas na marca e região de produção; 2) quantificação de alimentos adulterados que oferecem riscos para os humano; 3) estudo da estabilidade de amostras em testes de degradação forçada.

1.5. Amostras de alimentos

1.5.1. Cerveja

A cerveja é um dos produtos alcóolicos de maior consumo no mundo sendo comercializada em diversos tipos, como Pilsner, Stout, Bock etc., resultantes de

variações no sistema de produção e condições geográficas⁹¹. Essas alterações resultam em mudanças abruptas nas concentrações dos compostos responsáveis pelo sabor e aroma do produto. Portanto, um controle de qualidade do produto final é altamente requerido pelas indústrias.

A história da cerveja é tão antiga quanto a história da humanidade, e acredita-se que o consumo de produtos alcóolicos originados da fermentação tenha ocorrido de forma natural a partir do desenvolvimento da agricultura⁹². Apesar dos primeiros relatos históricos acerca da cerveja apareçam na época dos sumérios, foi apenas por volta de 1200 que a cerveja começou a ser fabricada em larga escala e com sistemas regulatórios e de controle de qualidade⁹³.

As cervejas podem ser classificadas em dois grandes grupos distintos, a cerveja do tipo *Ale*, e do tipo *Lager*. As cervejas que utilizam uma levedura onde são fermentadas em altas temperaturas (15 – 24 °C) por curtos períodos de tempo (geralmente de 2 a 7 dias) são denominadas como cerveja do tipo *Ale*. Elas apresentam uma maior quantidade de sabores, proveniente dos diferentes ingredientes utilizados durante sua fermentação. É uma das classes de cerveja mais antigas do mundo, e sua história muitas vezes é confundida com a própria história da cerveja. Dentro das cervejas *Ale*, existe um espectro de diferentes tipos, como a IPA (*Indian Pale Ale*), *Stout*, *Porter* e outras⁹⁴.

As cervejas do tipo *Lager* são produzidas a partir da fermentação de leveduras em temperaturas mais baixas (6 – 14 °C), por tempos maiores (de 5 a 10 dias)⁹⁵. Elas apresentam um gosto mais puro da levedura e do malte e uma coloração mais clara. Apesar de terem sido criadas séculos depois das cervejas *Ale*, a produção de cervejas *Lager* cresceu rapidamente, sendo a principal classe de cerveja consumida nos últimos anos⁹⁶.

Dentro das cervejas *Lager* existe uma subclasse de tipos onde variações no processo de fermentação levam a produtos com qualidades diferentes, como por exemplo as cervejas *Bock* e *Pilsner*. Durante o desenvolvimento da cerveja *Pilsner*, nenhuma patente foi registrada, nem sobre o processo, nem sobre a

receita. A falta de patente, aliado com o rápido apreço dos consumidores pelo seu sabor, fizeram com que diversas “imitações” da cerveja Pilsner tomassem o mercado de forma extremamente rápida⁹⁷.

Dentre os países produtores, destacam-se a China, os Estados Unidos e o Brasil em ordem decrescente de produção anual^{98,99}. Devido ao clima quente de boa parte da região brasileira, a cerveja do tipo *Pilsner* se tornou a mais apreciada e consumida no país, sendo responsável por 98 % do mercado de cerveja nacional. No Brasil, existem diversas marcas de cervejas fabricadas em escala industrial disponíveis para consumo. A avaliação e o monitoramento destes produtos levam ao controle de qualidade do processo e uma produção final mais uniforme, elevando a sua qualidade e gerando um maior consumo¹⁰⁰.

Na maioria dos casos, é caro, impraticável e desnecessário realizar análises individuais de vários compostos presentes nas amostras para testar sua qualidade. Ao invés disso, pode-se estabelecer um “*fingerprint*” (espectral ou cromatográfico) de um grande conjunto de amostras e assim, a partir de métodos de comparação, obter a classificação destas por meio dos resultados obtidos na análise¹⁰¹. Para este tipo de método, busca-se utilizar análises rápidas e práticas, que auxiliados por ferramentas quimiométricas possam gerar padrões de agrupamentos e classificação, além de facilitar o controle de qualidade do produto.

No caso da cerveja, diversas técnicas analíticas foram aplicadas para gerar os fingerprints, dentre elas destacam-se: a espectroscopia na região do UV-visível¹⁰², ressonância magnética nuclear (RMN)^{103,104}, cromatografia gasosa (CG)¹⁰⁵, espectrometria de massas (MS)^{106,107} e língua eletrônica¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Biancolillo et. al. utilizaram 5 técnicas analíticas para caracterizar e identificar uma cerveja italiana artesanal¹¹¹. Os autores observaram que, ao concatenar os dados obtidos por análise termogravimétrica, espectroscopia no infravermelho médio e próximo e espectroscopia no ultravioleta e visível, foi possível discriminar uma cerveja de alta qualidade de cervejas locais de menor qualidade em todas as amostras de

treinamento e validação do modelo. Devido a limitação da técnica, poucos estudos utilizaram a espectroscopia Raman para análises de cerveja, sendo este um campo a ser explorado.

1.5.2. Leite

O leite é um alimento essencial para todo mamífero, sendo o primeiro a ser ingerido por ele ao nascer, e na maioria dos casos, o único alimento presente em sua dieta no período inicial de vida¹¹². O leite é definido como uma secreção lactal de animais, produzido pela glândula mamária. Por se tratar de um fluido biológico, sua composição apresenta uma complexidade, sendo um alimento rico em proteínas, minerais, carboidratos e vitaminas essenciais para o desenvolvimento dos primeiros meses de vida da maioria dos animais, e para a saúde dos seres humanos durante toda a sua vida¹¹³.

No Brasil, o consumo de leite derivado de origem animal é dominado pelo leite de vaca. Estima-se que em 2016 foram produzidos 33,6 milhões de toneladas de leite de vaca em todo o país, apresentando-se como o quarto maior produtor mundial de leite de vaca. Apesar disso, o Brasil apresenta um déficit comercial na exportação de leites. Um dos fatores observados como principais desafios na exportação de leite se refere a acordos sanitários com países importadores e conformidade às normas externas¹¹⁴.

Desde o incidente da melanina no leite em 2008 as agências reguladoras estão cada vez mais rígidas quanto a possíveis casos de adulteração e contaminantes em leite, e conseqüentemente em sua comercialização. A adulteração do leite baseia-se na adição ou diluição do produto com substâncias de menor custo, que podem ou não apresentar algum risco para a saúde humana, para mascarar alguma característica inferior ou apresentar um ganho econômico¹¹⁵. Os contaminantes em leite são quaisquer compostos provenientes de uma fonte externa, exceto aqueles adicionados intencionalmente para fins nutricionais.

Com a demanda de maior produção de produtos de origem animal, estes são constantemente submetidos a tratamentos com diversos tipos de medicamentos, tais como hormônios e antibióticos¹¹⁶. Sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) (Figura 1.5) são dois antibióticos amplamente utilizados em medicamentos destinados a uso humano e veterinário. A combinação de ambos, geralmente em uma proporção de 5 SMX : 1 TMP, cria um efeito sinérgico que aumenta a eficácia no tratamento de infecções bacterianas¹¹⁷. Em animais, além do uso destes medicamentos para o tratamento de infecções, também é possível encontrar casos onde eles são utilizados como medida profilática¹¹⁸. Desta forma, o uso impróprio destas drogas em animais pode levar a uma acumulação nos produtos de origem animal, como carne, ovos e leite¹¹⁹⁻¹²¹.

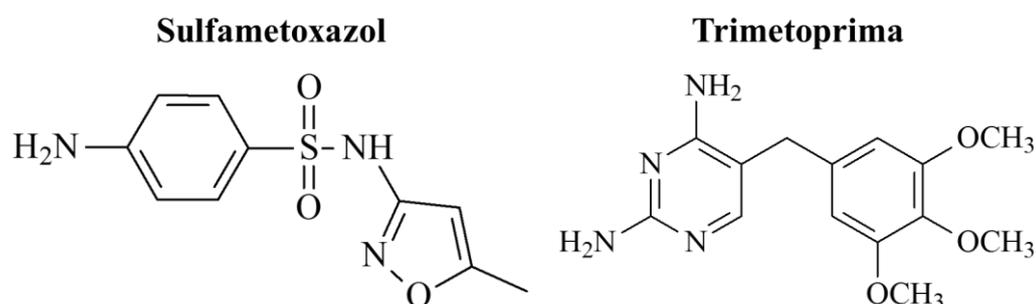


FIGURA 1.5 – Estrutura molecular da sulfametoxazol e trimetoprima

No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) regula esses dois antibióticos de acordo com os limites máximos de resíduo (LMR) estipulados pela Agência de Medicamentos Europeia (EMA) e a Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (US FDA)¹²². Essas agências determinam que o limite máximo permitido de sulfametoxazol em leite é de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ enquanto que para trimetoprima é de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ¹²³. Portanto, faz-se necessário o uso de métodos analíticas que possibilitem a determinação e quantificação destes fármacos em amostras complexas e em baixas concentrações.

Devido à alta complexidade da matriz amostral, a maior parte dos trabalhos apresentados na literatura quantificam esses antibióticos por cromatografia líquida com algum tipo de pré-tratamento da amostra. Sun et. al. usaram um

polímero molecularmente impresso para uma extração seletiva do sulfametoxazol em leite¹²⁴. Os autores conseguiram um limite de detecção 10 vezes menor que o LMR, com recuperação acima de 90%. Como alternativa ao pré-tratamento da amostra, Pereira e Cass desenvolveram uma coluna cromatográfica de meio de acesso restrito em amostras de leite¹²², que também foi aplicada em amostras de ovos¹²⁰. Os autores quantificaram ambos os fármacos sem a necessidade de etapas de *clean-up*, com um limite de detecção 2 vezes abaixo do valor de LRM para os dois medicamentos, e uma acurácia acima de 90%.

1.5.3. Vinho

O vinho é provavelmente a bebida alcóolica de maior complexidade química, e por conta disso é uma área de pesquisa bastante explorada. Em 2014, Gall et. al. conseguiram detectar mais de 3000 compostos em duas variedades de vinho por espectrometria de massas de alta resolução¹²⁵. Apesar disso a técnica empregada pelos autores não consegue distinguir isômeros, que poderia incrementar ainda mais esse número. Apesar dos inúmeros esforços aplicados para se compreender a química do vinho, ainda existem diversos pontos a serem estudados e compreendidos com maiores detalhes¹²⁶.

Em um vinho tinto comum, cerca de 81 – 86% (em razão massa/massa) de sua composição é água, e 11 – 16% é etanol. Resultando em aproximadamente 3 % de sua composição relativo a compostos responsáveis pelo aroma, coloração e sabor. Destes, boa parte apresentam-se em faixas de concentração que vão de ppm ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) até ppt ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$), e pequenas variações em suas concentrações relativas podem alterar completamente as propriedades do produto¹²⁷.

Por se tratar de um sistema dinâmico, o vinho sofre reações químicas e altera sua composição mesmo após a fermentação completa do produto. Este tipo de processo, muitas vezes ocorre após a selagem do vinho, onde o produtor não pode mais intervir. Durante este processo, diversos compostos minoritários

podem sofrer reações de degradação alterando as propriedades organolépticas do produto final^{128,129}.

Para um vinho ter um alto valor agregado e reputação, além de apresentar um controle de qualidade, este deve conter a menor quantidade possível de defeitos. Por isso, são aplicados testes de estabilidade forçada no produto para avaliar possíveis fatores externos que venham a alterar sua composição¹³⁰. Alguns dos fatores externos mais importantes e avaliados no envelhecimento e estocagem do vinho são: a quantidade de oxigênio dissolvido, o pH, a temperatura, e o tempo de estocagem¹³¹.

A quantidade de oxigênio dissolvido é um fator limitante na preservação e estabilidade do vinho. Ainda que a quantidade de oxigênio dissolvido seja requerida para melhorar algumas características do vinho, em excesso pode causar diversas reações redox de compostos responsáveis pelo aroma, sabor e valor nutricional do vinho. Principalmente em vinhos tintos, a oxidação é requerida para desenvolver sua coloração, promover sua estabilidade e reduzir sua adstringência, amargor e a quantidade de taninos. Porém, o excesso de oxigênio leva à oxidação do etanol a acetaldeído, e força a degradação de alguns polifenóis (como os flavonoides) e antocianinas¹³².

Como forma de contornar problemas de oxidação do vinho, pode-se purgar os tonéis com gases inertes, como o N₂ ou Ar. Outra alternativa bastante empregada é o uso de aditivos como ácido cítrico ou SO₂. Apesar de empregado em boa parte dos vinhos comerciais, o uso de SO₂ como estabilizante é visto como desfavorável, uma vez que altera suas propriedades formando precipitados poliméricos de compostos fenólicos, de sabor adstringente^{133,134}.

Assim como o oxigênio dissolvido, o pH é um fator importante na produção do vinho, variando de 3,0 à 4,5. O pH atua de forma regulatória em diversas reações químicas que acontecem durante a fermentação e envelhecimento do vinho. Em pHs mais ácidos produzem vinhos com colorações mais avermelhadas e apresentam um sabor mais forte e encorpado. Em contrapartida, vinhos com

baixo pH apresentam uma menor estabilidade das proteínas presentes em solução favorecendo sua precipitação. Vinhos com pH mais alto, tendem a ser mais suaves e com gostos mais amargos, além disso, tendem a oxidar de forma mais rápida que vinhos ácidos¹³⁵.

Todas essas reações descritas anteriormente são influenciadas de forma cinética pela temperatura, sendo que as reações menos desejadas para um vinho de qualidade são aquelas mais influenciadas pelo aumento da temperatura. Entre elas, pode-se citar a formação de etil carbamato (composto com propriedades carcinogênicas), formação de dimetil sulfito, e a degradação de antocianinas.¹²⁷

Apesar de serem fatores extremamente importantes, boa parte dos estudos de degradação forçada são realizados de maneira univariada, isto é, avaliando o efeito de apenas um fator por vez. Todavia, em condições reais estes fatores atuam de maneira sinérgica potencializando seus efeitos na presença dos outros fatores. Apenas alguns autores realizaram testes de degradação forçada, como por exemplo, Martins et. al. monitoraram por voltametria cíclica a degradação forçada de vinho branco de forma multivariada¹³¹. Os autores avaliaram a adição de oxigênio dissolvido e NaOH em duas temperaturas de estocagem, e conseguiram monitorar a degradação das amostras por análises por componentes principais. Oliveira et. al. avaliaram a degradação de vinhos do Porto sobre o efeito sinérgico da temperatura e do oxigênio dissolvido¹²⁸, onde os autores conseguiram observar por LC-MS algumas importantes reações de oxidação como a degradação de antocianinas e catequinas.

CAPÍTULO 2 – MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

2. MÉTODOS QUIOMÉTRICOS

2.1. Análise por Componentes Principais (PCA)

A análise por componentes principais (PCA) é a base de grande parte dos métodos multivariados. A PCA é um método que visa encontrar a direção de maior dispersão dos dados no espaço das variáveis estudadas, tomando como base a hipótese que a variabilidade contém informações relevantes. A partir de um determinado conjunto de dados, a PCA é capaz de conter as informações mais relevantes em um número reduzido de novas variáveis, descartando dados irrelevantes para descrever o sistema¹³⁶.

A redução das variáveis ocorre quando existe colinearidade entre as variáveis estudadas na matriz de dados, ou seja, se (ou quando) algumas variáveis apresentam as mesmas informações que outras, elas são (ou estão) correlacionadas¹³⁷. Desta forma, a PCA é utilizada para reconhecer padrões, selecionar amostras, construir modelos de calibração multivariada e obter uma visualização rápida e fácil de grupos e/ou anomalias. Todas essas aplicações podem ser realizadas de maneira mais simples e fácil, reduzindo o espaço inteiro de todo o conjunto de dados.

O método baseia-se na transformação das coordenadas das variáveis originais de uma matriz de dados (amostras x variáveis) em um novo eixo de variáveis ortogonais, ou seja, não correlacionadas. Cada novo eixo, denominado componente principal (PC), explica a maior quantidade de informação dos dados obtidos. A Figura 2.1 ilustra a transformação de um conjunto de dados que apresenta valores para três variáveis originais: x , y e z . Esta distribuição é facilmente explicada em um novo espaço de duas dimensões formado pelas novas variáveis (PC1 e PC2, sendo PC2 ortogonal a PC1), reduzindo o número de fatores analisados de 3 para 2 e sem perder informações relevantes.

Do ponto de vista geométrico, a PCA pode ser compreendida como um método de rotação dos dados de forma a melhor entender a correlação entre os

indivíduos. Mas por conta disso, os resultados recuperados pela PCA não representam informações físico-químicas diretas, como o espectro puro de uma analito presente na amostra.

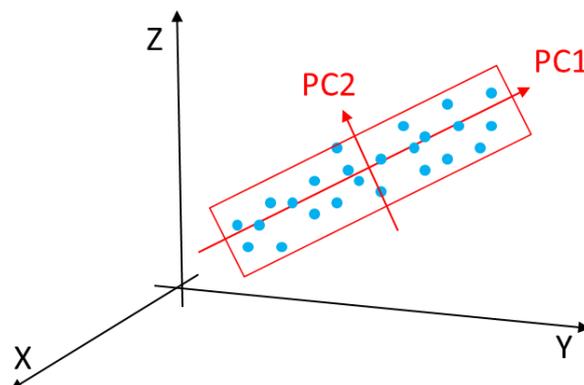


FIGURA 2. 1 – Representação gráfica das Componentes Principais

Matematicamente, a PCA obtém uma relação entre os dados originais (\mathbf{X}) e os dados obtidos nesta nova dimensão de variáveis a partir dos pesos dados por cada amostra (\mathbf{P}) e a sua projeção na nova dimensão de variáveis (\mathbf{T}) de acordo com a equação 2.1.

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (2.1)$$

Esta equação expressa a PCA em termos matriciais. Logo, o PCA é a decomposição da matriz de dados originais, matriz $\mathbf{X}(n,m)$, em duas novas matrizes, $\mathbf{T}(n,d)$ e $\mathbf{P}^T(d,m)$, além de uma matriz de resíduos $\mathbf{E}(n,m)$, como descrito na Figura 2.2, onde n é o número de amostras (linhas) e m é o número de variáveis (colunas) da matriz original, e d é o número de PCs calculadas para o modelo¹³⁸.

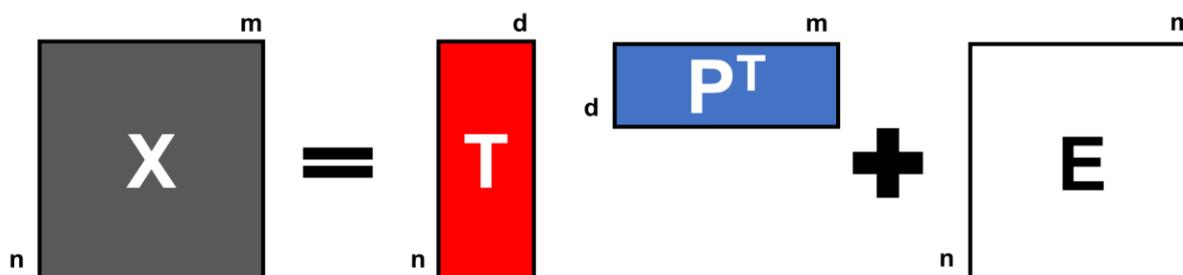


FIGURA 2. 2 – Esquema de decomposição da matriz de dados \mathbf{X}

A matriz de pesos (matriz \mathbf{P}) é definida pela relevância de cada variável em uma dada componente principal (PC). Cada elemento da matriz \mathbf{P} é matematicamente igual ao cosseno do ângulo entre o eixo de cada variável original e a PC. Quanto mais próximo de ± 1 , maior a influência que a variável tem na descrição da componente principal para uma matriz de dados centrada na média. A matriz de escores (matriz \mathbf{T}) representa a projeção das amostras neste novo sistema de eixos e cada amostra terá um valor de escore para cada PC^{139,140}. Sendo que, as colunas de \mathbf{T} e as linhas de \mathbf{P}^T são ortogonais entre si, ou seja, $\mathbf{p}_i^T \mathbf{p}_j = 0$ e $\mathbf{t}_i^T \mathbf{t}_j = 0$, para $i \neq j$, uma vez que estas representam uma componente principal. A matriz de resíduos (matriz \mathbf{E}) é a quantidade de informação não relevante ou não explicada pelas componentes principais. Geralmente em dados espectroscópicos a matriz de resíduos é atribuída ao ruído da análise.

Há várias maneiras de se calcular a PCA, sendo os dois mais utilizados o SVD (decomposição por valores singulares) e NIPALS (mínimos quadrados parciais iterativos não-lineares). Enquanto o NIPALS determina os escores e os loadings de maneira iterativa utilizando a regressão por mínimos quadrados, o SVD é um método numérico de decomposição de matrizes de dados. Mesmo sendo um algoritmo com cálculos mais complexos e demorados que o NIPALS, a maioria dos softwares computacionais já apresentam a função SVD contidas em seus sistemas, com algoritmos bastante otimizados. Nos dias atuais, a maioria dos cálculos de PCA utilizam o SVD, e poucos usuários ainda utilizam o algoritmo NIPALS, assim será demonstrado apenas como funcional o algoritmo SVD.

O SVD é uma decomposição de uma matriz em matrizes ortogonais, de acordo com a equação 2.2¹⁴¹:

$$\mathbf{X} = \mathbf{USV}^T + \mathbf{E} \quad (2.2)$$

onde:

- \mathbf{X} : matriz original;
- \mathbf{U} : matriz normalizada dos escores de \mathbf{X} sujeita a $\mathbf{U}^T \mathbf{U} = \mathbf{I}$;
- \mathbf{V} : matriz normalizada dos loadings de \mathbf{X} sujeita a $\mathbf{V}^T \mathbf{V} = \mathbf{I}$;

- **S**: matriz de covariância com os valores singulares;
- **E**: matriz de resíduos.

A relação entre a equação 2.1 e a equação 2.2 é dado por:

$$\mathbf{P} = \mathbf{V} \quad (2.3)$$

$$\mathbf{T} = \mathbf{US} \quad (2.4)$$

A matriz de covariância **S** apresenta os autovalores da matriz original em sua diagonal, com os elementos restantes zerados. A otimização do método SVD ocorre a partir da otimização da diagonal da matriz de covariância, e os elementos desta, são ordenados de acordo com a variância explicada de cada componente. Esta relação é importante para se determinar o número de componentes principais significativas para o modelo.

2.2. Análise de Variância – Análise por Componentes Principais (ANOVA-PCA)

Devido à alta importância da PCA para os métodos quimiométricos, diversas variações do método foram desenvolvidas para atender problemas específicos. Em 2005, Harrington et al. combinaram a análise de variância e análise por componentes principais (ANOVA-PCA) para detectar biomarcadores em uma grande quantidade de dados de ressonância magnética nuclear (RMN)¹⁴².

A ANOVA-PCA combina as vantagens estatísticas da ANOVA para avaliar a importância de fatores com as vantagens da PCA no estudo de correlação de variáveis, apresentando de maneira visual se os diferentes níveis de um fator apresentam diferença significativa¹⁴³. Na ANOVA, a variância de cada fator é comparada com o erro residual de forma a verificar a sua significância. Na ANOVA-PCA, o erro residual é combinado com cada fator e é aplicada a PCA,

na qual é possível observar a significância do fator na primeira componente principal¹⁴⁴.

Esta ferramenta é um método supervisionado onde as amostras são representativas para os diferentes níveis de fatores de um planejamento de experimentos. Para um conjunto de dados espectrais onde existem dois fatores a serem avaliados (um planejamento experimental 2², por exemplo), é plausível representá-lo de forma vetorial em um modelo matemático simples (equação 2.5):

$$x_i = \bar{x} + \bar{\alpha}_j + \bar{\beta}_k + \overline{\alpha\beta}_{jk} + \varepsilon_i \quad (2.5)$$

onde x_i é o espectro de uma amostra i , \bar{x} é o espectro médio, $\bar{\alpha}_j$ e $\bar{\beta}_k$ são os efeitos para os dois fatores, $\overline{\alpha\beta}_{jk}$ é o efeito de interação entre os dois fatores, e ε_i é o resíduo ou variância que não provém dos dois fatores avaliados¹⁴⁵.

A ferramenta pode ser dividida em duas etapas de acordo com a Figura 2.3. Na primeira parte, a variabilidade dos dados é decomposta em contribuições referentes aos efeitos dos fatores e suas interações (parte ANOVA). Na etapa seguinte, a variabilidade residual é adicionada aos efeitos e determina-se a correlação entre as variáveis de forma a comparar os níveis dos fatores com o erro residual do planejamento (PCA)¹⁴⁶.

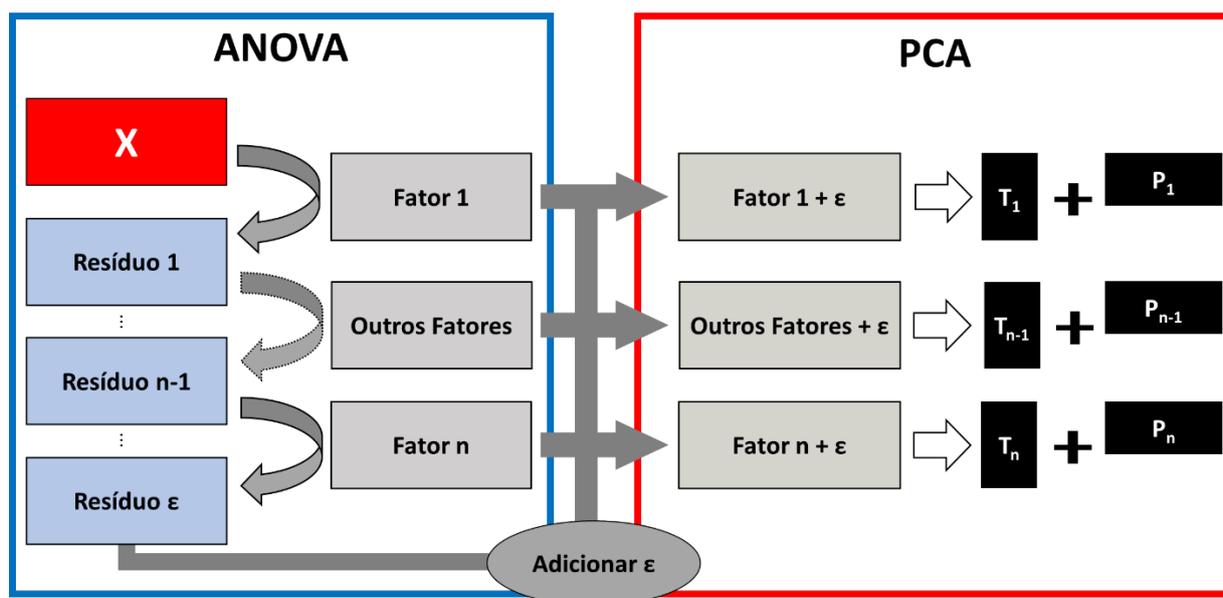


FIGURA 2.3 – Representação esquemática do ANOVA-PCA

Para o cálculo da ANOVA-PCA, a matriz de dados é normalizada para aumentar a variabilidade dos dados, onde é aplicado os seguintes passos:

1. Na etapa ANOVA, são calculadas as médias da matriz **X** respeitando cada nível do primeiro fator e cria-se uma matriz de dados com esses valores médios. Para o exemplo apresentado, a primeira matriz referente ao primeiro fator (**Fator 1**) seria uma matriz de dimensões $2 \times n$, onde n seriam as variáveis do espectro. A primeira linha dessa matriz conteria a média dos espectros referentes as amostras do nível -1 e a segunda, a média dos espectros para o nível +1, ambos para o fator 1.
2. Em seguida, a matriz **Fator 1** é replicada de acordo com os índices do planejamento de experimentos e subtrai-se a matriz **Fator 1** replicada da matriz **X**, e obtém-se a matriz de resíduos, **Resíduo 1**. Esse cálculo é efetuado para todos os fatores e suas interações. A matriz de resíduos final, **Resíduo ϵ** , apresenta a variância residual representativa do planejamento de experimentos.
3. A matriz de **Resíduo ϵ** é adicionada em cada uma das matrizes dos fatores, gerando uma matriz, "**Fator + Resíduo**".
4. Por fim, é aplicado a PCA em cada uma das matrizes "**Fator + Resíduo**". A significância dos fatores é avaliada de forma visual a partir dos valores de escores (**T**) referentes as amostras em diferentes níveis. Com a matriz de loadings (**P**) do PCA, é aceitável, ainda identificar as variáveis responsáveis pela alteração no comportamento das amostras em cada fator significativo.

A Figura 2.4 apresenta os três possíveis resultados apresentados por um gráfico de escores provenientes da ANOVA-PCA, para um fatorial de dois níveis. O primeiro caso (Figura 2.4 a) apresenta um gráfico de escores, onde não é possível observar um agrupamento das amostras em relação aos níveis, portanto o fator não é significativo comparado com o erro residual. O segundo caso (Figura 2.4 b) tem um gráfico de escores com separação das amostras de níveis diferentes na primeira componente principal (PC1), indicando que o fator é significativo. O terceiro caso (Figura 2.4 c) demonstra um gráfico de escores com separação das amostras de níveis diferentes na segunda componente principal (PC2). Diante

disso, é possível evidenciar que há informação relevante contida no conjunto de dados, porém menos significativa que a variação residual, evidenciando uma variabilidade residual estruturada, como por exemplo variação na linha de base, erros sistemáticos ou fatores não contemplados pelo planejamento.

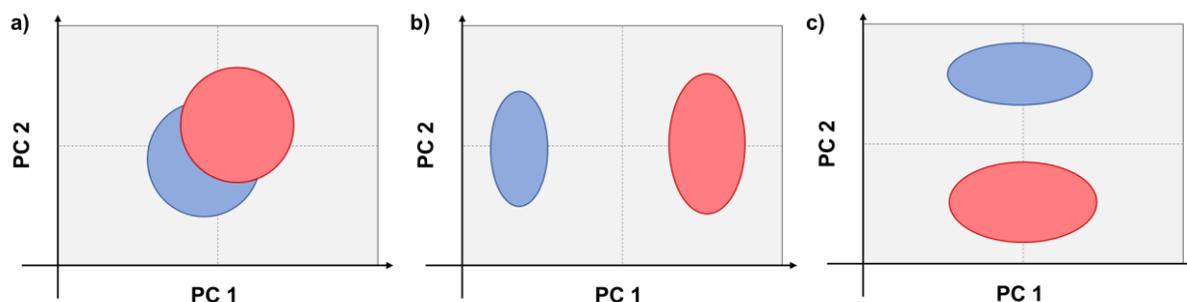


FIGURA 2. 4 – Possíveis gráficos de escores resultantes da ANOVA-PCA. a) fator não significativo, b) fator significativo, c) fator não significativo, mas com informação adicional

2.3.Resolução Multivariada de Curvas por Quadrados Mínimos Alternados (MCR-ALS)

O MCR-ALS é baseado na decomposição bilinear dos dados originais, **D** ($r \times c$) em duas matrizes, uma relacionada ao perfil de concentração, e outra relacionada ao perfil de sinais¹⁴⁷ (Equação 2.6). A decomposição ocorre a partir de uma deconvolução dos sinais sobrepostos presentes no dado original sem que haja a necessidade de um conhecimento prévio acerca dos perfis espectrais individuais do sistema. Do ponto de vista matemático, a resolução multivariada de curvas por quadrados mínimos alternados (MCR-ALS) pode ser interpretada como uma extensão da lei de Lambert-Beer (Figura 2.5), onde os sinais analíticos (espectros) de uma mistura são relacionados com os espectros puros dos componentes presentes na amostra, ponderado pela suas respectivas concentrações relativas.

$$\mathbf{A} = \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{c} \mathbf{l} \quad \rightarrow \quad \mathbf{D}_{r,c} = \mathbf{C}_{r,c} \mathbf{S}^T + \mathbf{E}_{r,c} \quad (2.6)$$

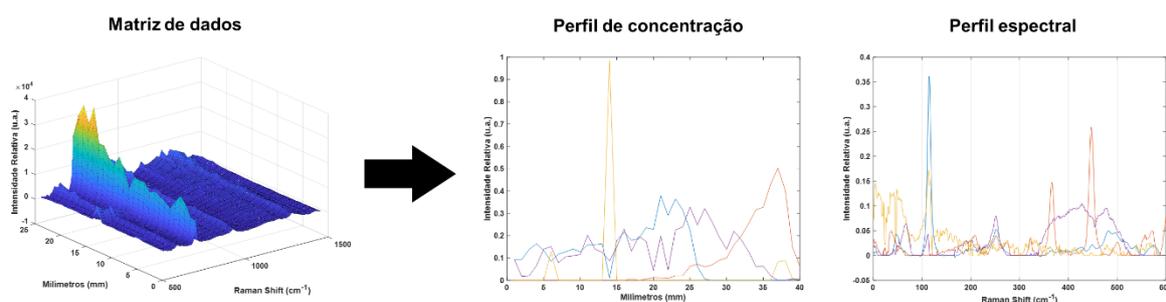


FIGURA 2. 5 – Representação esquemática do MCR-ALS

Através de métodos iterativos de regressão por quadrados mínimos alternados, é possível obter uma matriz relativa aos sinais analíticos, \mathbf{S} ($k \times c$), identificados para cada um dos k -componentes presentes na mistura, também chamada de perfil espectral. Também se obtém uma matriz correspondente às concentrações relativas dos componentes presentes na amostra, denominado perfil de concentrações, \mathbf{C} ($r \times k$), na qual os elementos r e c são as amostras (linhas) e as variáveis (colunas) presentes nos dados originais, respectivamente¹⁴⁸.

É importante ressaltar que o perfil de concentração gerado pelo MCR-ALS é referente a um perfil relativo de concentração. Os valores de concentração na matriz \mathbf{C} são dados em unidade relativa de cada espectro puro normalizado, diferente dos valores de concentração encontrados por métodos de calibração e quantificação. Além disso, se algum sinal de interesse for correlacionado com outro sinal analítico, por exemplo um único reagente gerando um único produto, o MCR-ALS pode não conseguir identificar as duas componentes de maneira simples, e o resultado obtido será um perfil espectral misto de ambos os compostos. Isso ocorre pela deficiência de posto da matriz, visto que o aparecimento de um produto é proporcional ao desaparecimento do outro.

O algoritmo de MCR-ALS, baseia-se em três etapas principais:

1. Determina-se o número de componentes presentes na mistura (o parâmetro k). Geralmente, utiliza-se ferramentas como a PCA para identificar a variabilidade dos dados e determinar a quantidade de componentes presentes na mistura, contornando problemas como a deficiência de posto. Também pode-se utilizar o

conhecimento prévio do sistema e indicar de forma direta o número de componentes.

2. Estima-se um valor para \mathbf{C} ou para \mathbf{S}^T . Nesta etapa, é necessário indicar para o modelo uma estimativa inicial para o cálculo, podendo ser a matriz de concentrações \mathbf{C} , ou a matriz espectral \mathbf{S}^T . A estimativa inicial pode ser informada a partir de conhecimento prévio, como por exemplo os espectros puros dos componentes presentes na amostra, ou a partir de algoritmos específicos. Os algoritmos mais utilizados para determinar a estimativa inicial são o SIMPLISMA (Análise de Misturas por Automodelagem Interativa Simples de Usar) que determina os espectros mais dissimilares presentes na amostra¹⁴⁹, e o EFA (Análise de Fatores Evolucionária) que estima os valores para o perfil de concentração \mathbf{C} a partir de análises de PCA por intervalos¹⁵⁰.
3. Como última etapa do algoritmo, realiza-se a otimização das matrizes \mathbf{C} e \mathbf{S}^T a partir de quadrados mínimos alternados¹⁵¹. Para \mathbf{S}^T como estimativa inicial, calcula-se a matriz \mathbf{C} a partir da seguinte relação $\mathbf{D} \mathbf{S}(\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1}$, sendo $\mathbf{S}(\mathbf{S}^T \mathbf{S})^{-1}$ a pseudo-inversa da matriz \mathbf{S}^T , também denominada \mathbf{S}^{T+} . Em seguida, calcula-se a nova matriz \mathbf{S} a partir da relação $\mathbf{S}^{T*} = (\mathbf{C}^{T*} \mathbf{C}^*)^{-1} \mathbf{C}^{T*} \mathbf{D}$, e a nova matriz \mathbf{D} , $\mathbf{D}^* = \mathbf{C}^* \mathbf{S}^{T*} + \mathbf{E}^*$. Nesta etapa, realiza-se um teste de convergência nos dados. E repete-se a otimização até o algoritmo alcançar um critério de parada.

Apesar do MCR-ALS possibilitar resolver problemas de deconvolução espectral sem o conhecimento prévio dos perfis (espectrais ou de concentração) dos componentes presentes no sistema, o resultado obtido pelo método está sujeito a problemas de ambiguidade¹⁵². Isto significa que os perfis espectrais, ou de concentração, recuperados pelo modelo não apresentam resposta única, e que dependendo da complexidade do sistema e das estimativas iniciais selecionadas para iniciar o algoritmo, os resultados podem ser afetados pelos problemas de rotação envolvidos em sistemas bilineares. Em termos matemáticos, o problema de rotação pode ser descrito reescrevendo-se a equação 2.6 na seguinte equação 2.7:

$$\mathbf{D} = (\mathbf{CT})(\mathbf{T}^{-1}\mathbf{S}^T) \quad (2.7)$$

Onde a matriz \mathbf{T} é denominada como uma matriz de transformação. Desta forma, podem ser encontradas diversas matrizes \mathbf{T} que satisfaçam a equação 2.6, sem necessariamente, encontrar os valores globais de \mathbf{C} e \mathbf{S}^T . Como forma de contornar este problema e aumentar a robustez da resposta, forçando o algoritmo a encontrar de maneira mais simples o ótimo global do modelo, utilizam-se restrições matemáticas durante a otimização do ALS. Estas restrições são condições matemáticas que provém de propriedades químicas conhecidas dos dados, e podem ser utilizadas em ambos os perfis (\mathbf{C} ou \mathbf{S}) dependendo do caso. As restrições mais utilizadas são:

- Não-negatividade – os valores obtidos pelos perfis resolvidos devem ser positivos. Esta restrição tem um significado químico muito grande, uma vez que não se espera encontrar valores de concentração negativa, e nem intensidades instrumentais, a não ser que estas tenham passado por algum tipo de pré-processamento, como por exemplo a primeira derivada.

- Fechamento ou *closure* – os valores obtidos pelos perfis resolvidos devem apresentar uma somatória de valores igual ao limite estabelecido, geralmente 1. Por exemplo, ao aplicar *closure* igual a 1 no perfil de concentração, a somatória dos valores individuais de cada componente recuperados por este perfil não pode passar de 1 para cada amostra. Este tipo de restrição é bastante aplicado em análises cinéticas, onde a concentração das componentes dos produtos somadas com as componentes dos reagentes deve ser constante.

- Unimodalidade – os valores obtidos pelos perfis apresentam apenas um único valor de máximo local por componente¹⁵³. Este tipo de restrição é bastante utilizado em dados de cromatografia, onde espera-se que cada composto pico cromatográfico apresenta apenas um valor de máximo, portanto com o uso da restrição de unimodalidade picos sobrepostos são mais facilmente deconvoluídos.

- Restrição de igualdade – alguns dos elementos em um perfil (ou em partes dele) são conhecidos e utiliza-se essa informação para restringir o modelo. Esta

restrição é comumente aplicada quando se sabe o perfil espectral de um ou mais componentes do sistema, ou quando se tem conhecimento prévio acerca de regiões da matriz de dados onde alguma das componentes tem valor próximo a zero.

2.4. Análise por Componentes Independentes (ICA)

Análise por Componentes Independentes (ICA) é um método de Separação Cega de Fontes (BSS). BSS é a separação de sinais ou “fontes” provenientes de um sistema, no qual os sinais que descrevem este sistema estão misturados, e não se tem conhecimento prévio sobre a origem deles, daí o termo separação cega¹⁵⁴. Na química, diversos sistemas apresentam este tipo de característica, como por exemplo, análises espectrais de amostras complexas. Normalmente, não se conhece os espectros puros (sinais) de cada espécie presente no meio, e conseqüentemente suas devidas concentrações. Uma resolução deste sistema BSS possibilitaria extrair os espectros puros e as concentrações das espécies presentes mesmo com uma mistura dos mesmos.

O ICA é o método mais usado dentro dos vários métodos existentes na literatura criados para resolver um sistema BSS. Ele baseia-se em recuperar dos dados originais (**X**) os sinais puros (**S**) a partir de uma mistura de sinais com proporções (**A**) desconhecidas, de acordo com a equação (2.8)¹⁵⁵.

$$\mathbf{X} = \mathbf{AS} \quad (2.8)$$

Assim como o PCA, o ICA é um método de decomposição da matriz de dados originais (descrita na equação por **X**) em duas novas matrizes: a matriz com os sinais (**S**), equivalente aos loadings do PCA; e a matriz de proporções (**A**), que se assemelha a matriz de escores do PCA. Entretanto, diferente do PCA, o ICA não apresenta uma matriz de erros (**E**), portanto muitas das componentes independentes recuperadas pelo modelo podem conter apenas ruído.

A maior diferença entre o PCA e o ICA é que o último realiza a decomposição matricial dos dados originais assumindo que os sinais provenientes

de \mathbf{X} são estatisticamente independentes, ou seja, a variação de uma variável não tem influência na variação das demais¹⁵⁶. Para a maioria dos casos, essa suposição é verdadeira, porém mesmo quando essa suposição não é alcançada o ICA apresenta resultados bastante satisfatórios¹⁵⁷.

Essa independência estatística é checada a partir do Teorema do Limite Central. A Figura 2.6 apresenta um conjunto de dados simulados com sinais puros independentes. Um sinal puro do sistema (componente independente) apresenta uma estrutura bem definida, e sua distribuição de intensidade apresenta um histograma diferente de uma gaussiana, como apresentado na Figura 2.6a. Porém, de acordo com o Teorema do Limite Central, a soma de diversos sinais (mesmo independentes) tendem a uma distribuição gaussiana (Figura 2.6 b)¹⁵⁸.

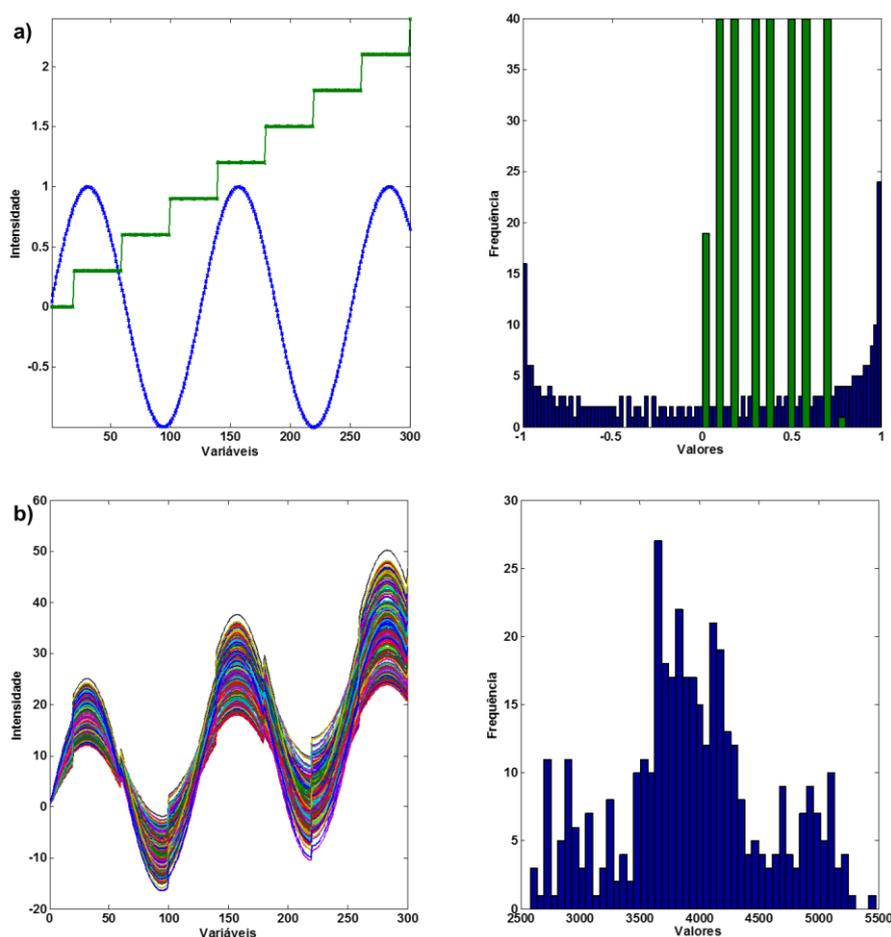


FIGURA 2.6 – Representação esquemática de dados simulados e seus histogramas de distribuição: a) sinais puros e b) misturas de sinais com diferentes proporções

Os sinais originais apresentam uma distribuição não-gaussiana. Porém seu somatório com proporções aleatórias gera sinais com distribuições gaussianas (teorema do limite central). O ICA realiza uma busca por fontes de sinais que apresentam a menor gaussianidade possível (mais independentes) e otimiza os sinais encontrados maximizando sua não-gaussianidade¹⁵⁹.

Desta forma, os sinais recuperados pelo ICA apresentam um significado químico mais interpretável do que os loadings do PCA. Enquanto os loadings do PCA apresentam as variáveis no sentido da maior variabilidade dos dados, os sinais recuperados pelo ICA (na maioria dos casos) são sinais puros das componentes que variam no conjunto de dados¹⁶⁰. A Figura 2.7 apresenta uma representação esquemática das componentes principais (PCs) e componentes independentes (ICs) recuperadas para um conjunto de dados simulados que apresentam variáveis independentes.

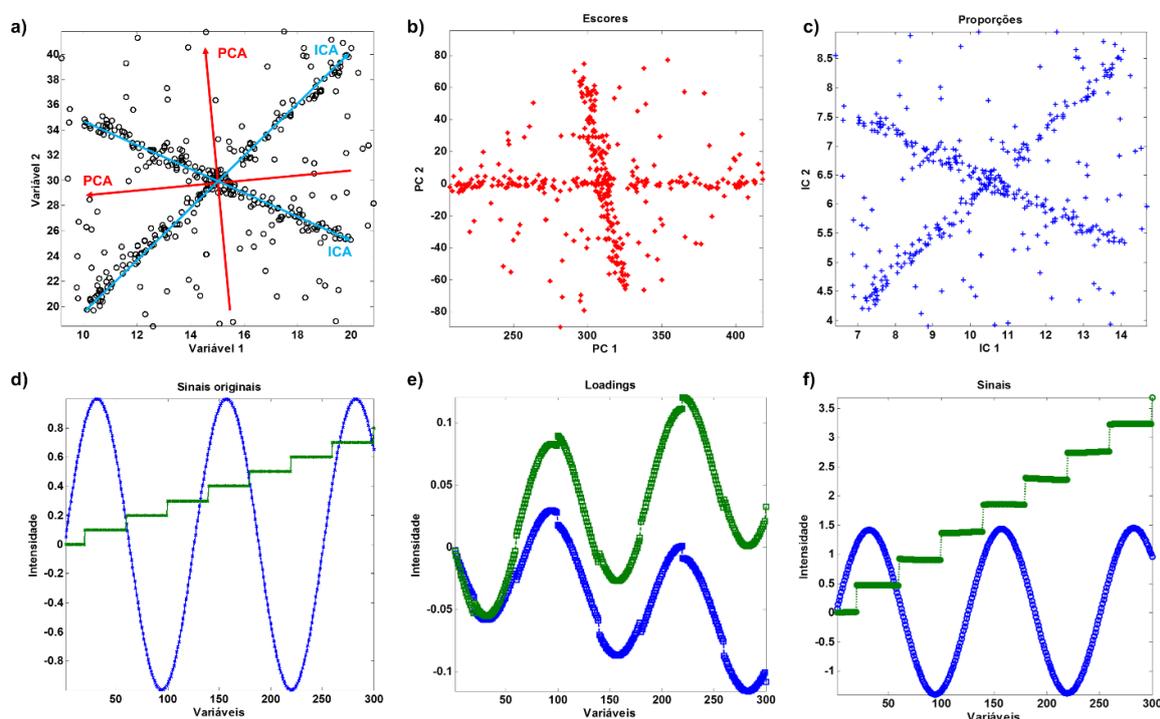


FIGURA 2.7 – Representação esquemática do tratamento de dados simulados por PCA e ICA: a) dispersão dos dados originais, b) escores recuperados por PCA, c) proporções recuperadas por ICA, d) sinais originais, e) loadings recuperados por PCA e f) sinais recuperados por ICA

De forma geral, o PCA busca o sentido de maior variabilidade dos dados amostrais, e as componentes principais subsequentes são formadas de maneira ortogonal, sempre buscando a maior variabilidade dos dados. Desta forma, seus escores são projetados no sentido da maior variância dos dados¹⁶¹. Por isso, quando o conjunto de dados (Figura 2.7 a) tem como base variáveis independentes, pode-se observar que o PCA não identifica de maneira correta a dispersão dos dados (Figura 2.7 b). A variância amostral não é significativa para identificar o sentido correto de dispersão dos dados, e o obtido por PCA é uma mistura de ambos os processos, tanto nos escores, quanto nos loadings (Figura 2.7 e).

Entretanto o ICA tenta recuperar os sinais originais utilizando o critério de independência estatística entre as fontes. Assim o ICA consegue obter sinais originários de variáveis independentes de maneira muito mais precisa, como observado nos sinais originais (Figura 2.7 d) e os sinais recuperados por ICA (Figura 2.7 f). Além disso, como o ICA não tem restrição de ortogonalidade é possível identificar de maneira mais correta o sentido de separação das amostras a partir de sua dispersão (Figura 2.7 c).

Para alcançar a independência estatística, existem diversas maneiras de se calcular a não-gaussianidade entre as componentes, como por exemplo a curtose e a negentropia¹⁶². Portanto diferentes algoritmos para calcular o ICA foram desenvolvidos baseando-se no cálculo da não-gaussianidade, dentre eles pode se citar: o FastICA¹⁶³, Kernel-ICA¹⁶⁴, MILCA¹⁶⁵ e JADE¹⁶⁶. Alguns trabalhos na literatura comparam os diferentes algoritmos de forma a identificar o melhor método para realizar ICA¹⁶⁷⁻¹⁷⁰, mas os resultados podem variar bastante dependendo do sistema analisado e das condições utilizadas.

Dos métodos mais utilizados, o algoritmo de Diagonalização Conjunta Aproximada de Automatrizes (JADE) utiliza o cálculo de diagonalização de matrizes, que é uma computação matricial de ordem superior (4ª ordem). Isso resulta em uma vantagem frente aos demais métodos ao solucionar de maneira

mais prática problemas de convergência causados pela escolha incorreta das condições iniciais, se tornando desta forma um algoritmo mais robusto¹⁷¹. Por outro lado, os cálculos gerados apresentam uma matemática bastante complexa, principalmente no ramo da estatística superior¹⁵⁹.

Um dos maiores problemas do ICA é na escolha da quantidade de componentes independentes. Diferente do PCA, o ICA gera resultados diferentes dependendo do número de ICs escolhidas. Além disso, não se tem uma ordem de importância nas ICs recuperadas. No PCA, as PCs são ordenadas por variância explicada, enquanto, no ICA, pode-se obter um sistema onde as três primeiras ICs apresentam ruído experimental e os sinais puros significativos estão contidos nas três últimas ICs por exemplo.

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para se determinar o número ótimo de componentes independentes para a matriz de dados. Um método que tem apresentado resultados bastante satisfatórios para a escolha de ICs é o ICA por blocos¹⁷². Esse método se assemelha a validação cruzada utilizada no PLS, com a diferença que ao invés de se calcular o erro da validação, calcula-se a correlação entre os sinais.

Para a realização do método, é preciso selecionar em quantas partes irá se separar a matriz de dados (n), e o número máximo de ICs (A_{\max}) (é importante que o número máximo de ICs seja maior que o número ótimo de ICs). Dessa forma, o algoritmo separa a matriz de dados em n blocos, e realiza o ICA com 1 até o número máximo de ICs (A_{\max}). Em seguida, calcula-se a correlação entre os sinais obtidos para cada bloco e para cada IC. ICs que apresentam sinais significativos devem ser altamente correlacionadas entre todos os blocos, e ICs que apresentam apenas o ruído experimental entre os blocos devem ter correlação próximo a zero.

Ao final, obtêm-se uma matriz de correlação entre os n blocos e as A_{\max} ICs. Ao organizar a matriz de forma decrescente, é possível observar o número máximo de ICs que apresenta uma alta correlação (próximo a 1), sendo esse o

número ótimo de ICs. De forma a contornar problemas de subamostragem, este procedimento pode ser realizado diversas vezes de forma a se obter diferentes blocos em cada cálculo, e assim obter uma medida mais robusta no número ótimo de ICs¹⁷³.

Outro método utilizado para identificar o número de ICs é pelo critério Durbin-Watson¹⁷². O critério Durbin-Watson é um parâmetro estatístico originalmente desenvolvido para detectar autocorrelação em matrizes residuais de uma análise de regressão¹⁷⁴, e tem sido aplicado na quimiometria para se obter relações sinal/ruído de dados multivariados possibilitando estimar o número de variáveis latentes ou componentes em diversos métodos quimiométricos¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

No ICA, o critério Durbin-Watson ocorre da seguinte maneira: calcula-se diferentes modelos de ICA, com diferentes valores de ICs (1, 2, 3 ... n). Então, para cada modelo ICA, reconstrói-se a matriz de dados originais (\mathbf{X}_{rec}) a partir dos sinais recuperados (\mathbf{S}) e as respectivas proporções (\mathbf{A}). Com a diferença entre a matriz de dados originais (\mathbf{X}) e a matriz reconstruída (\mathbf{X}_{rec}), obtêm-se o valor de resíduo (e_i) para cada IC em cada modelo ICA. O critério Durbin-Watson é calculado a partir do somatório da diferença entre duas IC subsequentes, normalizada pelo resíduo quadrático de todas as ICs, seguindo a equação (2.9).

$$DW = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad (2.9)$$

O valor DW tende a zero quando nenhum ruído é detectado no sinal, e tende a 2 quando o sinal recuperado é relacionado apenas com ruído. O número de ICs é escolhido levando em consideração a maior quantidade de ICs que apresenta um valor de DW próximo a zero.

2.5. Rotinas utilizadas

Para realização das análises do PCA, foi utilizada a rotina SVD do software MATLAB 2011a. As análises por MCR-ALS foram realizadas utilizando a rotina ALS do toolbox MCR_ALS¹⁷⁸ disponibilizado pela universidade de Barcelona

pelo Prof. Romà Tauler. As análises por ICA foram obtidas a partir do algoritmo JADE, disponibilizado pelo AgroParisTech pelo Prof. Douglas Rutledge. As análises de ANOVA-PCA foram realizadas utilizando uma rotina escrita pelo próprio autor. Todo o tratamento quimiométrico utilizado foi feito usando o ambiente MATLAB 2011a.

**CAPÍTULO 3 – ANÁLISE DE FINGERPRINTS DE
CERVEJAS DO TIPO PILSNER**

3. ANÁLISE DE FINGERPRINTS DE CERVEJAS DO TIPO PILSNER

3.1. Introdução e objetivos

A cerveja é uma das bebidas de maior consumo no mundo (somente atrás da água e do chá) sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial de cerveja^{98,99}. No Brasil, diversas marcas de cervejas estão disponíveis para consumo, e a avaliação e monitoramento destes produtos é extremamente necessária¹⁰⁰. No entanto, a análise individual de todos ou da maioria dos compostos presentes na amostra gera um gasto desnecessário para a indústria. Como alternativa, pode-se utilizar o *fingerprint* amostral, onde cada amostra analisada é representada por um conjunto de dados (geralmente, um espectro ou um cromatograma) e sua classificação é obtida por meio de uma análise de agrupamento¹⁰¹.

No caso da cerveja, diversas técnicas analíticas foram aplicadas para gerar *fingerprints*. Entretanto, poucos trabalhos utilizaram a espectroscopia Raman como método de se obter *fingerprints* de cerveja¹⁷⁹. A cerveja *Pilsner* é composta de aproximadamente 93 % de água e 3 – 5 % de álcool. Os produtos que podem caracterizar e avaliar a qualidade da cerveja são compostos minoritários, que se apresentam em baixas concentrações¹⁰². Desta forma, o uso da SERS torna-se um método de análise mais viável que a Raman convencional, uma vez que esta amplifica o sinal Raman diminuindo o seu limite de detecção.

Desta forma, propõe-se de forma inédita a utilização do SERS-CCD para gerar *fingerprints* espectrais e cromatográficos de identificação e classificação de 10 marcas de cerveja do tipo *Pilsner* fabricadas no Brasil. Como tratamento dos dados, comparou-se o MCR e o ICA como métodos de separação de sinais de forma a obter os perfis cromatográficos para cada componente e atribuir a classificação das marcas de cerveja a partir de seus cromatogramas.

3.2. Parte Experimental

3.2.1. Materiais

Para a síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs), foram utilizados ácido cloroáurico (HAuCl_4) (Sigma Aldrich, 99,999%) e citrato trissódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (J. T. Baker, 99,0%). Ambas as soluções HAuCl_4 ($1,4 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) e $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($3,9 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) foram preparadas a temperatura ambiente em água ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$). A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em placas de alumínio contendo $200 \mu\text{m}$ de espessura de sílica gel-60 e indicador fluorescente para 254 nm, da Sigma-Aldrich. Todos os solventes de eluição (hexano, acetona, etanol, metanol e acetona) foram obtidos da Quemis e apresentavam grau de pureza analítica (PA).

3.2.2. Amostras

Selecionou-se as 10 marcas de cerveja mais consumidas no Brasil, todas do tipo pilsener. Para cada marca utilizou-se 5 amostras proveniente de diferentes lotes e/ou diferentes locais de produção, com exceção da Marca 3, que é a cerveja mais consumida na região do interior de São Paulo, e devido a esse fator preferiu-se analisar 10 amostras. A Tabela 3.1 apresenta uma descrição detalhada de todas as 55 amostras e os respectivos locais de produção. É importante ressaltar que algumas cervejarias podem produzir mais de um tipo de marca de cerveja, e por essa razão alguns locais apresentam diferentes marcas (mas elas utilizam diferentes processos e controles de qualidade para as marcas diferentes). Todas as amostras foram compradas em supermercados localizados na cidade de São Carlos, SP - Brasil. A Figura 3.1 apresenta um mapa do Brasil, e os locais de produção das amostras de cerveja analisada.

TABELA 3.1 – Descrição das amostras utilizadas de acordo com a marca e o local de produção

Código	Local de produção*
Marca 1	2 JC, 3 JA
Marca 2	5 PT
Marca 3	2 JC, 3 JA, 3 AG, 2 NM
Marca 4	5 JC
Marca 5	5 IT
Marca 6	5 JA
Marca 7	5 IT
Marca 8	5 PT
Marca 9	5 IT
Marca 10	2 JC, 2 JA, 1 NM

* JC = Jacareí, JA = Jaguariúna, PT = Petrópolis, AG = Agudos, NM = Sete Lagoas, IT = Itu.

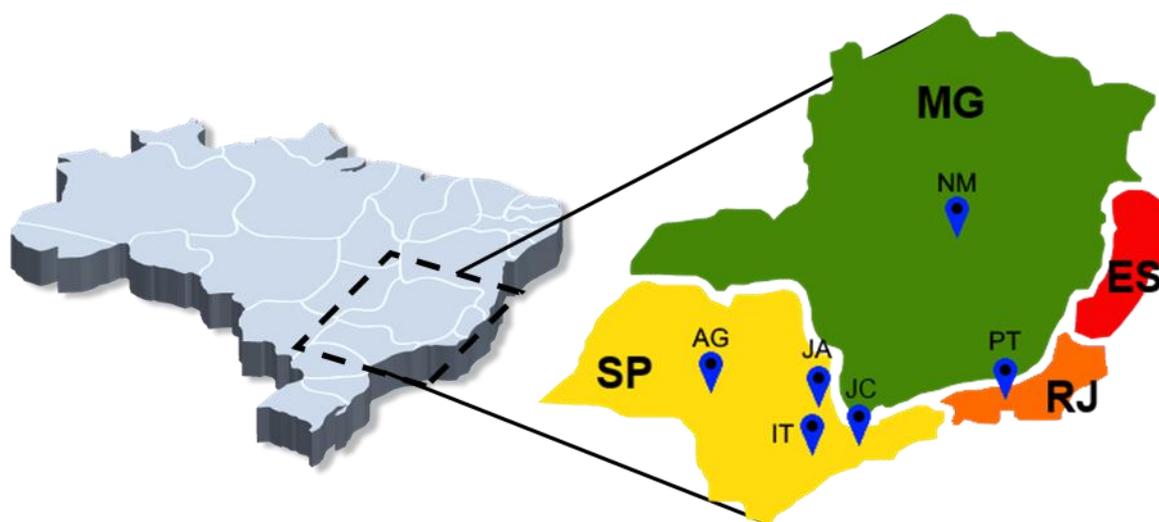


FIGURA 3.1 – Mapa do Brasil com os locais de produção para as cervejas analisadas: Sete Lagoas (NM), Petrópolis (PT), Jacareí (JC), Itú (IT), Jaguariúna (JA) e Agudos (AG)

3.2.3. Síntese e caracterização das AuNPs

A reação para formação das AuNPs foi feita seguindo a método de Lee-Meisel¹⁸⁰. Para tal, adicionou-se 48 mg de HAuCl_4 em 100 mL de H_2O ultrapura. A solução é aquecida até 85 °C. Nesta temperatura, adicionou-se 10 mL de uma solução aquosa 1,0 % (m/m) de citrato trissódico. A reação finaliza quando a solução passa de uma coloração azul-escuro para vinho (aproximadamente 4 minutos). Nesta etapa, retirou-se a síntese do aquecimento e a colocou em um banho de gelo. A Figura 3.2 apresenta um esquema do procedimento experimental utilizado. As nanopartículas de ouro foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em um TEM-MS (JEOL 2100) operando a uma voltagem de aceleração de 200 kV. Realizou-se a contagem de 360 partículas em duas diferentes direções (uma vez que as nanopartículas formadas apresentavam formato elíptico), sendo utilizado a média das duas medidas como o tamanho da partícula.

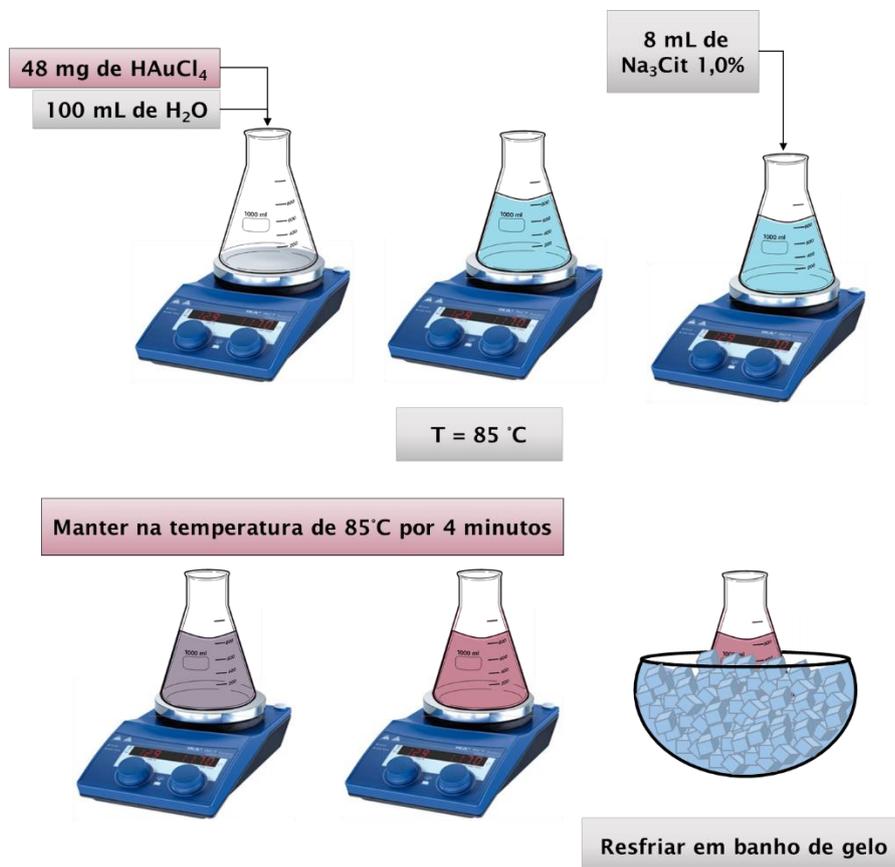


FIGURA 3.2 – Representação esquemática da síntese das AuNPs

3.2.4. Fabricação do Spray

Para adquirir espectros SERS de maneira reprodutível é de extrema importância uma dispersão homogênea das nanopartículas na placa de CCD por toda a linha de separação. Para dispersar de maneira eficiente a solução coloidal na placa de CCD, foi desenvolvido um dispersor portátil e de baixo custo baseado no sistema desenvolvido por Schwab et. al.¹⁸¹. A Figura 3.3 apresenta o esquema do aparato. Uma conexão cateter de 2 vias funciona como um conector-T, onde uma das pontas do conector é ligado a uma lata de ar comprimido Sprayduster (AF International Co.). No aparato original descrito pelos autores, é utilizado uma coluna capilar de cromatografia gasosa e uma agulha de seringa na ponta do conector de forma a gerar uma dispersão mais pontual que é injetada em um espectrômetro de massas. Neste dispositivo modificado, foi utilizado um tubo de silicone (d.e. 2,4 mm, d.i. 0,8 mm) que fica em contato com um recipiente contendo aproximadamente 150 μL da solução coloidal de nanopartículas. Ao final do conector-T, foi adicionado uma ponteira de micropipeta de 200 μL , com a ponta do tubo de silicone localizado alguns milímetros antes da extremidade final da ponteira, de forma a gerar um bombeamento da solução coloidal através do efeito Venturi. Este tipo de aparato possibilita uma dispersão homogênea das nanopartículas a partir de um conjunto de microgotas da solução coloidal sobre a superfície da placa cromatográfica.

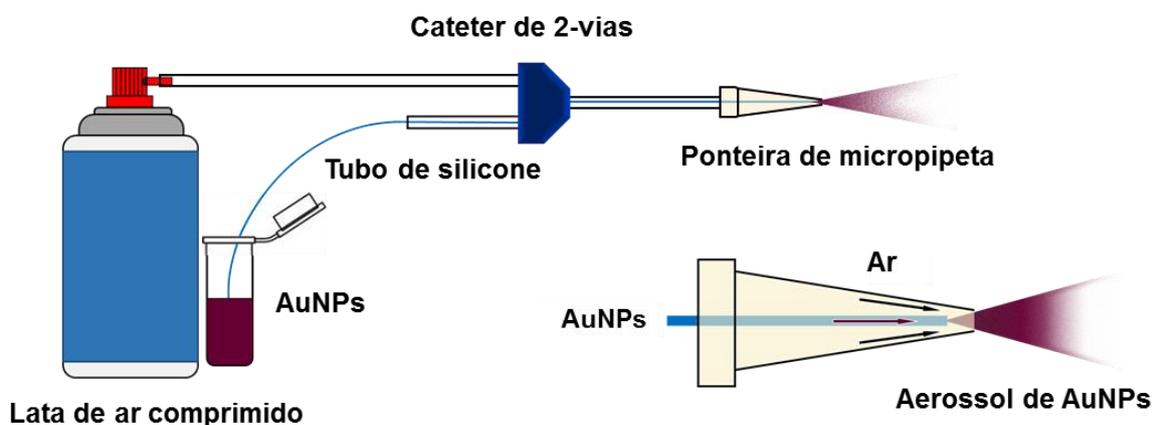


FIGURA 3.3 – Esquema do aparato utilizado para a dispersão das nanopartículas

3.2.5. Separação por CCD

O pH das amostras de cerveja foi ajustado com o intuito de otimizar as condições de análise. Para isso, utilizou-se soluções de HCl e NaOH para ajustar os pHs das amostras para pH 2, pH 7 e pH 13. Também se avaliou uma solução sem alteração no pH (~pH 4). O pH das amostras de cerveja foram alterados adicionando-se 400 μL de uma solução de HCl $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 600 μL de H_2O deionizada à 5 mL de cerveja para pH ácido, ou 600 μL de uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e 400 μL de H_2O deionizada para pH neutro, e 1000 μL de uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para pH básico. Aproximadamente 2 μL de cada amostra foram aplicadas em uma placa de CCD de 2,5 cm de largura x 5 cm de comprimento. As amostras foram aplicadas a 0,7 cm do começo da placa cromatográfica, e a eluição foi realizada até o solvente alcançar uma altura aproximada de 4,5 cm, resultando em uma altura percorrida de 3,8 cm. Após a seleção de diferentes solventes, escolheu-se etanol (PA) como fase móvel. A avaliação inicial da separação cromatográfica foi realizada com uma lâmpada UV de 254 nm.

Após a separação das amostras, as placas foram secas ao ar e, em seguida dispersou-se a solução coloidal de ouro utilizando o dispositivo descrito na seção 3.2.4. Este dispositivo possibilitou a formação de uma camada uniforme na superfície da placa de CCD cobrindo toda a área analisada de maneira homogênea.

Para avaliar a homogeneidade das AuNPs nas placas de CCD, realizou-se uma microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando-se duas abordagens para adicionar AuNPs sobre a superfície da placa. A primeira foi o método mais empregado na literatura^{85,86,182-184}, onde a solução coloidal é gotejada sobre a superfície na região da banda cromatográfica requerida; e a segunda foi dispersando de forma homogênea a solução por toda a placa cromatográfica com o dispositivo confeccionado no laboratório. As imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico Philips XL-30 FEG, com detecção por elétrons

secundários à 25.0 kV e aumento de 2000x para imagem de 10 μm , 10000x para 2 μm e 20000x para 1 μm .

3.2.6. Análise SERS

Para as medidas SERS, foi utilizado um equipamento portátil *i*-Raman BWS 415-785H (B&W Tek, Newark, DE) com laser vermelho de 785 nm e resolução espectral de 3,5 cm^{-1} acoplado a um microscópio óptico BAC 151A com lente objetiva de 20x, um ponto focal de 105 μm , uma potência de laser de 63 mW e tempo de aquisição de cada espectro de 60 segundos. A placa de CCD foi varrida em linha reta do ponto de aplicação da amostra até a frente do solvente, com intervalos de 1 mm, resultando em 38 espectros por corrida. Os espectros foram obtidos de 428 cm^{-1} até 1543 cm^{-1} . Cada placa de CCD apresentava uma única amostra em triplicata. Os resultados obtidos geram uma matriz de dados ($i \times j$) para cada replicata de cada amostra, onde i representa o número de espectros Raman obtidos em diferentes distâncias do ponto inicial da placa, i. e., o perfil de eluição da amostra (dimensão cromatográfica); e j é o espectro SERS obtido em um único local de eluição da placa, contendo o Raman Shift (cm^{-1}). Ao final das medidas, cada amostra resulta em um cromatograma-SERS (Figura 3.4-a)

3.2.7. Tratamento quimiométrico

Primeiramente realizou-se, individualmente, o ajuste da linha de base para cada espectro adquirido com o intuito de remover a influência de flutuações na linha de base durante a análise exploratória. Para isso, foi utilizado a correção da linha de base por quadrados mínimos ponderados, resolvendo a linha de base para uma função polinomial de segunda-ordem. Em seguida, a média das 3 replicatas foram obtidas gerando uma única matriz ($i \times j$) por amostra (para atribuir uma maior robustez ao método). Também foi aplicada a primeira derivada e a normalização dos espectros pela área. A primeira derivada possibilita uma melhor discriminação de picos próximos e a normalização foi utilizada para atribuir a mesma importância para cada amostra. Os dados foram então organizados em um tensor X ($n \times i \times j$), de tal forma que tinha-se 38 pontos de distância (i), 700 valores

de Raman Shift (j) e 55 amostras (n) (Figura 3.4-b). Para os tratamentos quimiométricos, o tensor foi desdobrado no sentido das colunas onde obteve-se uma matriz de dados de 2090 linhas x 700 colunas (Figura 3.4-c).

Duas abordagens quimiométricas foram utilizadas no conjunto de dados: 1) utilizou-se o MCR-ALS para decompor os perfis de concentração (perfil cromatográfico) e os perfis espectrais (espectro SERS) de cada componente presente na amostra. A área cromatográfica de cada componente recuperado pelo modelo foi organizada na forma de uma matriz e em seguida aplicou-se o PCA para realizar uma análise exploratória dos dados de forma a mostrar a distribuição das cervejas analisadas; 2) realizou-se o mesmo procedimento relatado acima, porém utilizando o ICA como alternativa para separar os perfis cromatográficos (proporções) e os espectros SERS (sinais).

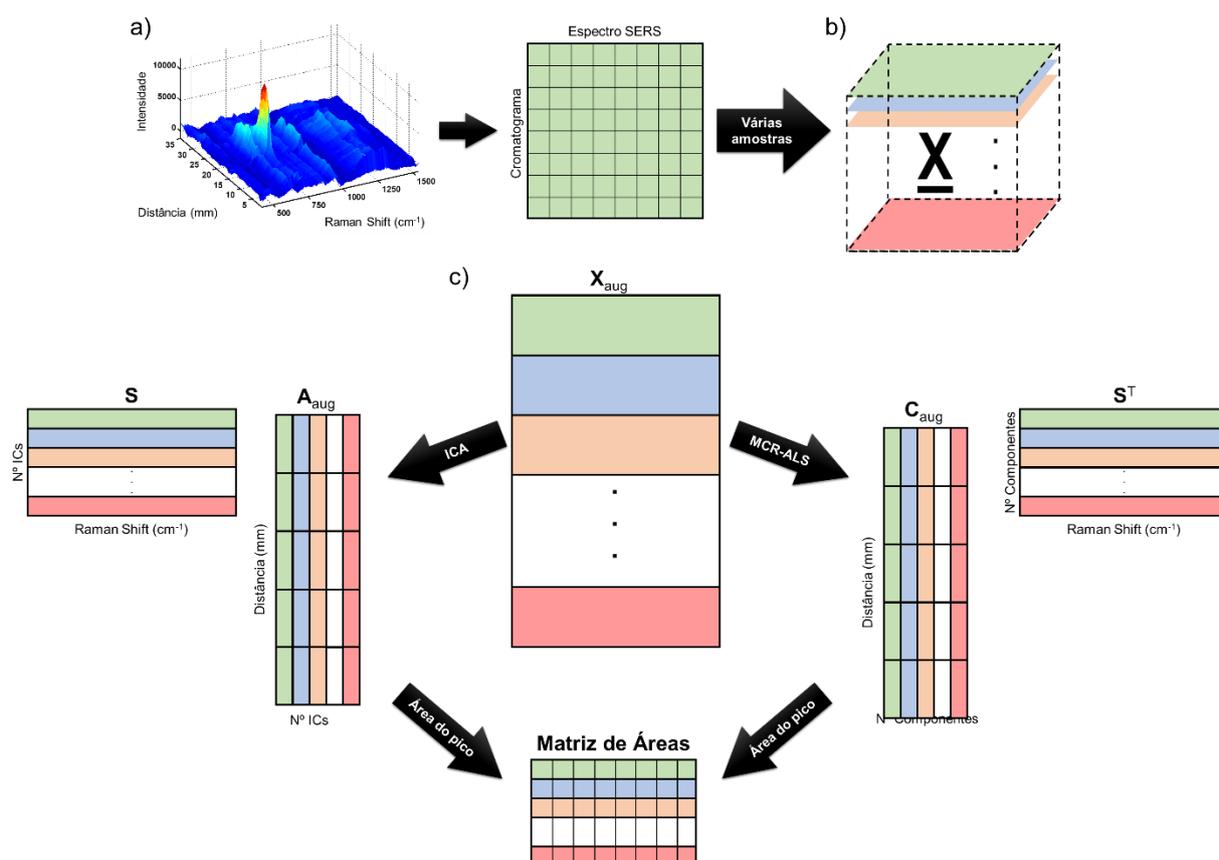


FIGURA 3.4 – Representação esquemática do tratamento quimiométrico: a) dados SERS- CCD; b) Tensor de dados contendo todas as amostras; c) Matriz aumentada e representação do tratamento utilizando MCR-ALS e ICA

Para o MCR-ALS, utilizou-se 7 componentes e como estimativa inicial o resultado obtido a partir da rotina PURE (contido no toolbox MCR-GUI 2.0), tendo como restrições apenas a não-negatividade na concentração. Os sinais e proporções recuperados pelo ICA foram obtidos para aquisição de 10 ICs, sendo que o número de ICs foi estimado utilizando o critério de Durbin-Watson.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Caracterização da AuNPs e do substrato para SERS-CCD

As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas por MET. A Figura 3.5 apresenta uma imagem das nanopartículas de ouro (Figura 3.5-a) e o histograma de frequência (Figura 3.5-b) do tamanho das nanopartículas (número de partículas contadas = 360). Pela imagem, é possível observar que as partículas apresentam uma morfologia elíptica, porém com aglomeração das mesmas. O histograma de frequências mostra uma distribuição do tipo lognormal, característica de distribuição de nanopartículas¹⁸⁵, com um tamanho de partícula médio de $22,4 \pm 6,4$ nm.

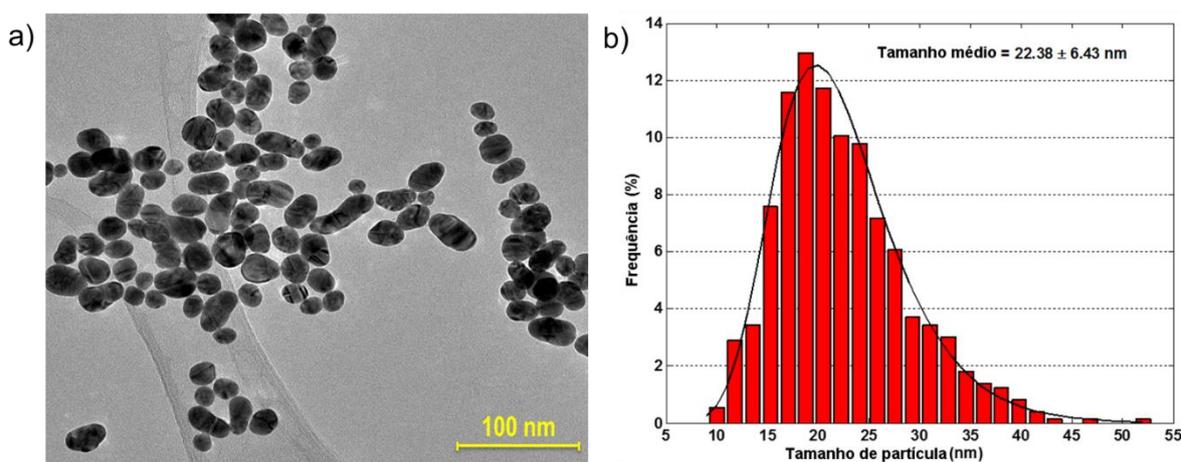


FIGURA 3.5 – Caracterização das AuNPs por MET: a) imagem de MET e b) histograma de frequência do tamanho de partícula com o tamanho médio e o desvio padrão

Pelas micrografias de MEV, foram avaliadas a placa de CCD preparada de duas formas: gotejando-se uma gota de AuNPs, e pulverizando as AuNPs utilizando o aparato desenvolvido. Esta análise tinha como objetivo avaliar a homogeneidade das nanopartículas. A Figura 3.6 apresenta as micrografias obtidas para cada placa de CCD analisada, onde os pontos mais claros são as nanopartículas de ouro sobre o fundo escuro referente a sílica da placa cromatográfica.

Ao gotejar a nanopartícula sobre a placa cromatográfica (Figura 3.6-a-c), há uma dispersão heterogênea das nanopartículas, onde em alguns pontos da placa há uma alta concentração de nanopartículas (chegando inclusive a encontrar aglomerados de ouro) e pontos onde nenhuma nanopartícula é encontrada. A falta de homogeneidade implica uma baixa reprodutibilidade das medidas SERS, uma vez que a concentração de nanopartículas varia significativamente em diferentes posições da placa. Além disso, grandes aglomerados de AuNPs podem reduzir a eficiência do efeito SERS.

Ao pulverizar a solução na placa de CCD, percebe-se que as nanopartículas localizavam-se nos interstícios da sílica e com pouca ou nenhuma aglomeração. Essa característica foi observada em toda a placa cromatográfica, exemplificado na Figura 3.6-d-e, onde a maior quantidade de AuNPs é encontrada nos interstícios mais profundos da sílica (Figura 3.6-e). Isto ocorreu devido ao solvente da solução coloidal que consegue arrastar as nanopartículas para regiões mais profundas da placa por capilaridade. Provavelmente, este efeito também ocorre ao gotejar a solução, entretanto, devido ao excesso de AuNPs em uma pequena região da placa de CCD, é possível detectar apenas as AuNPs na superfície do suporte.

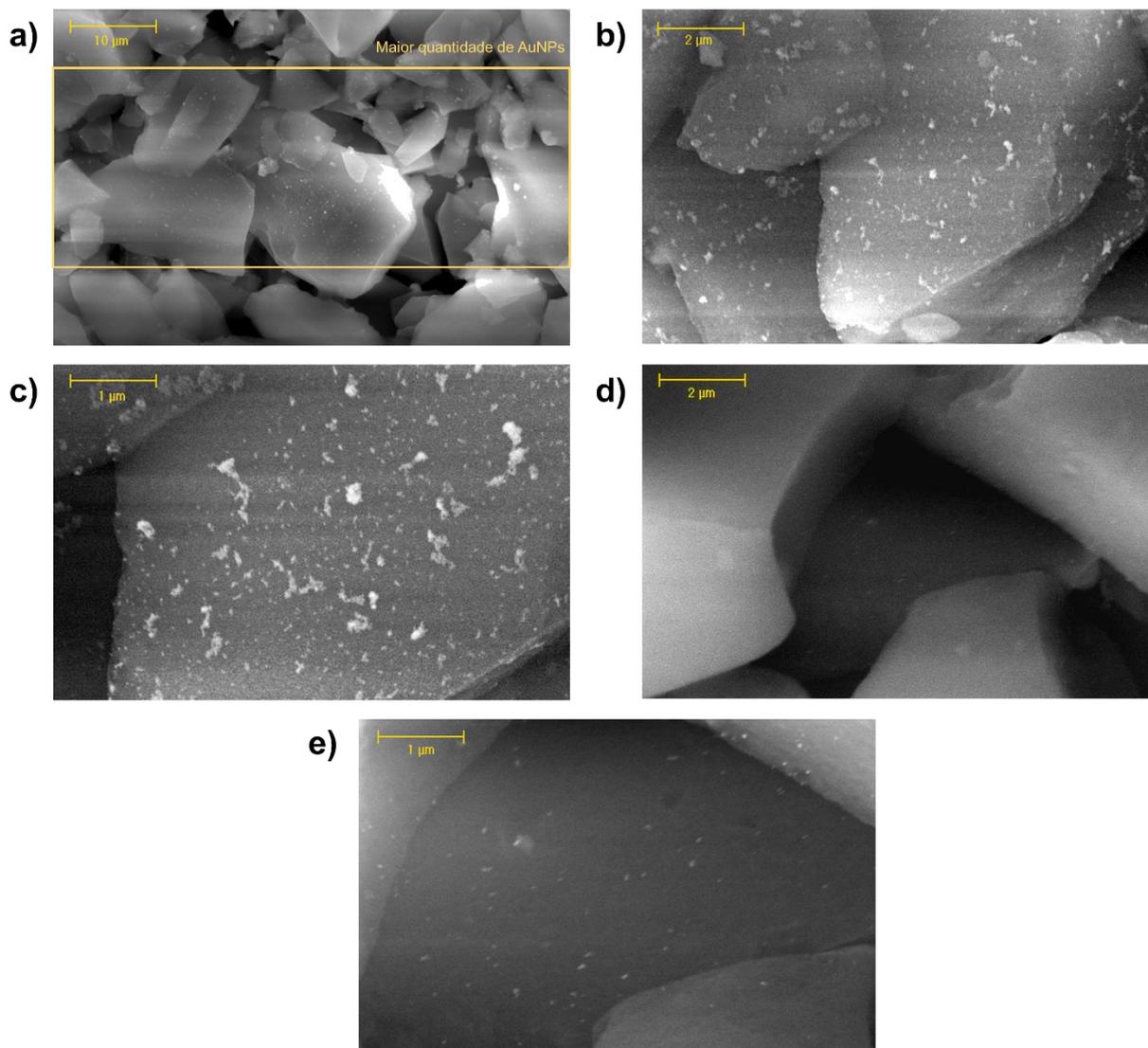


FIGURA 3.6 – Microscopia eletrônica de varredura da placa cromatográfica: a – c) pingando a solução de Au NPs; d – e) pulverizando a solução de Au NPs

3.3.2. Otimização das condições de análise SERS-CCD

Após a caracterização da placa de CCD estudou-se as melhores condições para as análises por SERS. Para tal, avaliou-se o melhor solvente de eluição das amostras e o pH da solução. Quatro marcas distintas de cerveja foram empregadas no estudo do solvente (Marca1, Marca2, Marca3 e Marca4), e 5 tipos de solventes com diferentes polaridades: hexano, acetona, etanol, metanol e acetona. Para cada experimento, aproximadamente 2 μL de cada amostra foram adicionadas em uma placa de CCD e avaliadas utilizando uma lâmpada UV de 254 nm. Em seguida,

misturas entre os melhores solventes foram realizadas com o intuito de obter uma condição ótima para separação dos solventes. A Figura 3.7 apresenta as imagens das placas cromatográficas reveladas sob a luz UV para a separação utilizando solventes puros e para a melhor mistura entre solventes.

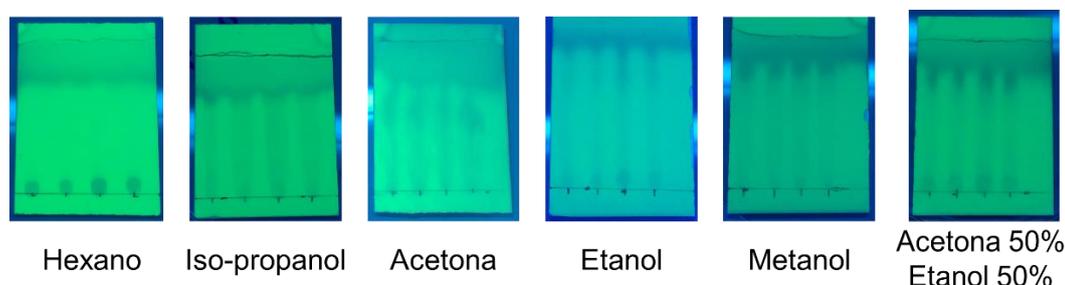


FIGURA 3.7 – Placas de CCD para 4 marcas de cerveja reveladas por luz UV_{254nm} utilizando diferentes solventes

É possível observar que o hexano não conseguiu separar nenhum composto na placa. Os solventes isopropanol e metanol eluíram uma grande quantidade de compostos, obtendo apenas uma separação parcial, principalmente na parte final da placa. A acetona teve um bom arraste ao longo da placa, observando-se três grandes regiões de separação em: 0 cm, 1,9 cm e 3,1 cm. Entretanto, as bandas cromatográficas não mostraram eficiência, sendo essas alargadas. O etanol também apresentou três pontos de separação em: 0 cm, 2,7 cm e 3,4 cm, porém com pontos bandas mais intensas no final da corrida, ou seja, uma parte dos compostos eluíram completamente, concentrando-se no final da placa.

Realizou-se diversas misturas com os dois solventes que se mostraram mais aptos a garantir uma separação eficiente das amostras sendo estes, acetona e etanol. Dentre as diversas composições de misturas, aquela que se mostrou mais eficiente foi a composição acetona:etanol (50:50 v/v). Porém, essa fase móvel não possibilitou uma separação eficiente dos compostos de interesse, sendo escolhido o uso de etanol puro.

Portanto foi avaliado a eficiência do etanol como fase móvel por SERS-CCD. Para isso, uma cerveja da marca 3 foi adicionada em uma placa de CCD,

utilizando etanol como fase móvel. Em seguida, dispersou-se as nanopartículas de ouro por toda a placa cromatográfica e avaliou-se os resultados de forma a obter a melhor separação das amostras. A Figura 3.8 apresenta o cromatograma-SERS da amostra separada por etanol. É possível observar que a placa submetida a separação com etanol puro apresenta bandas cromatográficas resolvidas. Assim, selecionou-se como fase móvel o etanol para utilizar o SERS como forma de detecção.

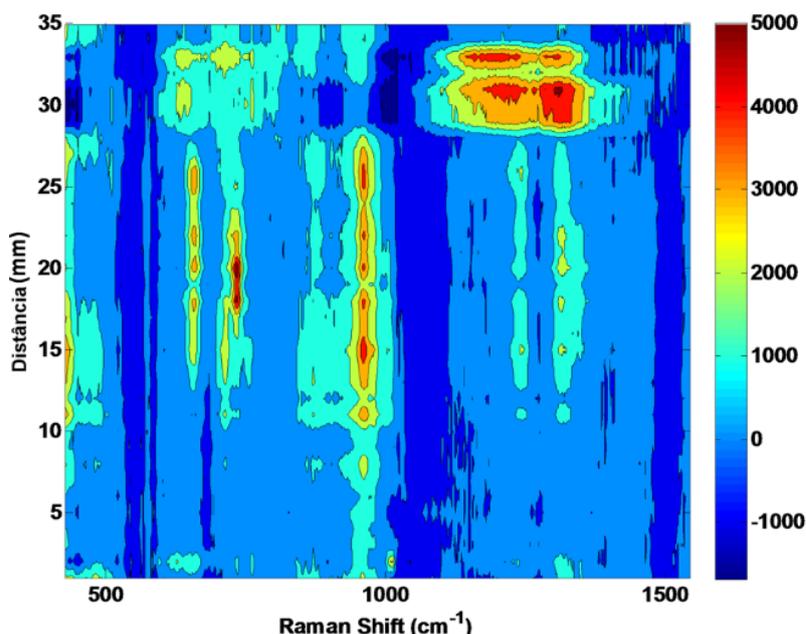


FIGURA 3.8 – SERS-CCD da amostra de cerveja separada por etanol

Com as condições de separação estabelecidas, realizou-se um estudo para otimizar o pH da solução da amostra de modo a aumentar a intensidade do sinal SERS. Foram feitas análises na placa cromatográfica em 4 diferentes pHs para uma única amostra. Selecionou-se um pH ácido (pH 2), um básico (pH 13), um neutro (pH 7) e uma amostra sem alteração do pH (pH 4).

A Figura 3.9 apresenta os espectros SERS em cinco diferentes regiões da placa cromatográfica (na distância de 8, 14, 17, 20 e 24 mm), na qual pode-se observar que apenas um dos pontos obtidos (17 mm – Figura 3.9-c), no pH original da amostra se mostrou mais intenso do que os demais. Nos outros pontos da placa de CCD, os espectros obtidos em pH ácido se mostraram com intensidade igual ou maior quando comparado aos outros valores de pH. Assim, escolheu-se

trabalhar com as amostras em pH ácido (pH=2), e as amostras analisadas a seguir foram preparadas adicionando-se 400 μL de HCl 0,1 mol·L⁻¹ em 5 mL das amostras de cerveja.

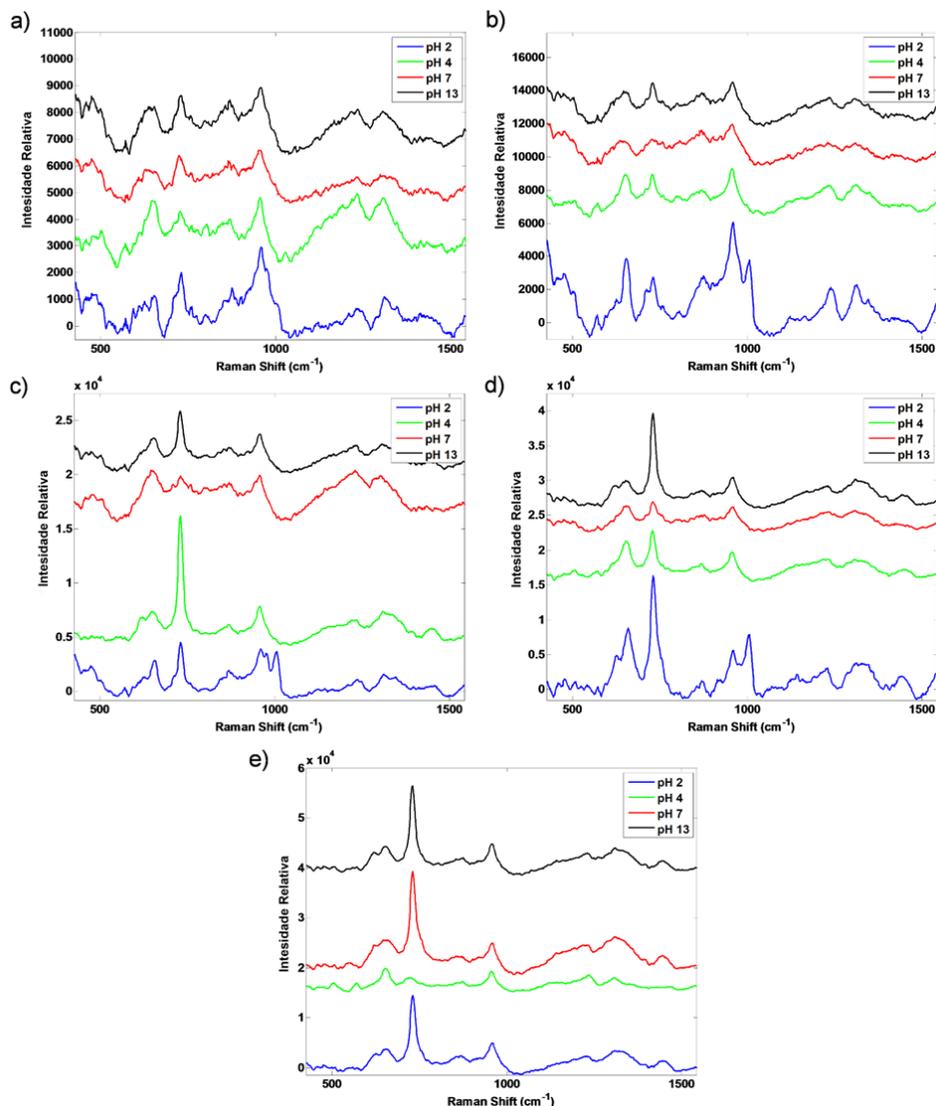


FIGURA 3.9 – Espectro SERS da amostra de cerveja em 4 diferentes pHs em diferentes regiões da placa de CCD: a) 8 mm, b) 14 mm, c) 17 mm, d) 20 mm e e) 24 mm

3.3.3. Aplicação da SERS-CCD para análise de *fingerprints* de cervejas do tipo Pilsner

Para as análises de SERS-CCD, foram empregadas 55 amostras de cerveja de 10 marcas diferentes produzidas em três estados do Brasil (São Paulo – SP,

Rio de Janeiro – RJ e Minas Gerais – MG) com o intuito de se obter modelos de classificação e discriminação a partir da marca e local de fabricação. Todas as amostras escolhidas para análise são cervejas do tipo Pilsner e, portanto, produzidas a partir do mesmo processo de fermentação, e com locais de fabricação bem próximos um dos outros. Devido a isso, uma grande similaridade e correlação entre as amostras analisadas é esperada. Métodos quimiométricos, como o PCA, são bastante úteis nestes casos de forma a gerar uma melhor análise exploratória. É importante salientar que a separação e discriminação das amostras será avaliada não apenas pela presença ou ausência de compostos químicos, mas também nas suas concentrações relativas, assim como em análises cromatográficas. Ou seja, quanto maior banda cromatográfica obtida na separação por CCD, mais espectros SERS deste composto serão observados, e com maior intensidade. Em suma, o *fingerprint* das amostras serão avaliados pela presença ou ausência de compostos, e suas concentrações relativas (ou áreas cromatográficas).

Devido à dificuldade de reprodução no posicionamento da amostra na placa cromatográfica, pequenas variações no fator de retenção (R_f) são observados inter-amostra. Além disso, a sobreposição de bandas, alto ruído instrumental devido a análise por SERS e desvios de linha de base são fatores que dificultam a análise por fingerprints de amostras cromatográficas¹⁸⁶, por essas razões não foi possível aplicar métodos trilineares como Análise de Fatores Paralelos (PARAFAC). Por isso, métodos bilineares de resolução de sinais como MCR-ALS e ICA são importantes para se obter perfis espectrais e cromatográficos de componentes químicos contidos nas amostras de cerveja e que possibilitariam sua discriminação, sem a utilização de ferramentas para alinhamento de bandas¹⁸⁷. Assim, utilizou-se as duas ferramentas mencionadas, MCR-ALS e ICA para decompor os sinais SERS dos cromatogramas, e com as áreas obtidas para cada composto, criar uma nova matriz de dados onde é possível aplicar o PCA para discriminar os dados de maneira efetiva.

3.3.3.1. Análise utilizando MCR-ALS

As 55 amostras foram analisadas utilizando o MCR-ALS para decompor os espectros SERS dos cromatogramas de cada componente, foram utilizados 7 componentes, estimadas a partir do SVD, e não negatividade na concentração. O modelo obtido mostrou uma boa recuperação dos dados com falta de ajuste (% LoF) de 26,5 e porcentagem de variância explicada de 93,0 % ($R^2 = 0,930$). Figura 3.10 apresenta os espectros SERS integrados recuperados pelo modelo. É possível notar que algumas componentes não apresentaram um bom espectro recuperado.

Entretanto, as componentes 2, 5, 6 e 7 apresentam picos bem resolvidos. A componente 2 apresenta dois picos em 600 – 620 cm^{-1} e um pico em 670 cm^{-1} , característicos de vibrações nas ligações carbono e halogenetos (ou carbono e enxofre), além de, um pico intenso em 1012 cm^{-1} relativo a estiramento C=S e vibrações assimétricas do anel. A componente 5 apresenta um pico intenso em 730 cm^{-1} , geralmente relacionado a vibrações de carbonos alifáticos e C-S, e um pequeno pico em 960 cm^{-1} , normalmente de vibrações assimétricas de ligações do tipo C-O-C. A componente 6 apresenta alguns picos na região de 650 – 730 cm^{-1} associados a vibrações do anel aromático. Componente 7 apresenta uma grande quantidade de picos: 515, 570, 650, 730, 960, 1230 e 1310 cm^{-1} , sendo essa componente a que apresenta a maior quantidade de picos recuperados por MCR-ALS^{188,189}.

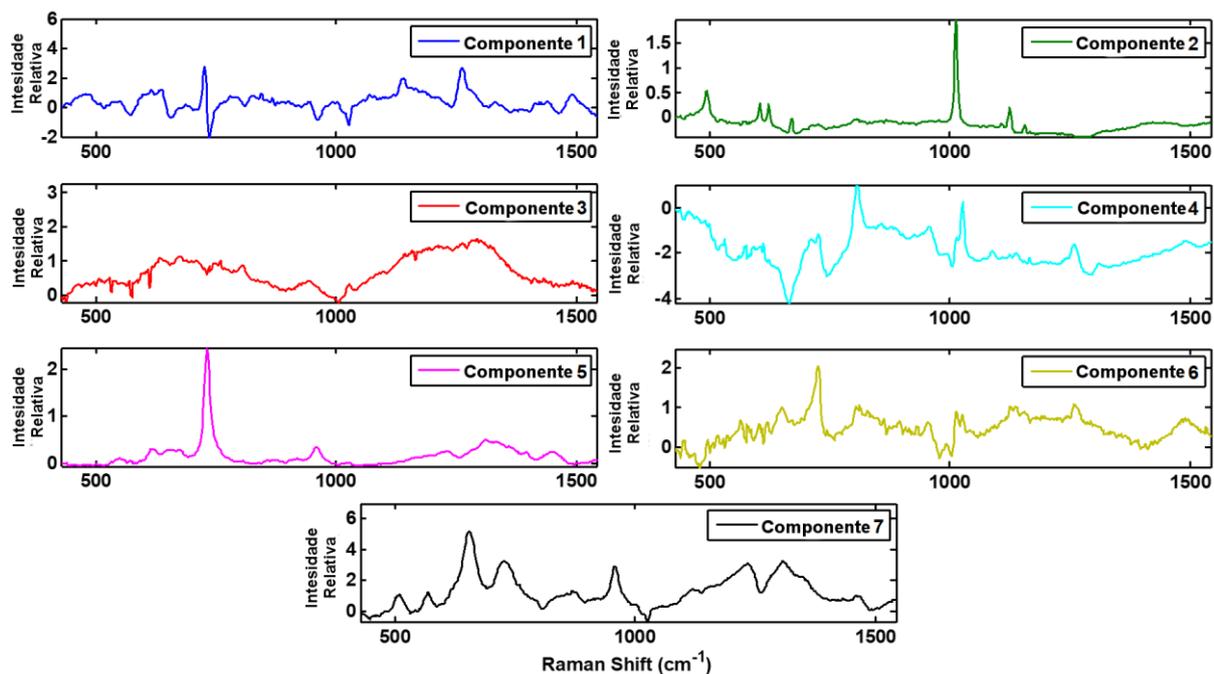


FIGURA 3.10 – Espectros SERS integrados recuperados pelo modelo MCR-ALS

Figura 3.11 apresenta o perfil de concentração recuperados pelo modelo, onde é possível observar perfis cromatográficos típicos com boa resolução e reprodutibilidade dos picos para diferentes amostras.

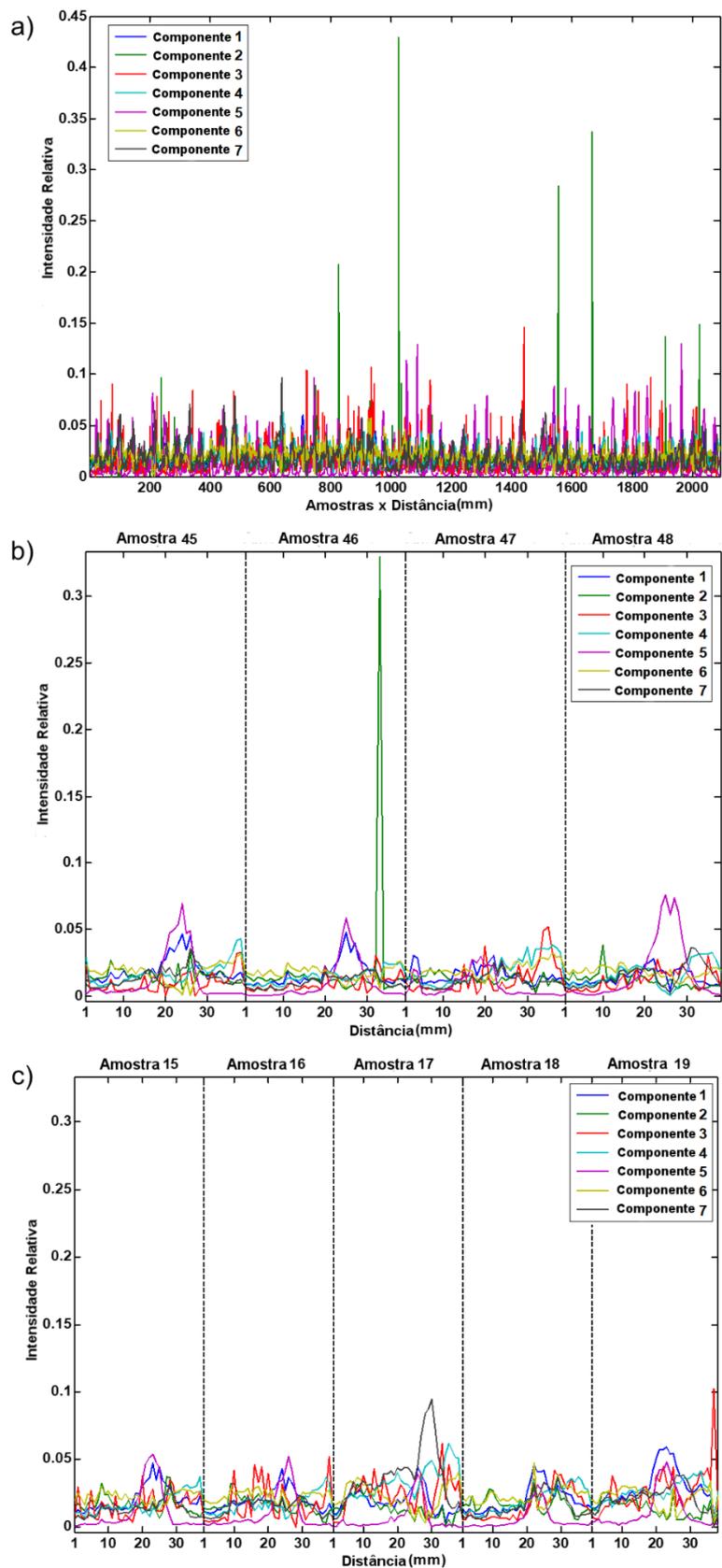


FIGURA 3.11 – a) Perfil de concentração (perfis cromatográficos) recuperados pelo modelo MCR-ALS e, b) magnificação das amostras 45 a 48 e c) 15 a 19

Com a área dos cromatogramas resolvidos por MCR-ALS, organizou-se uma matriz de 55 linhas (amostras) por 7 colunas (componentes). Com esta nova matriz de dados, realizou-se a análise de fingerprints utilizando a análise por componentes principais (PCA) de modo a se comparar as diferentes marcas de cerveja a partir da quantidade relativa de cada componente recuperado pelo modelo nas diferentes amostras. Este tipo de estratégia é importante para um conjunto de dados na qual há uma alta similaridade amostral, em que a discriminação das amostras ocorre não pela presença/ausência de compostos e sim as concentrações relativas destes presentes em cada amostra. Como todas as amostras analisadas eram cervejas do tipo Pilsener fabricadas em regiões próximas, este tipo de método é a mais indicada.

Como pré-tratamento dos dados, utilizou-se o auto-escalamento. Isto é feito para atribuir o mesmo tipo de importância para todas as variáveis, fazendo com que os compostos que estão em menores concentração possam influenciar na análise exploratória da mesma forma que compostos presentes em alta concentração. A Figura 3.12 apresenta as duas primeiras componentes principais obtidas a partir da PCA.

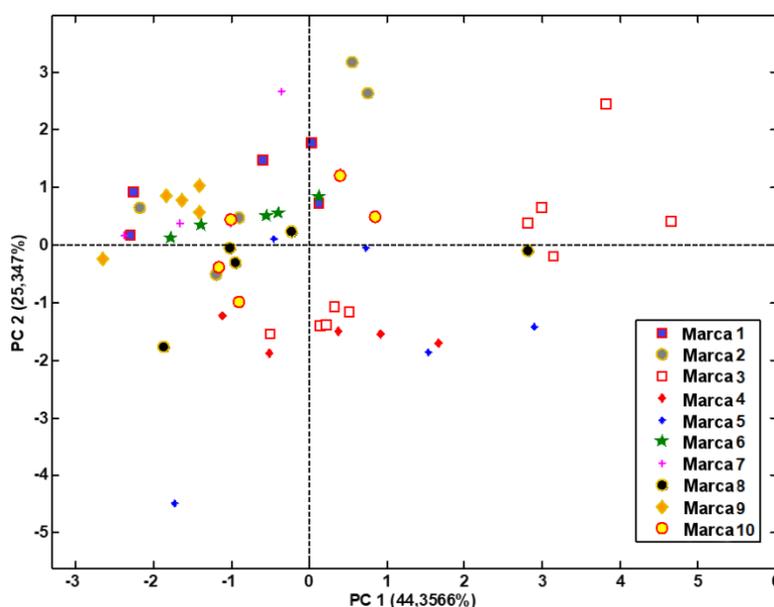


FIGURA 3.12 – Gráfico de scores da PC1 contra a PC2 utilizando MCR-ALS/PCA

É possível observar pouca discriminação entre as marcas utilizando as áreas dos bandas cromatográficos recuperados por MCR-ALS. Apenas as amostras da marca 3, 4 e 5 se localizam um pouco distante do grupo principal, onde a maioria das marcas estão contidas. Esta separação ocorre principalmente pela influência positiva da PC1, porém uma tendência de agrupamento das amostras baseada nas marcas é observada. Desta forma, algumas descrições (não muito definidas) ocorrem, isto é, amostras das mesmas marcas tendem a ficar próximo a amostras de outras marcas. As amostras das marcas 3, 4, 6, 8 e 9 estão próximas, sendo que para a amostra 3 é possível observar um agrupamento referente a dois locais de fabricação de cerveja a partir da PC1. As amostras localizadas próximas a origem do gráfico são cervejas produzidas na região central do estado de São Paulo (JC e JA), enquanto que as amostras com maior influência positiva da PC1 são amostras produzidas distantes da capital do estado de São Paulo.

Outro fato que também pode ser observado a partir destes dados é a discriminação das amostras da marca 1. Dois pequenos grupos são observados: um com pouca influência da PC1 e outro com uma influência negativa de PC1. Apesar de poucas amostras, foi possível distinguir entre duas fábricas de cerveja da marca 1, 2 amostras de JC (apresentando um valor de escore para a PC1 próximo à -2) e 3 amostras de JA (apresentando um valor de escore para a PC1 próximo à 0), ambas localizadas próximas a capital do estado de São Paulo. Apesar de serem da mesma marca, diferentes locais e diferentes plantas de produção podem gerar produtos diferentes devido a diversas variáveis não controlados pelo sistema, como características físico-químicas da água, clima da região, transporte de mercadoria, entre outros.

Ainda que os dados apresentem algumas pequenas separações entre as amostras, a dispersão por PCA dos dados recuperados por MCR-ALS não foi efetiva no processo de agrupamento. Entretanto, esta técnica pode ser facilmente utilizada como forma de controle de qualidade dentro da empresa, uma vez que

boa parte das marcas de cervejas analisadas mostraram um mesmo padrão de agrupamento.

3.3.3.2. Análise utilizando ICA

Na análise, por ICA foram utilizados 10 componentes independentes, estimados pelo critério Durbin-Watson (DW) aplicado a matrizes residuais. Figura 3.13 apresenta os sinais recuperados para o modelo ICA com 10 componentes independentes. É possível observar que um número maior de espectros SERS bem resolvidos é recuperado pelo ICA quando comparado ao MCR-ALS. Entretanto, os sinais recuperados pelas ICs 1, 3 e 4 são bastante similares as ICs 8 e 10, com algumas pequenas variações na linha de base e em outras regiões do espectro (provavelmente devido ao espalhamento térmico da sílica), assim, a PCA foi realizada sem algumas áreas de pico recuperados pelo ICA. Foram selecionadas as ICs 1, 2, 5, 6, 7, 8 e 9 para realizar as análises exploratórias, de forma que apenas variações espectrais relacionadas a informação química da amostra fossem levadas em consideração no PCA.

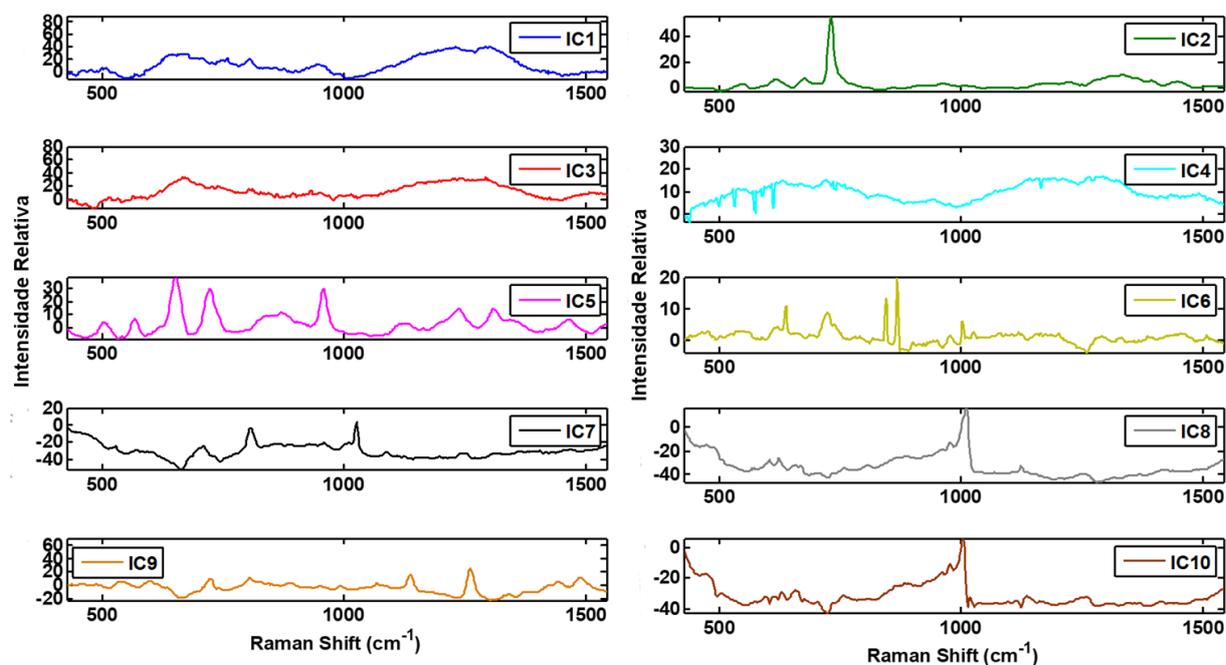


FIGURA 3.13 – Sinais recuperados pelo modelo ICA

A Figura 3.14 apresenta as proporções das ICs selecionadas recuperadas pelo ICA das amostras analisadas. Apesar do ICA ser uma técnica de separação de sinal, as proporções recuperadas pelo modelo apresentaram uma boa resolução, com um perfil bastante similar a bandas cromatográficas, isto é, uma componente recuperada (apresentando um espectro SERS específico) é eluída nos mesmos tempos de retenção para diferentes amostras eluídas por CCD. Ainda que as proporções recuperadas apresentem um perfil ruidoso, quando comparada com o perfil de concentração recuperado por MCR-ALS, é possível observar uma alta reprodutibilidade da posição dos picos em diferentes amostras. Uma vez que, nenhuma restrição é aplicada para recuperar as proporções, os perfis cromatográficos obtidos por ICA são bastante satisfatórios.

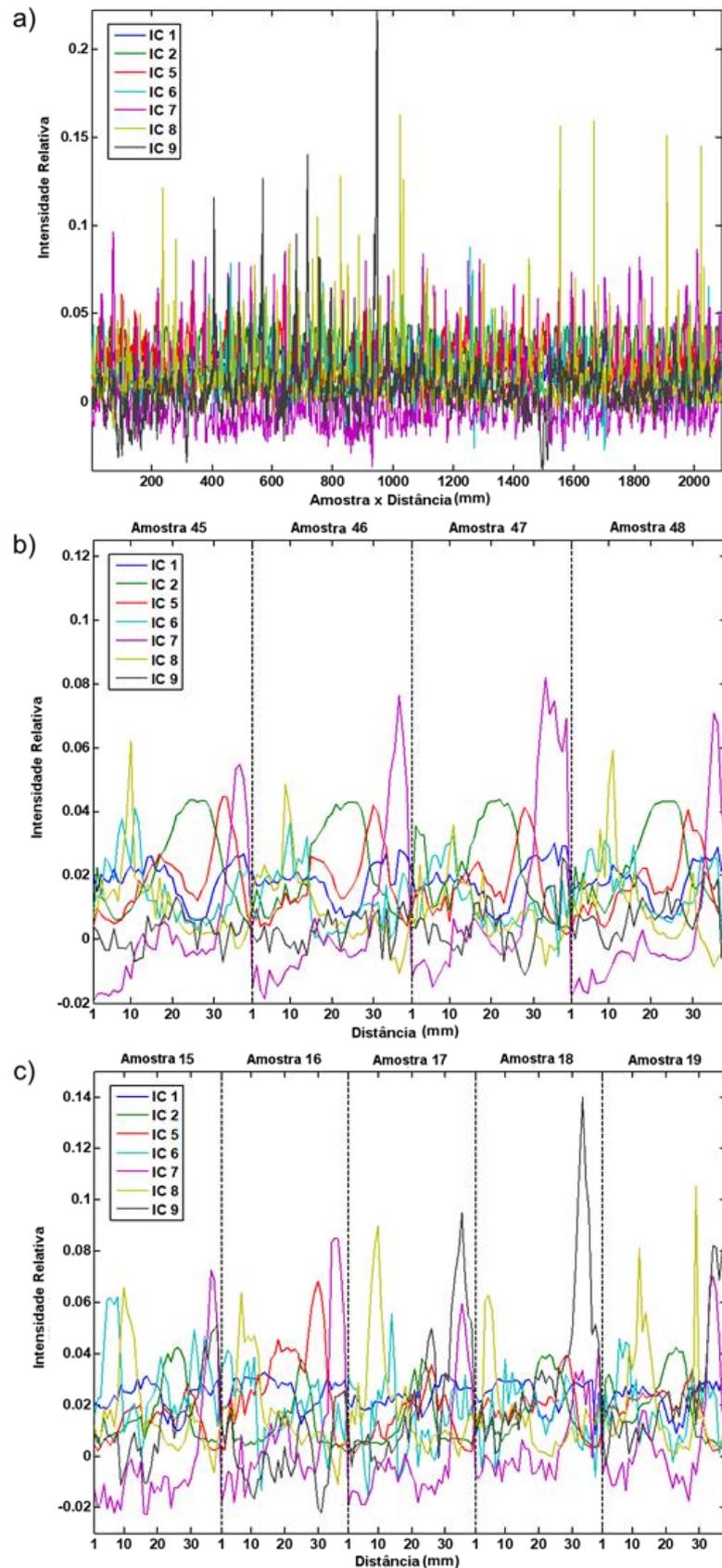


FIGURA 3.14 – a) Proporções (perfis cromatográficos) recuperadas pelo modelo ICA e, b) magnificação das amostras 45 a 48 e c) 15 a 19

Com a área dos cromatogramas das ICs relativas à informação química, organizou-se uma matriz de 55 amostras por 7 componentes independentes, e realizou-se a análise de *fingerprints* sobre esta nova matriz. Os dados foram pré-tratados da mesma forma que para o modelo MCR-ALS/PCA. A Figura 3.15 apresenta o gráfico de escores obtidos para as duas primeiras PCs, obtendo uma porcentagem de variância explicada de 62,80 %.

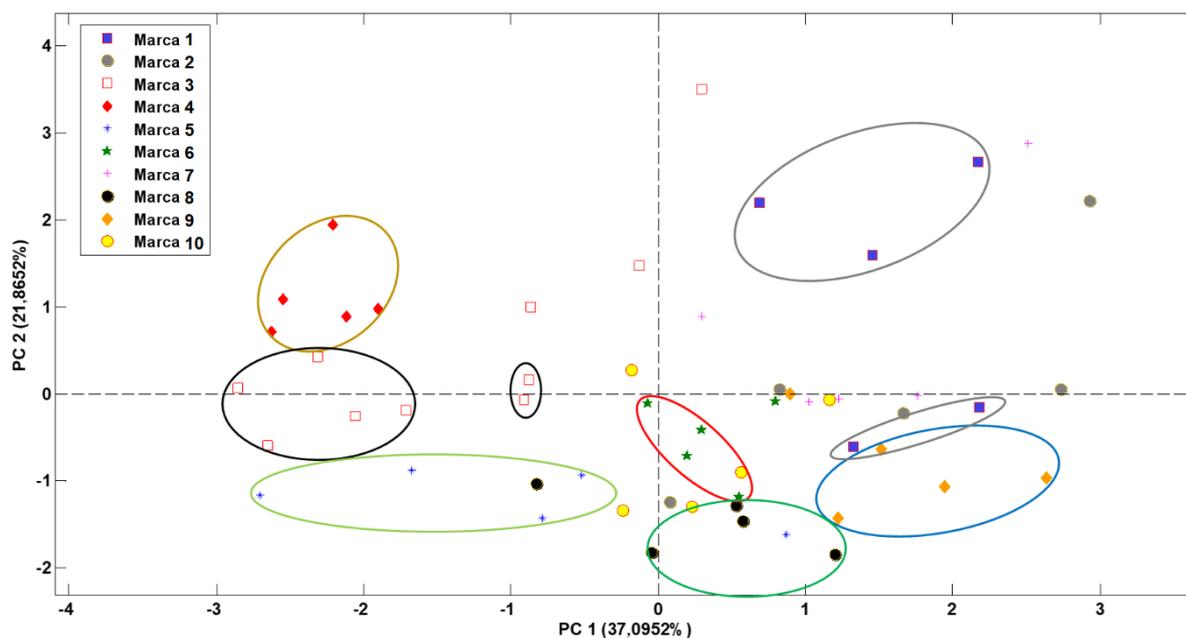


FIGURA 3.15 – Gráfico de scores da PC1 contra a PC2 utilizando ICA/PCA

A separação dos grupos utilizando ICA/PCA mostrou-se mais efetiva do que por MCR-ALS/PCA. As marcas 3 e 4, que estavam dispostas de maneira próxima por MCR-ALS/PCA, apresentaram dois grupos bem distintos no ICA/PCA. As amostras da marca 4 podem ser discriminadas das amostras da marca 3 devido a uma influência negativa da PC2, sendo separada em um único grupo (círculo dourado). As amostras da marca 3 estão mais distantes da marca 4 e apresentam uma melhor separação de acordo com o local de fabricação. Assim como por MCR-ALS/PCA, foi possível discriminar as amostras produzidas no centro de São Paulo (5 amostras presentes no círculo preto) para a marca 3, porém com o ICA/PCA foi possível identificar a separação das amostras produzidas em

outro estado do país (2 amostras de NM - Minas Gerais) das amostras restantes, produzidas no oeste do estado de São Paulo (3 amostras de AG – São Paulo, sem círculo).

As amostras das marcas 7 e 9, também ficaram próximas do grupo central, assim como no primeiro método. Entretanto, para a amostra 5 (círculo verde claro), nota-se um melhor agrupamento das amostras, facilitando uma eventual análise de controle de qualidade da amostra a partir de métodos supervisionados, como SIMCA e KNN. As amostras da marca 1 também tiveram uma maior separação entre as amostras produzidas em duas diferentes localidades. As amostras produzidas em Jaguariúna (3 amostras de JA no círculo cinza) tiveram influência positiva da PC2, enquanto que as amostras produzidas em Jacareí (2 amostras de JC no círculo cinza) não tiveram quase nenhuma influência da PC2. Além disso, observa-se um agrupamento das amostras das marcas 6 (círculo vermelho) e 8 (círculo verde escuro), grupos de amostras que não mostraram um bom agrupamento utilizando MCR-ALS/PCA.

Os dados por ICA/PCA mostraram-se ligeiramente melhores do que por MCR-ALS/PCA no caso deste estudo, permitindo a identificação e discriminação de grupos que não apresentavam um bom agrupamento no primeiro método. Apesar de não ter sido possível agrupar de maneira eficiente todas as marcas de cerveja analisadas, os resultados mostraram-se mais que satisfatórios, uma vez que todas as amostras analisadas eram produzidas a partir de um mesmo tipo de processo de fermentação, i. e., todas as amostras eram do tipo Pilsener, fabricadas em uma pequena região do país. A técnica mostrou uma alta eficiência e o potencial promissor para gerar *fingerprints* (espectrais e cromatográficos) de amostras complexas.

3.4. Conclusão

O uso da cromatografia em camada delgada associada à espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS-CCD) mostrou-se uma técnica bastante promissora para análises de fingerprints de amostras complexas como cerveja do tipo Pilsener. Com o desenvolvimento de um aparato extremamente simples, barato e de fácil manuseio, foi possível borrifar solução coloidal de nanopartículas de ouro (AuNPs) por toda a placa de CCD e obter medidas na forma de um cromatograma-SERS e assim, gerar fingerprints (espectrais e cromatográficos) de amostras complexas.

Borrifar a solução de nanopartícula na placa cromatográfica, além de gerar regiões com AuNPs dispersas de maneira mais homogênea, possibilita análises de compostos em baixa concentração que não são detectados por outros métodos de revelação, como lâmpada UV.

A utilização de ferramentas quimiométricas como MCR-ALS/PCA e ICA/PCA possibilitaram obter perfis espectrais de compostos químicos que não foram separados completamente, além de gerar perfis cromatográficos únicos para cada componente recuperado, eliminando etapas de processamento de dados de difícil aplicação como alinhamento de picos cromatográficos. O ICA/PCA mostrou-se uma ferramenta ligeiramente melhor do que o MCR-ALS/PCA nesta aplicação, pois identificou sinais SERS de compostos presentes em baixa intensidade possibilitando uma melhor discriminação das amostras quanto a marca de cerveja e local de produção.

**CAPÍTULO 4 – QUANTIFICAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL
E TRIMETOPRIMA EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO**

4. QUANTIFICAÇÃO DE SULFAMETOXAZOL E TRIMETOPRIMA EM AMOSTRAS DE LEITE BOVINO

4.1. Introdução e Objetivos

Sulfametoxazol (SMX) e trimetoprima (TMP) são dois antibióticos amplamente utilizados em medicamentos destinados ao uso humano e veterinário. Na veterinária, além do uso destes medicamentos para o tratamento de infecções, também é possível encontrar casos onde eles são utilizados como medida profilática. No Brasil, a ANVISA regulariza esses fármacos com o LMR de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para sulfametoxazol e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de trimetoprima em leite¹⁹⁰.

A espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) é uma técnica que permite a detecção de analitos em baixas concentrações, entretanto, as análises de amostras complexas dificultam as medidas por SERS. A SERS-CCD contorna esses problemas realizando a separação dos componentes das amostras na placa de CCD possibilitando analisar diferentes tipos de matrizes com pouco ou nenhum preparo destas⁹⁰.

Ainda há poucos trabalhos utilizando a SERS-CCD para a quantificação de analitos⁸⁰. Recentemente, Wu e colaboradores utilizaram o SERS-CCD para a quantificação de histamina em peixes⁸¹. Os autores realizaram medidas pontuais da placa cromatográfica nas regiões de separação do analito de interesse para obter o espectro SERS. Devido à baixa concentração do analito, os autores realizaram uma derivatização da molécula para visualizar sua região de separação na placa de CCD.

Ao invés de etapas de pré-tratamento da placa cromatográfica (como a adição de um revelador mais sensível) ou da amostra (como a derivatização), pode-se realizar medidas espaciais em toda a região de separação da molécula e assim encontrar as regiões de separação do analito. Para isso, utiliza-se equipamentos Raman acoplados a sistemas de imageamento. Desta forma, obtêm-

se espectros SERS locais referentes a posições específicas da placa de CCD. Cada um destes espectros locais forma um ponto da imagem (pixel), a qual pode-se expandir de forma a realizar diversos espectros nas duas dimensões espaciais da placa cromatográfica (x e y), assim é possível obter uma imagem hiperspectral.

Na imagem hiperspectral, cada pixel é referente a uma posição espacial da amostra, e nele é contida toda a informação espectral daquela posição¹⁹¹, ou seja, cada pixel da imagem é representado por um espectro SERS. Este tipo de abordagem possibilita detectar regiões de separação cromatográfica que não são visualizadas por outros métodos de revelação usual, como a radiação de luz ultravioleta.

Cada imagem hiperspectral gera uma grande quantidade de dados, e o tratamento e processamento dos mesmos é uma etapa importante. Além disso, em amostras complexas, existem regiões da placa cromatográfica onde pode ocorrer a coeluição de interferentes e do analito de interesse. Desta forma, torna-se necessário o uso de ferramentas quimiométricas de resolução de sinais para decompor o sinal do analito do sinal de possíveis interferentes.

Este trabalho tem por objetivo desenvolver um método analítico barato e eficiente para a quantificação de sulfametoxazol e trimetoprima em amostras comerciais de leite, utilizando imageamento por SERS de placas de CCD e métodos quimiométricos

4.2. Parte Experimental

4.2.1. Reagente

SMX e TMP foram comprados em uma farmácia de manipulação local. Citrato trissódico dihidratado ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) da J. T. Baker, sulfato de magnésio ($MgSO_4$) da Synth, acetato de sódio ($NaC_2H_3O_2$) da Synth, etilenodiaminotetraacetato dissódico dihidratado ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$) da Synth e ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$) da J. T. Baker, todos de pureza analítica. Ácido

cloroáurico (HAuCl_4) da Sigma Aldrich apresentava pureza 99,999%. A separação por CCD foi realizada por uma placa de cromatografia por camada delgada Allugram Xtra SIL G, da Macherey-Nagel, com 200 μm de espessura de sílica 60 e indicador fluorescente para 254 nm. Os solventes orgânicos utilizados foram: acetato de etila (J.T. Baker), acetonitrila (J.T. Baker) e metanol (J.T. Baker), de pureza grau HPLC. As soluções aquosas foram realizadas com água ultrapura ($18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$).

4.2.2. Síntese das nanopartícula

A síntese de nanopartículas foi realizada a partir do método descrito no capítulo anterior, na seção 3.2.3. De forma resumida, adicionou-se 48 mg de HAuCl_4 em 100 mL de H_2O ultrapura e aqueceu-se a solução até 85°C . A seguir, adicionou-se 10 mL de citrato trissódico 1,0 % (m/m). A reação é interrompida com 4 minutos colocando-se a solução em um banho de gelo.

4.2.3. Preparação das soluções e das amostras

Foram preparadas soluções estoque de SMX e TMP na concentração de $1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em metanol. A partir das soluções estoques diluiu-se as soluções para as concentrações da curva de calibração, para SMX: $2,5 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $1,0 \times 10^{-5}$; $2,5 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-4}$; $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; e para TMP: $1,0 \times 10^{-7}$; $2,5 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-7}$; $1,0 \times 10^{-6}$; $2,2 \times 10^{-6}$; $3,8 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

As 3 amostras de leite, denominadas Leite A, B (integral) e C (desnatado), foram adquiridas em mercados locais. Nestas foram adicionadas pequenas alíquotas das soluções estoque dos fármacos de acordo com a concentração desejada. Estudou-se três níveis de fortificação: sem adição dos fármacos, com adição dos fármacos no limite máximo residual (aproximadamente $1,7 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para TMP e $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para SMX), e com 2 vezes o limite máximo residual permitido (aproximadamente $3,4 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para TMP e $8,0 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para SMX). Os analitos foram extraídos utilizando a método QuEChERS^{192,193}. Para isso, 20 g da amostra foram pesadas em tubos de

centrífuga de polipropileno, em seguida adicionou-se 20 mL de acetonitrila, 20 mL de uma solução aquosa de Na₂EDTA (0,1 mol·L⁻¹) e 0,2 mL de ácido acético (5% em água). A mistura foi agitada manualmente por cerca de 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 8 g de MgSO₄ anidro e 2 g de NaC₂H₃O₂ anidro. A mistura foi mais uma vez agitada manualmente por cerca de 15 minutos e centrifugada por 15 minutos à 12000 rpm. Após a centrifugação, 4 mL da camada de acetonitrila (sobrenadante) foram evaporadas em fluxo de N₂, e ressuspensos em 0,5 mL de metanol para as análises por SERS-CCD.

4.2.4. Procedimento CCD

As placas foram cortadas manualmente nas dimensões de 5 cm de comprimento x 2,5 cm de largura. 4 µL dos padrões e das amostras analisadas foram adicionadas a 0,5 cm do começo da placa de CCD (com uma distância de 0,5 cm entre as amostras), e a eluição foi realizada por 4 cm. Como fase móvel seguiu-se a mistura de solventes estabelecida pela Fundo Global de Saúde Farmacêutica (GPHF)¹⁹⁴, acetato de etila:metanol (75:15 v/v). Inicialmente as amostras foram avaliadas com uma lâmpada UV de 254 nm, em seguida dispersou-se a solução coloidal de ouro utilizando o dispositivo descrito no capítulo 3, seção 3.2.4.

4.2.5. Procedimento SERS-CCD

Os espectros SERS foram adquiridos utilizando um equipamento portátil *i*-Raman BWS 415-785H (B&W Tek, Newark, DE) com laser vermelho de 785 nm e resolução espectral de 3,5 cm⁻¹, onde a sonda do equipamento (BAC102), com ponto focal de 85 µm, era localizada sobre uma mesa posicionadora XY para realizar o imageamento (Figura 4.1). A mesa posicionadora foi desenvolvida pela Optron (Campinas – SP, Brasil), sua interface com o computador foi realizada por um microcontrolador Arduino, e o software foi desenvolvido em plataforma JAVA.

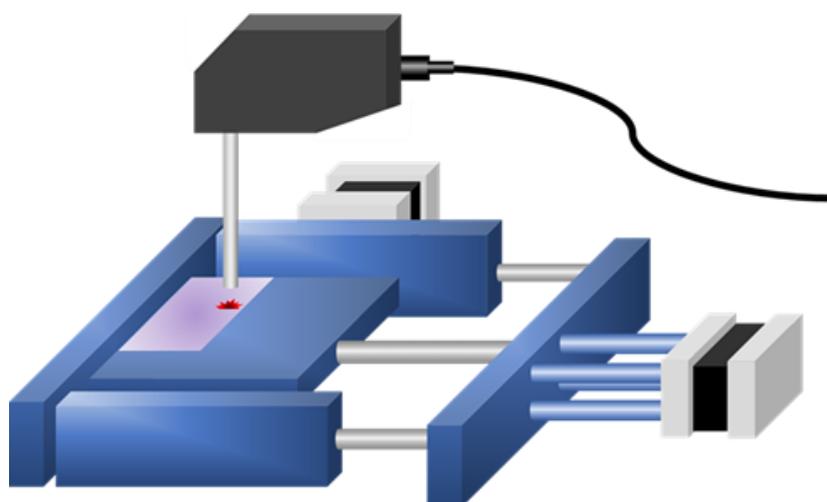


FIGURA 4.1 –Representação esquemática da mesa posicionadora realizando medida na placa de SERS-CCD.

Os espectros foram adquiridos com um tempo de aquisição de 60 segundos e uma potência de laser de 63 mW. As imagens hiperspectrais foram obtidas a partir da área útil da placa cromatográfica (4 cm de altura e 2,4 cm de largura) com intervalos de 1 mm, sendo que cada placa apresentava uma triplicata da amostra analisada. Os espectros foram obtidos de 280 até 1900 cm^{-1} . Ao final das medidas, cada placa cromatográfica gerava uma imagem hiperspectral de 24 pixels no eixo x, 40 pixels no eixo Y e 950 comprimentos de onda.

4.2.6. Otimização das condições de análise

Para otimizar as condições de aquisição do sinal SERS e possibilitar a detecção de ambos os fármacos nas concentrações próximas aos limites máximos de resíduo, utilizou-se um planejamento experimental do tipo composto central analisando a concentração de NaCl adicionado nas nanopartículas e a pré-concentração de AuNPs. O sal atua como agente aglomerante aumentando a quantidade de *hot spots*, responsáveis pelo aumento do sinal SERS. A concentração de NaCl foi avaliada adicionando-se 2 μL de diferentes concentrações da solução de NaCl, em 100 μL da solução coloidal de AuNPs antes de borrifar na placa de CCD. A pré-concentração das nanopartículas foi estudada

Capítulo 4 – QUANTIFICAÇÃO DE SMX E TMP EM AMOSTRAS DE
LEITE BOVINO

da seguinte maneira, 1 mL da solução de AuNPs sintetizada previamente era centrifugada a 5000 rpm por 30 minutos, em seguida diferentes quantidades de sobrenadante eram retirados de forma a pré-concentrar a quantidade de nanopartículas na solução. A Tabela 4.1 apresenta a codificação e a tabela de experimentos do planejamento experimental, onde foram realizados 11 experimentos com 3 réplicas no ponto central. Como respostas do planejamento, utilizou-se os sinais individuais dos analitos e buscou-se uma condição experimental onde ambos apresentavam uma boa intensidade.

TABELA 4.1 – Planejamento experimental do tipo composto central com os valores codificados e para cada experimento

Experimento	NaCl	AuNPs	NaCl (mol·L ⁻¹)	Vol de AuNPs mantido (%)
1	-1	-1	0,4	87,15
2	1	-1	1,6	87,15
3	-1	1	0,4	52,14
4	1	1	1,6	52,14
5	0	0	1	70
6	0	0	1	70
7	0	0	1	70
8	-1,68	0	0	70
9	1,68	0	2	70
10	0	-1,68	1	100
11	0	1,68	1	40

Além disso, também se avaliou o pH da fase móvel, uma vez que ao alterar o pH da solução é possível alterar o modo de adsorção das moléculas na superfície das nanopartículas e intensificar ou suprimir o sinal¹⁹⁵. Desta forma, adicionou-se na fase móvel 150 µL de uma solução 0,1 mol·L⁻¹ de HCl, para o meio ácido, e 0,1 mol·L⁻¹ de NaOH, para o meio básico.

4.2.7. Métodos quimiométricos

Cada placa de CCD gera uma imagem hiperspectral na forma de um tensor de dados \bar{X} de dimensões n, m, k . Onde, n é o número de pixels obtidos no eixo x

da imagem, m é o número de pixels no eixo y , e k é o número de variáveis do espectro adquirido de acordo com a Figura 4.2.

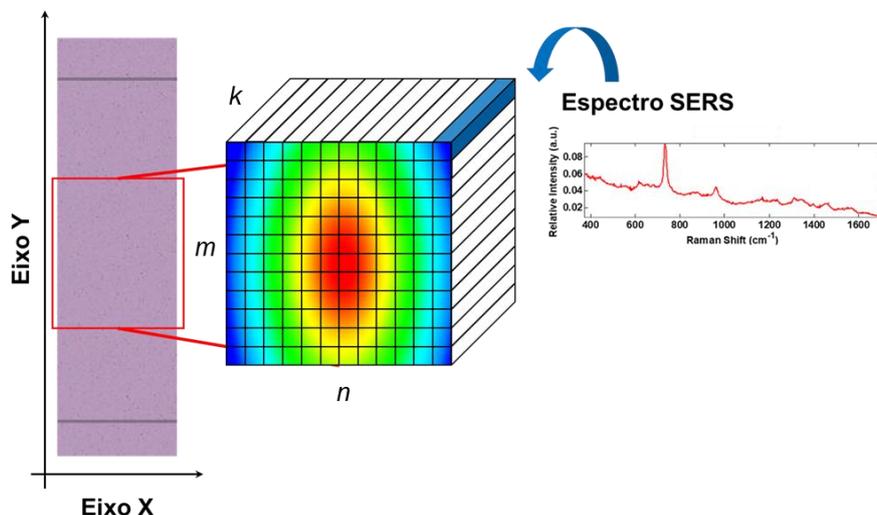


FIGURA 4.2 – Representação de uma imagem hiperspectral gerada a partir da análise de SERS-CCD

Ao final das medidas, cada imagem hiperspectral foi desdobrada no sentido dos pixels gerando uma matriz aumentada (\mathbf{X}_{aug}) de dimensões, $n \times m$ por k . Todas as imagens foram combinadas em uma única matriz de dados de dimensões $i \times n \times m$ por k , onde i é o número de amostras analisadas. Os dados foram pré-processados visando enfatizar as informações químicas relevantes dos espectros. Para isso, realizou-se uma seleção da região espectral para cada analito (de $373 - 1052 \text{ cm}^{-1}$ para SMX, e de $1052 - 1640 \text{ cm}^{-1}$ para TMP), e alisamento na média móvel (com janela de $n = 5$). Com esses dados, foram empregadas as ferramentas MCR-ALS e ICA. O número de componentes para inicializar o MCR-ALS foi selecionado a partir do valor normalizado dos autovalores calculados por SVD. Utilizou-se como restrições, a não negatividade na concentração e no espectro. Para o ICA, utilizou-se o algoritmo JADE para o cálculo das componentes independentes e a seleção do número ICs foi realizada pelo método de ICA por blocos.

As curvas analíticas ajustadas para a quantificação de ambos os analitos foram realizadas a partir da correlação entre a concentração das soluções padrões

e da somatória do perfil de concentração (para o MCR-ALS) ou das proporções (para o ICA) da componente que apresentavam o sinal recuperado mais similar com o espectro SERS dos padrões. Tal abordagem pode ser facilmente comparada com a quantificação univariada por cromatografia, onde correlaciona-se as concentrações dos padrões com a área do pico cromatográfico referente aquele analito. A diferença, é que neste caso, as bandas cromatográficas são separadas matematicamente de seus interferentes pelas ferramentas quimiométricas, utilizando o espectro SERS de cada analito como base da deconvolução.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Ensaio preliminares

A realização dos ensaios preliminares tem como intuito observar o efeito SERS dos analito estudados tanto em soluções coloidais de AuNPs quanto nas placas cromatográficas de CCD contendo as nanopartículas, e avaliar o sistema cromatográfico da placa de CCD. A Figura 4.3 apresenta o espectro Raman do padrão dos fármacos, sulfametoxazol (Figura 4.3 -a)) e trimetoprima (Figura 4.3 -b)), em estado sólido (linha azul), o espectro Raman de uma solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ em metanol dos fármacos (linha verde) e o espectro Raman amplificado por superfície dos fármacos em uma solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ contendo nanopartículas de ouro (linha vermelha). A presença do efeito SERS é visivelmente observada, uma vez que a solução contendo nanopartículas apresenta um sinal característico de espectro Raman, enquanto que a solução sem a presença de nanopartículas não exibe nenhum pico significativo. Vale a pena ressaltar que devido ao ambiente químico dos analitos serem diferentes, na forma sólida e na solução contendo AuNPs, o espectro resultante de ambas medidas apresenta sinais distintos.

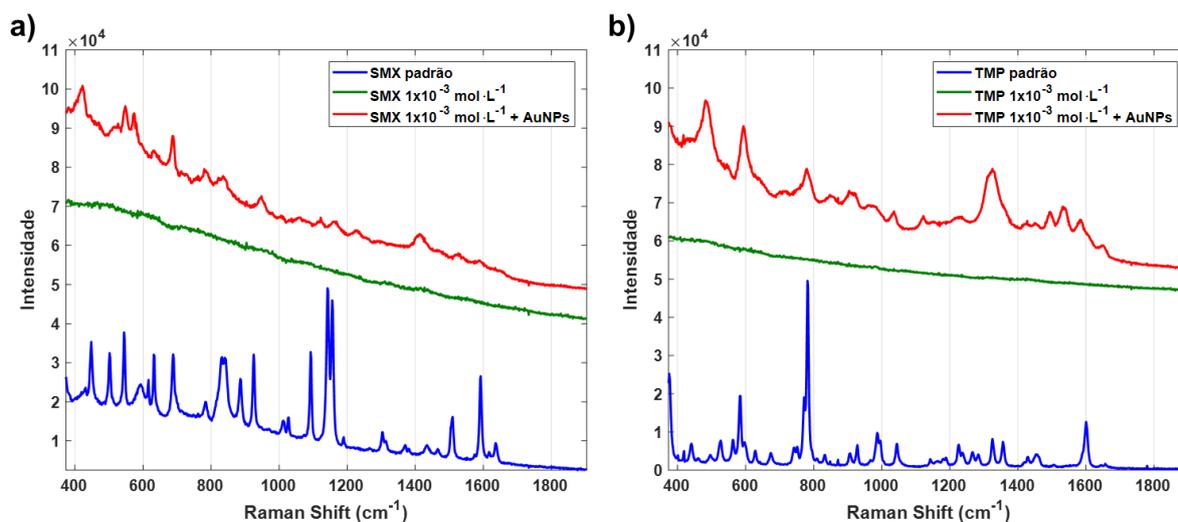


FIGURA 4.3 – Espectros Raman e SERS dos fármacos a) SMX e b) TMP.

Para SMX, a maioria dos seus picos característicos perdem intensidade e quatro bandas mais intensas são observadas no seu espectro SERS. Em 687 cm^{-1} , observa-se um pico referente ao desdobramento fora do plano de uma ligação $\text{C}\equiv\text{C}\equiv\text{C}$. O pico em 570 cm^{-1} é referente a um desdobramento fora do plano na região $\text{C}-\text{O}-\text{N}$ do anel isoxazol. O pico em 546 cm^{-1} é referente a um desdobramento no plano de uma amina secundária ($-\text{NH}$). E o pico, em 423 cm^{-1} , é indicativo de um desdobramento no plano de uma ligação $\text{C}\equiv\text{C}-\text{N}$ ¹⁹⁶. Essas vibrações indicam que uma possível interação entre as nanopartículas e o anel isoxazol ocorre de maneira mais efetiva, levando a interação do sinal Raman para o SMX.

No sinal SERS do TMP, quatro picos mais intensos são observados, em 1325 cm^{-1} , 780 cm^{-1} , 593 cm^{-1} e 482 cm^{-1} . O primeiro pico, em 1325 cm^{-1} , é relativo a estiramentos $\text{C}-\text{O}$ do anel benzênico. Em 780 cm^{-1} , o pico é relativo à respiração do anel pirimidina. Em 593 cm^{-1} , ressalta-se a vibração do anel pirimidina no plano e a torção do anel benzênico da trimetoprima. O pico em 482 cm^{-1} apresenta informações referentes a desdobramentos de aminas primárias ($-\text{NH}_2$)¹⁹⁷. Considerando que a região onde ocorre o aumento do sinal apresenta-se

mais próxima da superfície da nanopartícula, pode-se inferir que a maior interação ocorre pelo anel pirimidina na molécula.

A Figura 4.4 demonstra a efetividade na separação e identificação dos analitos pela técnica SERS-CCD. Foi empregado no sistema uma fase móvel de 75:15 v/v acetato de etila:metanol (AcEt:MeOH). Em seguida observou-se as manchas de separação em uma câmara de revelação UV (Figura 4.4-a)). Os pontos de separação foram demarcados para posterior análise SERS de forma a confirmar os compostos detectados e avaliar possíveis alterações no sinal SERS no substrato de sílica (Figura 4.4-b)).

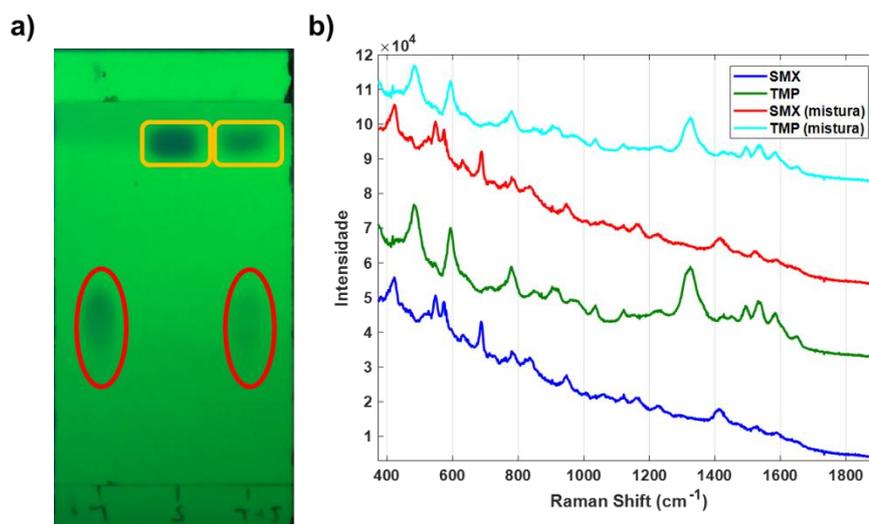


FIGURA 4.4 – a) Placa de CCD após a separação e revelação por câmara de UV, e b) espectros SERS das manchas observadas na placa.

Foi aplicado na placa cromatográfica três soluções diferentes, uma de trimetoprima padrão ($1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), uma contendo sulfametoxazol padrão ($1 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), e por fim, uma solução contendo ambos os fármacos na concentração de $5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Pela revelação na câmara UV, foi identificada uma boa separação dos analitos com boa reprodutibilidade do tempo de retenção. Como esperado, não se observou nenhuma modificação do sinal SERS no substrato de sílica, e foi possível detectar ambas moléculas sem interferência no sinal.

4.3.2. Planejamento Experimental

Com as condições de análise por SERS-CCD estabelecidas, realizou-se um planejamento experimental do tipo composto central com cinco níveis e dois fatores, para avaliar a quantidade de nanopartículas e a concentração de NaCl na solução coloidal. Os experimentos foram realizados com o monitoramento das intensidades de sinal para ambos os fármacos após a separação por CCD. Para isso, uma solução contendo SMX na concentração de $5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e TMP na concentração de $1 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi depositada na placa cromatográfica e os analitos separados pela fase móvel AcEt:MeOH (75:15 v/v). A solução coloidal de nanopartículas foi preparada de acordo com experimento a ser avaliado e dispersou-se a solução sobre a placa de CCD. Uma imagem hiperspectral foi adquirida para cada um dos experimentos e utilizou-se como resposta a somatória da altura dos picos mais intensos de cada analito na região de separação da placa cromatográfica. Para SMX, monitorou-se o pico em 687 cm^{-1} e, para TMP, o pico em 1325 cm^{-1} .

A Tabela 4.3 apresenta os dados de intensidade obtidos como resposta do planejamento.

TABELA 4. 2 – Tabela dos resultados do planejamento composto central para SMX e TMP.

Experimento	SMX	TMP
1	257	1930
2	1193	4975
3	1337	9842
4	942	6686
5	1818	8701
6	1457	6668
7	1236	5813
8	1369	5841
9	360	6201
10	354	4899
11	1661	2263

Com os dados de intensidade SERS de cada experimento obtidos no planejamento experimental, realizou-se a análise de variância (ANOVA) dos resultados. Um modelo quadrático (Equação 4.1) foi proposto para este sistema e os valores dos coeficientes angulares e linear foram calculados para um intervalo de 95 % de confiança. A Tabela 4.4 apresenta os resultados do modelo ANOVA para o modelo de TMP para o modelo proposto pela equação 4.1.

$$y = b_0 + b_1x_{NaCl} + b_2x_{Au} + b_{1^2}x_{NaCl}^2 + b_{2^2}x_{Au}^2 + b_{12}x_{NaCl}x_{Au} \quad (4.1)$$

De acordo com os valores da tabela ANOVA para a TMP, o modelo gerado consegue explicar apenas 48% de toda a informação obtida experimentalmente. Os dados apresentados informam que o não modelo apresenta falta de ajuste, uma vez que o teste de variância (teste F) da falta de ajuste pelo erro puro apresenta um valor menor que o $F_{crítico}$ para esta situação ($F_{crítico (3;2;95\%)} = 16,04$). Ademais, o teste F da regressão pelo resíduo apresenta um valor menor que o $F_{crítico}$ para os graus de liberdade do modelo ($F_{crítico (5;5;95\%)} = 7,15$). Estes valores refletem nos coeficientes calculados pelo modelo. A 95% de confiança, todos os valores de coeficientes, exceto o b_0 , apresentaram um valor de intervalo de confiança maior que o coeficiente. Desta forma, não é possível considerar estes termos como significativos, uma vez que seu erro estatístico é maior que a sua contribuição para o modelo, indicando que o modelo gerado não se adequa aos dados obtidos experimentalmente, e não é possível encontrar uma superfície de resposta adequada para representar os dados reais. A Equação 4.2 apresenta o modelo obtido para o sinal de TMP como resposta após a remoção dos coeficientes não significativos calculados pela ANOVA apresentado na Tabela 4.4.

Capítulo 4 – QUANTIFICAÇÃO DE SMX E TMP EM AMOSTRAS DE
LEITE BOVINO

TABELA 4.3 – Tabela ANOVA para TMP para o modelo proposto pela equação 4.1.

	SQ	G.L.	MQ	
Regressão	2,65x10 ⁷	5	5,29x10 ⁶	F _{Reg/Res}
Resíduo	2,90x10 ⁷	5	5,79x10 ⁶	0,91
Total	5,54x10 ⁷	10		F _{Faj/EP}
Erro puro	4,40x10 ⁶	2	2,20x10 ⁶	3,75
Falta de ajuste	2,46x10 ⁷	3	8,19x10 ⁶	
R²	0,48	R	0,69	
R² máximo	0,92	R_{máximo}	0,96	

$$y = 7062,36 (\pm 2072,14) \quad (4.2)$$

Para SMX, foi possível calcular uma maior quantidade de coeficientes significativos para o modelo. Apenas o coeficiente b₁, referente a contribuição linear da quantidade de NaCl, apresentou um valor de intervalo de confiança maior que o coeficiente, com 95% de confiança. Assim, o modelo gerado apresentou 5 coeficientes significativos, onde foi possível adequar os dados obtidos experimentalmente na forma de uma superfície de resposta. A Equação 4.3 apresenta a equação obtida para o modelo utilizando a sinal de SMX como resposta. Com o novo modelo proposto, foi recalculado a tabela ANOVA (Tabela 4.5).

$$y = \frac{1504,07}{(\pm 287,34)} + \frac{334,71}{(\pm 175,96)} x_{Au} - \frac{320,57}{(\pm 209,43)} x_{NaCl}^2 - \frac{334,71}{(\pm 209,43)} x_{Au}^2 - \frac{248,93}{(\pm 248,84)} x_{NaCl} x_{Au} \quad (4.3)$$

Capítulo 4 – QUANTIFICAÇÃO DE SMX E TMP EM AMOSTRAS DE
LEITE BOVINO

TABELA 4.4 – Tabela ANOVA para SMX recalculado para o número de coeficientes significativos.

	SQ	G.L.	MQ	
Regressão	$2,17 \times 10^6$	4	$5,43 \times 10^5$	$F_{\text{Reg/Res}}$
Resíduo	$7,87 \times 10^5$	6	$1,57 \times 10^5$	2,75
Total	$2,95 \times 10^6$	10		$F_{\text{Faj/EP}}$
Erro puro	$1,73 \times 10^5$	2	$8,63 \times 10^4$	2,37
Falta de ajuste	$6,15 \times 10^5$	4	$1,53 \times 10^5$	
R²	0,73	R	0,86	
R² máximo	0,94	R_{máximo}	0,97	

O novo modelo gerado consegue explicar 73% da variância explicada, uma quantidade significativamente maior que o modelo apresentado para TMP (Tabela 4.4). O modelo não apresentou falta de ajuste (com o teste F da falta de ajuste pelo erro puro menor que o F crítico) e obteve um teste F de regressão pelo resíduo menor que o $F_{\text{crítico}}$, com os graus de liberdade assinalados na tabela ($F_{\text{crítico}}(4;6;95\%) = 6,22$).

Por isso, a equação 4.2 não foi utilizada para a construção da superfície de resposta para TMP devido à dificuldade de predição dos valores observados. Assim, construiu-se uma superfície de resposta baseada nos valores empíricos do planejamento para TMP e uma superfície baseada na equação 4.3 para SMX (Figura 4.5). Ambos os fármacos apresentaram um sinal ótimo próximo ao experimento 3 ($0,4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl e volume mantido de nanopartículas de 50%).

Por isso, utilizou-se essa condição para realizar as curvas analíticas e análise das amostras.

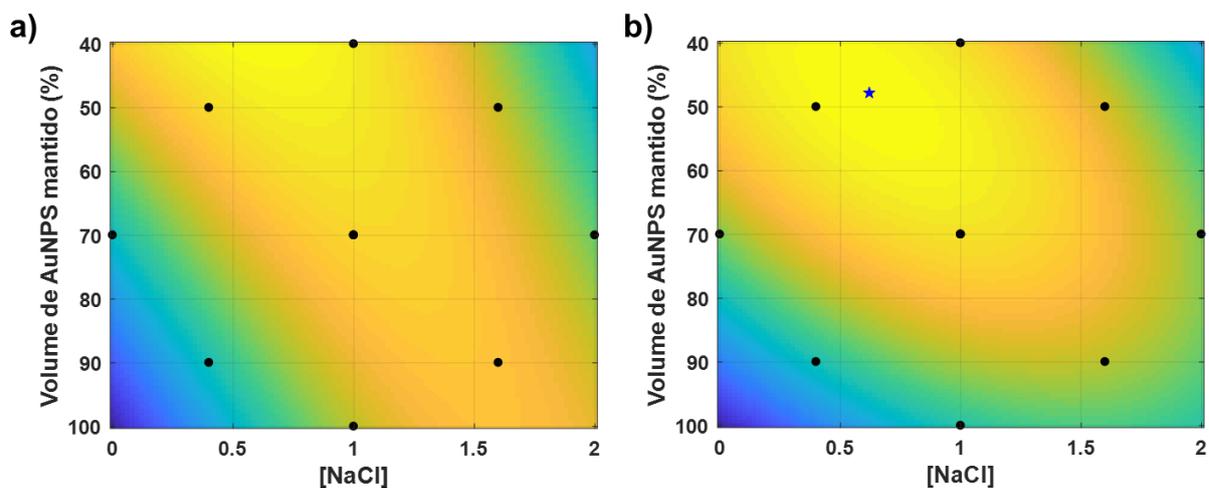


FIGURA 4.5 – Superfície de respostas a) empírica obtida a partir das respostas para TMP e, b) obtida a partir da equação 4.3 para SMX.

4.3.3. Efeito do pH da solução

Como avaliado anteriormente^{195,198}, o pH do analito pode influenciar no sinal SERS. Com uma solução contendo ambos os fármacos, na qual a concentração de SMX foi de $5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ e de TMP foi $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, variou-se o pH da solução com 150 μL de uma solução $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de HCl e $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH, e para a condição sem alteração no pH adicionou-se 150 μL de água ultrapura. As condições de análise foram as mesmas estabelecidas como ótimas pelo planejamento experimental. A Figura 4.6 apresenta os espectros SERS médios da região de separação para a solução sem alteração do pH, em pH ácido (adição de HCl), e em pH básico (adição de NaOH).

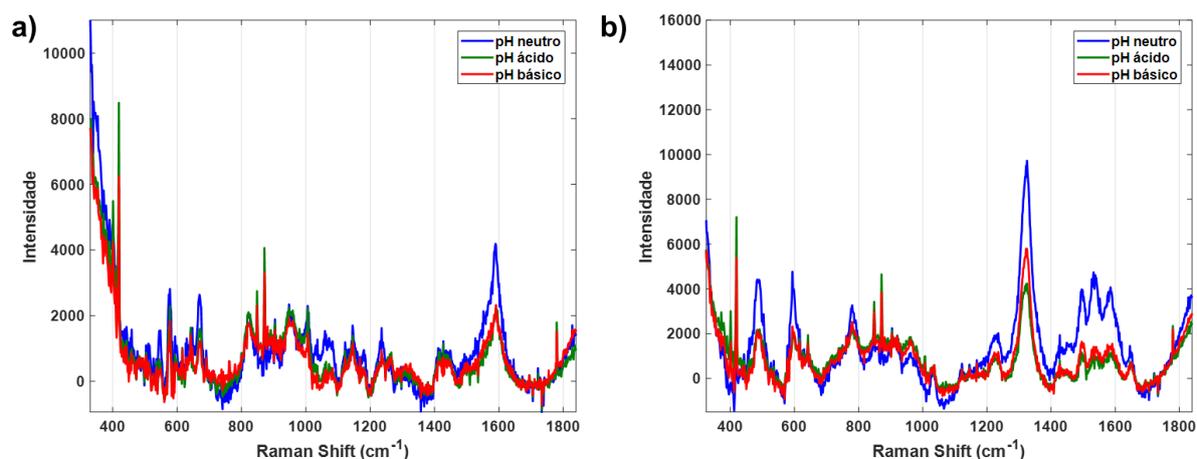


FIGURA 4.6 – Espectros SERS com variação no pH da solução de a) SMX e b) TMP.

Tanto para SMX quanto para TMP, os espectros em meio neutro exibem uma maior intensidade do que as amostras em meios ácido e básico. Uma possível explicação se dá pelo modo de adsorção proposto. Como TMP realiza a adsorção pelo anel pirimidínico, a dupla protonação das aminas primárias (em meio ácido) ou a forma neutra da molécula (em meio básico) afeta de forma negativa a interação com as nanopartículas, sendo que o efeito da protonação do anel é o mais pronunciado. Para SMX, tanto a protonação da amina terciária, quanto a deprotonação da amina secundária parecem não afetar de maneira significativa a adsorção do grupo isoxazol na superfície da nanopartícula. Por conta do maior sinal em meio neutro, realizou-se as análises de SERS-CCD sem alteração no pH.

4.3.4. Quantificação de SMX

As curvas de calibração foram realizadas de acordo com as melhores condições experimentais do planejamento e do estudo de pH. De forma resumida, as soluções contendo ambos os padrões foram separadas por CCD utilizando a fase móvel, AcEt:MeOH (75:15 v/v), seguido pela dispersão de 100 μL da solução coloidal de ouro pré-concentrada e 2 μL de NaCl 0,4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Cada ponto da curva foi realizado em triplicata.

Apesar de empregar a CCD para auxiliar a separação dos compostos e possibilitar a identificação por SERS, as amostras de leite apresentam uma grande complexidade química de forma que a presença de interferentes co-eluinto na região de separação dos analitos era esperada. Por isso, não foi possível empregar ferramentas quimiométricas de quantificação comumente empregadas para análises de imagens hiperspectrais como PLS¹⁹⁹ e CLS²⁰⁰ (mínimos quadrados clássicos).

Duas ferramentas quimiométricas de separação e resolução de sinais foram empregadas de forma a avaliar o desempenho das ferramentas. A Figura 4.7 apresenta os mapas de concentração, na região de separação do analito, recuperados por MCR-ALS e ICA (Figura 4.7-a e c respectivamente) para os pontos de calibração da curva de SMX e as respectivas curvas analíticas (Figura 4.7-b e d, respectivamente) obtidas a partir da correlação entre a concentração do analito e a área do mapa de concentração relativa na região de separação da banda cromatográfica para a componente com espectro mais similar ao espectro padrão do analito.

Ambas curvas apresentaram um desempenho satisfatória para análises por quantitativas por SERS, com uma faixa linear entre $5,00 \times 10^{-6}$ até $5,00 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹ de SMX, bastante abaixo dos limites encontrados para métodos convencionais de espectroscopia e com valores próximos aos reportados em métodos empregando cromatografia líquida^{122,201}. As curvas demonstraram uma boa linearidade dos dados para uma curva semi-log, onde foi aplicado o logaritmo na base 10 no eixo x (eixo das concentrações). Nenhuma diferença significativa foi observada nas curvas analíticas para ambas as ferramentas. Os métodos apresentaram o mesmo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,977$), destacando-se que os resultados por ICA apresentou um ajuste dos dados na curva ajustada, ligeiramente melhor que os resultados por MCR-ALS.

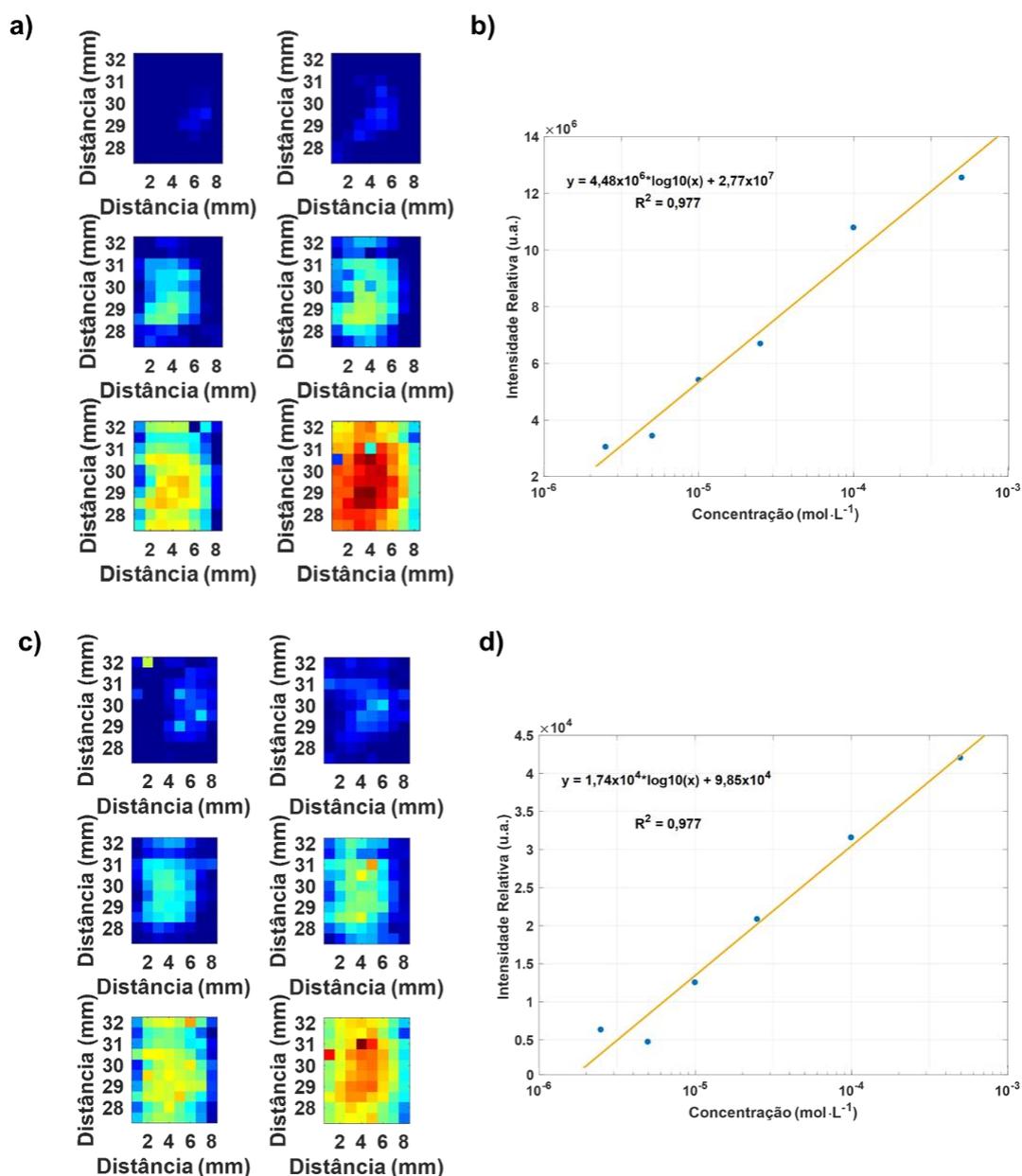


FIGURA 4.7 – Mapa de concentração relativa para SMX nos métodos a) MCR-ALS e c) ICA e curvas analíticas para SMX dos métodos b) MCR-ALS e d) ICA.

Em seguida, as curvas foram empregadas para a quantificação de SMX em amostras de leite. Devido à complexidade química das amostras de leite, não foi possível quantificar SMX nesta matriz. Interferentes presentes na amostra apresentaram uma separação cromatográfica muito próxima do analito, impedindo a interação entre SMX e as AuNPs, e suprimindo o sinal SERS. A

Figura 4.8 exibe o mapa de escores recuperados para dois interferentes, e para o analito (na região de separação usual deste).

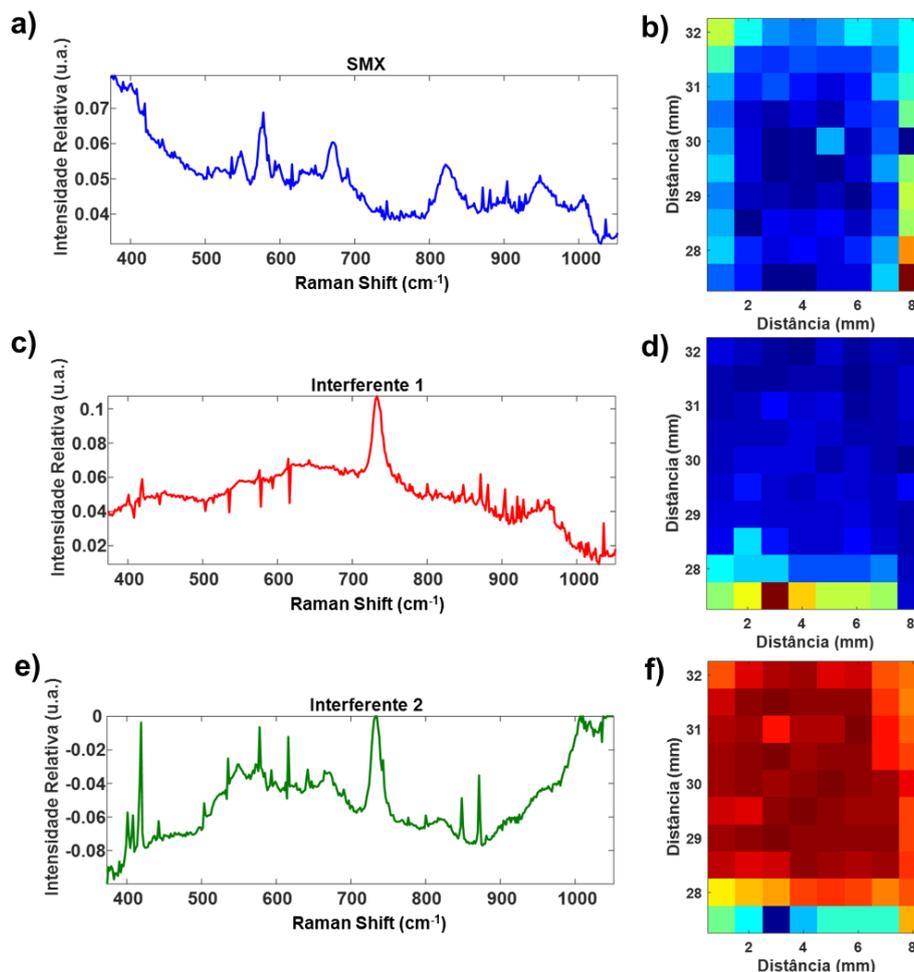


FIGURA 4.8 – Sinais recuperados e mapa de concentração relativa para SMX em leite: a) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para SMX, b) mapa de escores para SMX, c) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para Interferente 1, d) mapa de escores para Interferente 1, e) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para Interferente 2, b) mapa de escores para Interferente 2.

Mesmo com a presença dos interferentes, é possível notar alguns pixels isolados contendo o sinal do analito. Este resultado indica, que nas condições de separação apresentadas no trabalho, não é possível observar as regiões de separação do analito na placa cromatográfica e, portanto, não é possível quantificá-lo. Mas é possível detectá-lo, e por isso, esta técnica pode ser utilizada

como medida qualitativa para informar a presença ou ausência do fármaco em leite. Os resultados mostrados na Figura 4.8 se referem ao modelo por MCR-ALS, entretanto nenhuma diferença significativa foi observada por ICA.

4.3.5. Quantificação de TMP

Para TMP, a região espectral foi reduzida para melhorar a resolução dos espectros resolvidos. Utilizou-se uma janela espectral de Raman Shift de 1051 cm^{-1} a 1640 cm^{-1} , na qual foram selecionados 8 componentes por MCR-ALS e 7 componentes independentes por ICA. A Figura 4.9 apresenta os mapas de concentração, na região de separação do TMP, recuperados por MCR-ALS e ICA (Figura 4.9-a e c, respectivamente) e as respectivas curvas analíticas (Figura 4.9-b e d). Ambos métodos demonstraram um desempenho satisfatório na faixa linear de $1,00 \times 10^{-7}$ até $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TMP. Comparado com a curva para SMX, TMP apresentou uma linearidade mais limitada, na faixa de uma ordem de grandeza, enquanto SMX apresentou duas ordens de grandeza. Porém, como TMP exibiu uma melhor resposta ao sistema SERS, foi possível detectar TMP em níveis menores do que SMX, chegando em níveis de concentração abaixo do LRM exigido pela ANVISA.

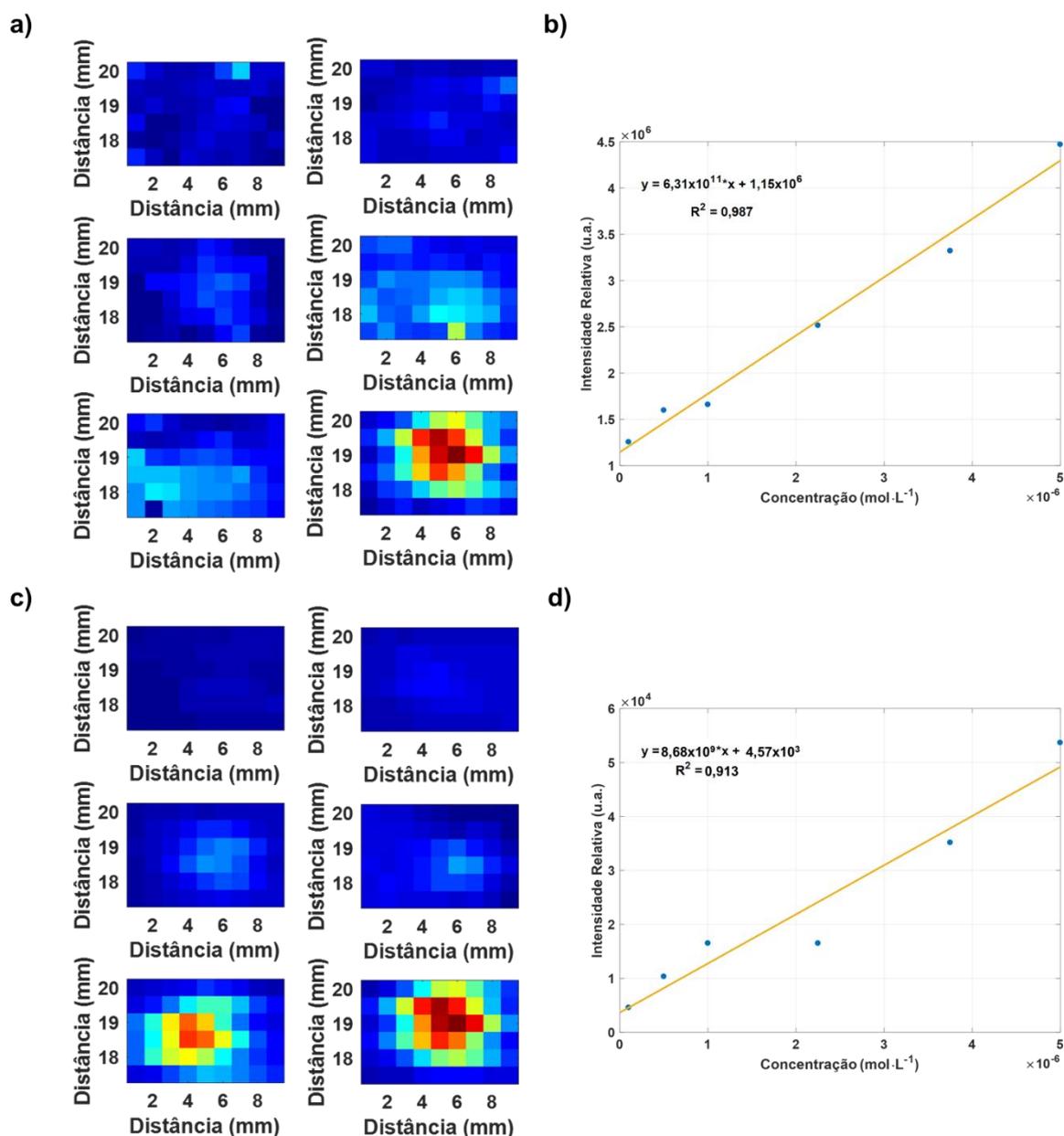


FIGURA 4.9 – Mapa de concentração relativa para TMP nos métodos a) MCR-ALS e c) ICA e curvas analíticas para TMP dos métodos b) MCR-ALS e d) ICA.

Diferente da quantificação por SMX, os resultados de TMP mostraram um melhor resultado para uma ferramenta multivariada comparada com a outra. Enquanto a curva por MCR-ALS resultou em um coeficiente de determinação de 0,987, o R^2 da curva por ICA foi de 0,913. A Figura 4.10 apresenta o espectro mais similar ao espectro SERS para SMX recuperado pelos dois métodos e seus

respectivos perfis cromatográficos em uma faixa da imagem hiperspectral. É possível notar que o espectro recuperado pelo modelo MCR-ALS apresenta uma maior quantidade de ruído, além de uma pequena influência da linha de base (Figura 4.10-a). Essa variabilidade também é observada no mapa de concentração relativa, que por se tratar de uma imagem obtida de uma placa cromatográfica apresenta o formato de um pico. O perfil cromatográfico recuperado por MCR-ALS (Figura 4.10-b) apresenta um maior ruído próximo da linha de base do pico, comparado com o recuperado por ICA (Figura 4.10-c). Apesar da diferença na qualidade do modelo, o ICA conseguiu recuperar um espectro mais próximo do espectro padrão sem muita influência do ruído. Além disso, seu perfil cromatográfico apresenta um formato mais próximo de uma gaussiana, esperado para este tipo de sinal.

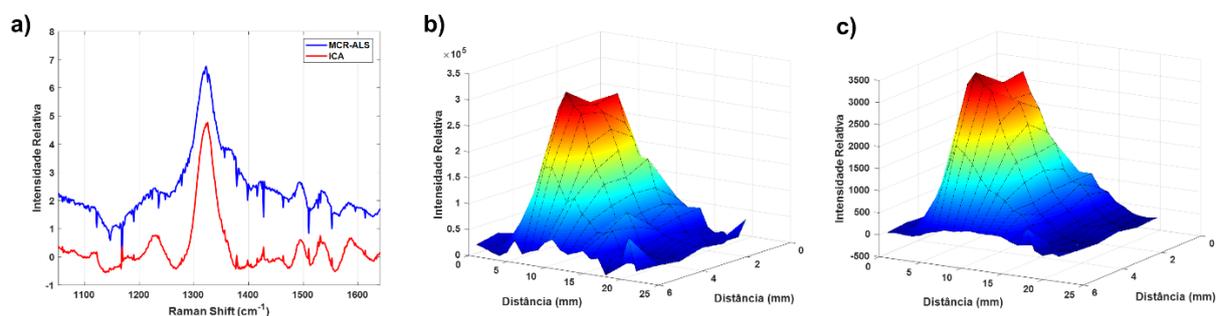


FIGURA 4.10 – Espectro recuperado mais similar ao espectro SERS para a) MCR-ALS e ICA, e o perfil de concentração (cromatográfico) para o padrão contendo $5,00 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de TMP recuperado por b) MCR-ALS e c) ICA.

Utilizou-se as curvas analíticas para a quantificação de TMP em amostras de leite. Diferente da quantificação de SMX, mesmo com a complexidade química da amostra foi possível detectar e quantificar TMP. A utilização de ferramentas quimiométricas de separação de sinal possibilitaram deconvoluir o sinal cromatográfico do analito na presença dos interferentes, gerando bandas de separação distintas para o analito e para os interferentes. A Figura 4.11 exhibe o

mapa de escores recuperados para dois interferentes e para o analito na região de separação usual do analito. Os resultados mostrados na Figura 4.11 se referem ao modelo por MCR-ALS, entretanto nenhuma diferença significativa (exceto o sinal menos ruidoso) foi observada por ICA.

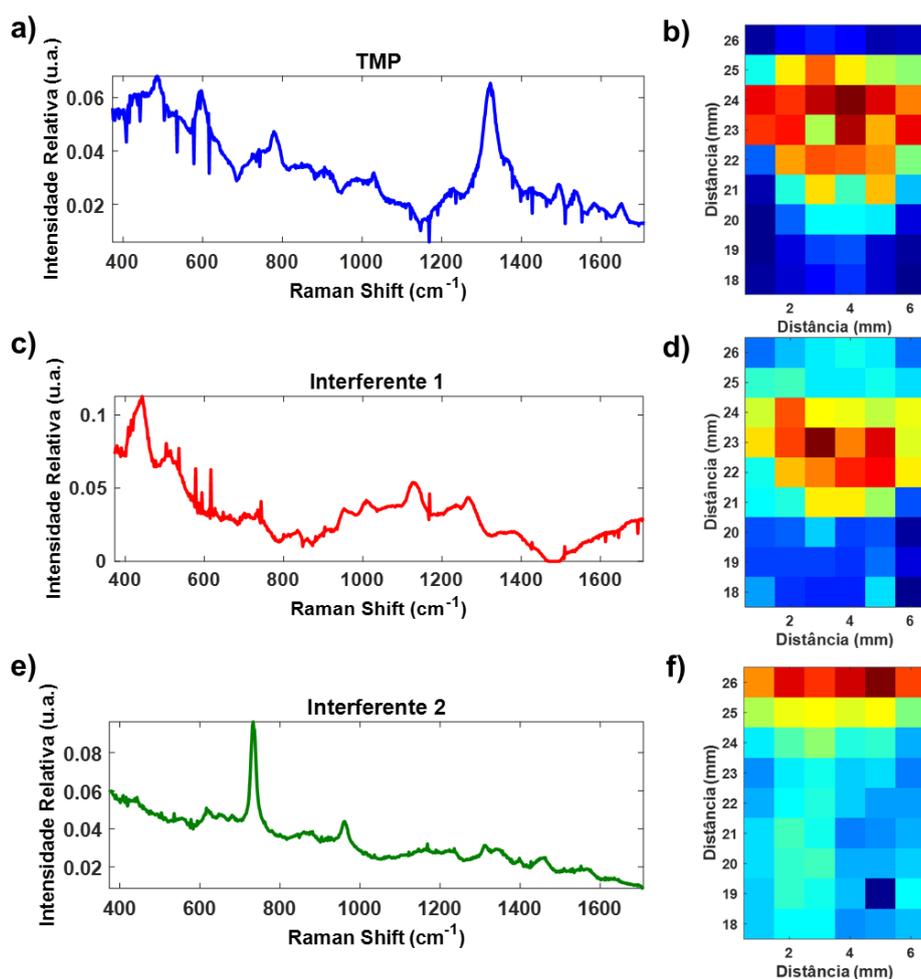


FIGURA 4.11 – Sinais recuperados e mapa de concentração relativa para TMP em leite: a) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para TMP, b) mapa de escores para TMP, c) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para Interferente 1, d) mapa de escores para Interferente 1, e) espectro SERS recuperado por MCR-ALS para Interferente 2, b) mapa de escores para Interferente 2.

Com a área das manchas cromatográficas, obteve-se os valores de recuperação, baseados nos três níveis de dopagem aplicado nas amostras: sem dopagem (Br), $1,70 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (D1) e $3,40 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (D2), apresentado na

Capítulo 4 – QUANTIFICAÇÃO DE SMX E TMP EM AMOSTRAS DE
LEITE BOVINO

Tabela 4.6. Nas amostras sem dopagem, não foi possível detectar a presença de TMP em nenhum pixel da região analisada, portanto o TMP não foi detectado (N.D.) nestas amostras, isto é, não havia TMP residual nas amostras comerciais, ou sua concentração estava abaixo do limite permitido e detectável pela técnica utilizada. Os resultados apresentaram valores de recuperação satisfatórios, principalmente, levando em consideração que parte do desvio padrão obtido deve-se a etapa de extração. As técnicas quimiométricas apresentaram um desempenho similar, com os valores de desvio padrão para ICA ligeiramente menores. Os resultados demonstram que a técnica SERS-CCD pode ser aplicada para a quantificação de TMP, mesmo em amostras complexas e com baixo limite de detecção.

TABELA 4.5 – Recuperação de TMP em amostras de leite com diferentes níveis de fortificação.

	Recuperação (%)	
	MCR-ALS	ICA
Leite A – Br	N.D.	N.D.
Leite B – Br	N.D.	N.D.
Leite C – Br	N.D.	N.D.
Leite A – D1	97,85 ± 6,40%	106,37 ± 14,82%
Leite B – D1	118,83 ± 23,75%	99,85 ± 14,63%
Leite C – D1	109,99 ± 1,88%	82,26 ± 16,53%
Leite A – D2	101,77 ± 21,94%	83,26 ± 1,03%
Leite B – D2	111,36 ± 19,42%	95,63 ± 8,20%
Leite C – D2	107,17 ± 14,74%	96,16 ± 12,94%

4.4. Conclusões

Foi realizado a detecção de SMX e TMP em amostras comerciais de leite bovino. Ao utilizar um planejamento de experimentos, na qual avaliou-se a pré-concentração de nanopartículas e a quantidade de agente aglomerante (NaCl) foi possível otimizar o sinal SERS obtido pela técnica possibilitando detectar estes analitos em concentrações próximas a seus LMR.

Devido à alta complexidade da matriz amostral, não foi possível quantificar SMX na presença de seus interferentes, mesmo com a aplicação de ferramentas quimiométricas de separação de sinal. Entretanto, foi possível detectar a presença do fármaco quando este estava presente na amostra, demonstrando que a técnica poderia ser utilizada com fins qualitativos.

Os resultados mostraram valores de recuperação satisfatórios para a recuperação de TMP em amostras de leite, não havendo distinção entre as técnicas quimiométricas empregadas. Tanto o ICA quanto o MCR-ALS conseguiram separar o sinal do analito na presença de seus interferentes, e foi possível quantificar TMP em sua concentração máxima permitida em amostras alimentícias.

**CAPÍTULO 5 – ESTUDO MULTIVARIADO DA
ESTABILIDADE DE VINHO TINTO**

5. ESTUDO MULTIVARIADO DA ESTABILIDADE DE VINHO TINTO

5.1. Introdução e Objetivos

Um dos maiores problemas na produção, fermentação e estocagem de vinhos se dá devido ao processo de oxidação e degradação de compostos importantes para a sua composição¹²⁸. Estes compostos são os principais responsáveis pelo aroma, sabor e coloração do vinho além de terem importância nutricional¹³⁰. Para assegurar a qualidade do vinho, testes de estabilidade forçada são realizados para avaliar quais fatores geram reações de degradação e oxidação dos seus componentes¹²⁹.

Fatores como temperatura, tempo de estocagem, quantidade de agentes antioxidantes e pH são variáveis determinantes para os estudos de estabilidade de vinhos. Em condições reais, tais fatores ocorrem de maneira simultânea nas amostras, podendo gerar diferentes rotas de degradação. Assim, uma análise multivariada destes fatores poderia demonstrar de maneira mais efetiva a contribuição de cada um deles na estabilidade do vinho.

Este trabalho tem como objetivo utilizar o método de SERS-CCD para criação de *fingerprints* de vinhos submetidos a diferentes condições de degradação forçada, além de utilizar as ferramentas quimiométricas, ICA e ANOVA-PCA, para analisar de forma concomitante a estabilidade de um vinho tinto submetido a diversas condições de degradação, tais como: temperatura, pH, concentração de SO₂ e de O₂ dissolvido, possibilitando avaliar os fatores de degradação de forma simultânea e identificar a contribuição de cada fator na degradação da amostra.

5.2. Parte Experimental

5.2.1. Otimização das condições de separação dos compostos

Inicialmente, foi avaliada a fase móvel para a separação da amostra, utilizando placas cromatográficas de camada delgada. A cromatografia em camada delgada (CCD) foi empregada em placas de alumínio contendo 200 μm de espessura de sílica gel-60 e indicador fluorescente para 254 nm, da Macherey-Nagel. Nas placas de CCD (com dimensões de 5 cm de altura por 1 cm de largura), 2 μL da amostra foram posicionados na placa com o auxílio de uma micropipeta, a uma distância de 0,5 cm do início da placa. A fase móvel correu por uma distância de 4,5 cm, resultando em uma região útil de separação de 4 cm. Foram avaliados quatro tipos de fases móveis: acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (20:2:2:4 v/v/v/v)²⁰²; etanol; acetato de etila e acetona. Em seguida, avaliou-se o pH da fase móvel pela adição de soluções de HCl 0,1 mol·L⁻¹ e NaOH 0,1 mol·L⁻¹, e a quantidade de agente aglutinante (NaCl) nas nanopartículas. Os testes iniciais foram realizados com uma amostra de vinho tinto.

5.2.2. Revelação das amostras por lâmpada UV

Após a separação dos compostos, a placa de CCD foi avaliada visualmente por meio de uma câmara escura contendo uma lâmpada UV de 254 nm. As placas que mostraram uma melhor revelação e separação uniforme foram avaliadas por SERS-CCD.

5.2.3. Formação de nanopartículas de prata

Para a síntese das nanopartículas de prata (AgNPs), seguiu-se o procedimento descrito por Lee e Meisel¹⁸⁰. Para tal, adicionou-se 19 mg de nitrato de prata (AgNO₃ – Vetec 99.8%) em 100 mL de H₂O ultrapura (18.2 M Ω ·cm⁻¹). A solução foi aquecida até 90 °C. Em seguida, adicionou-se 8,0 mL de uma solução 1,0 % (m/m) de citrato trissódico (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O – J. T. Baker 99,0%). A solução foi mantida sob agitação e aquecimento durante 60 minutos. Durante esse período, a solução passou de um aspecto translúcido para uma coloração amarelada e em seguida, um amarelo acinzentado. A reação foi resfriada até

temperatura ambiente, e em seguida, ajustou-se seu volume para 100 mL. O tamanho médio das partículas foi obtido a partir de imagens adquiridas em um microscópio eletrônico de transmissão (MET) TEM-MS (JEOL 2100) operando a uma voltagem de aceleração de 200 kV. Realizou-se a contagem de 318 partículas em duas diferentes direções, sendo utilizado a média das duas medidas como o tamanho da partícula.

5.2.4. Análise SERS

As análises de SERS-CCD foram feitas em um espectrômetro Raman portátil i-Raman BWS 415-785H (B&W Tek, Newark, DE), com laser vermelho de 785 nm e resolução espectral de $3,5 \text{ cm}^{-1}$. A sonda do equipamento (BAC102) com ponto focal de 85 μm foi posicionada sobre uma mesa posicionadora XY para obter os espectros em função da distância percorrida pelos compostos na placa de CCD. Os espectros foram adquiridos com um tempo de aquisição de 15 segundos e uma potência de laser de 63 mW, com distâncias de 1 mm entre cada espectro sobre a superfície da CCD. Para a medida das placas, dispersou-se a solução de Ag NPs por um sistema de nebulização sobre a placa cromatográfica após a corrida, utilizando o aparato descrito no capítulo 3, seção 3.2.4.

5.2.5. Planejamento de degradação forçada do vinho tinto

Após a otimização das condições de separação e das condições de análise, foi realizado o planejamento de degradação forçada de uma amostra de vinho tinto Bordeaux, safra 2015. A amostra de vinho tinto foi submetida a 8 diferentes condições de degradação, de acordo com o planejamento fatorial 2^3 apresentado na Tabela 5.1. Sendo que os fatores nos níveis mais baixos ($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, $4,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de O_2 dissolvido e $\text{pH} = 3,38$), são as condições padrões do vinho analisado, ou seja, sem nenhuma alteração nesses fatores.

TABELA 5. 1 – Planejamento fatorial do tipo 2³ aplicado na degradação forçada do vinho.

Experimento	SO₂	O₂ dissolvido	pH
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

TABELA 5. 2 – Valores codificados para a degradação forçada do vinho.

Nível	-1	1
SO₂	5 mg·L ⁻¹ de Na ₂ S ₂ O ₅	55 mg·L ⁻¹ de Na ₂ S ₂ O ₅
O₂ dissolvido	4,8 mg·L ⁻¹	7,3 mg·L ⁻¹
pH	3,4	4,4

Os valores de pH foram obtidos a partir de medidas em um pHmetro de bancada modelo pH 21 (HANNA Instruments, EUA). O pH da solução foi alterado pela adição gota a gota de uma solução 0,1 mol·L⁻¹ de NaOH até o pH da solução atingir o valor de 4,4. O valor de oxigênio dissolvido foi medido em um analisador portátil de oxigênio dissolvido modelo HI 9142 (HANNA Instruments, EUA). Para aumentar a quantidade de oxigênio dissolvido, borbulhou-se na amostra de vinho ar sintético (grau de pureza 5.0) até o medidor informar o valor pretendido. SO₂ no vinho foi determinado pelo método de Ripper²⁰³. A titulação por Ripper é o método padrão utilizado para se determinar SO₂ em vinhos, e baseia-se na reação redox entre os íons bissulfito (HSO₃⁻) e o triiodeto (I₃⁻).

Cada uma das condições de degradação da amostra (8 experimentos) foi submetida à três diferentes temperaturas de estocagem: temperatura de geladeira (4 °C), temperatura ambiente (24 °C) e temperatura aquecida (40 °C). Para avaliar o parâmetro cinético da degradação, as amostras foram analisadas durante um período de 45 dias, com intervalos de 5 dias.

5.2.6. Métodos quimiométricos

Primeiramente, realizou-se a normalização de cada placa de CCD pela área para eliminar variações de intensidade referentes a cada quantidade de nanopartículas pulverizada, em seguida realizou-se a média das 3 replicatas. Os espectros foram alisados pela média móvel ($n=7$) e ajustou-se a linha de base por mínimos quadrados ponderados, resolvendo a linha de base para uma função polinomial de segunda-ordem. Todos os dados foram organizados na forma de um tensor em um tensor $\bar{\mathbf{X}} (t \times n \times i \times j)$, onde t são os dias do estudo cinético ($t = 10$), n é o número de experimentos ($n = 24$), i é a separação cromatográfica ($i = 40$) e, j é o espectro SERS ($j = 851$).

Como o ICA, trata-se de um método bilinear, os dados do tensor $\bar{\mathbf{X}}$ foram desdobrados no sentido da coluna gerando uma matriz aumentada \mathbf{X}_{aug} de dimensões $t \times n \times i$ por j , de acordo com a Figura 5.1. Utilizou-se o algoritmo JADE para a separação dos sinais das 10 componentes independentes (ICs) determinadas pelo método de ICA por blocos. Em seguida, calculou-se a área cromatográfica de cada um dos experimentos para as 10 componentes independentes e utilizou-se o método de ANOVA-PCA para identificação dos fatores mais relevantes para a degradação do vinho. Todo o tratamento quimiométrico utilizado foi feito usando o ambiente MATLAB 2011a.

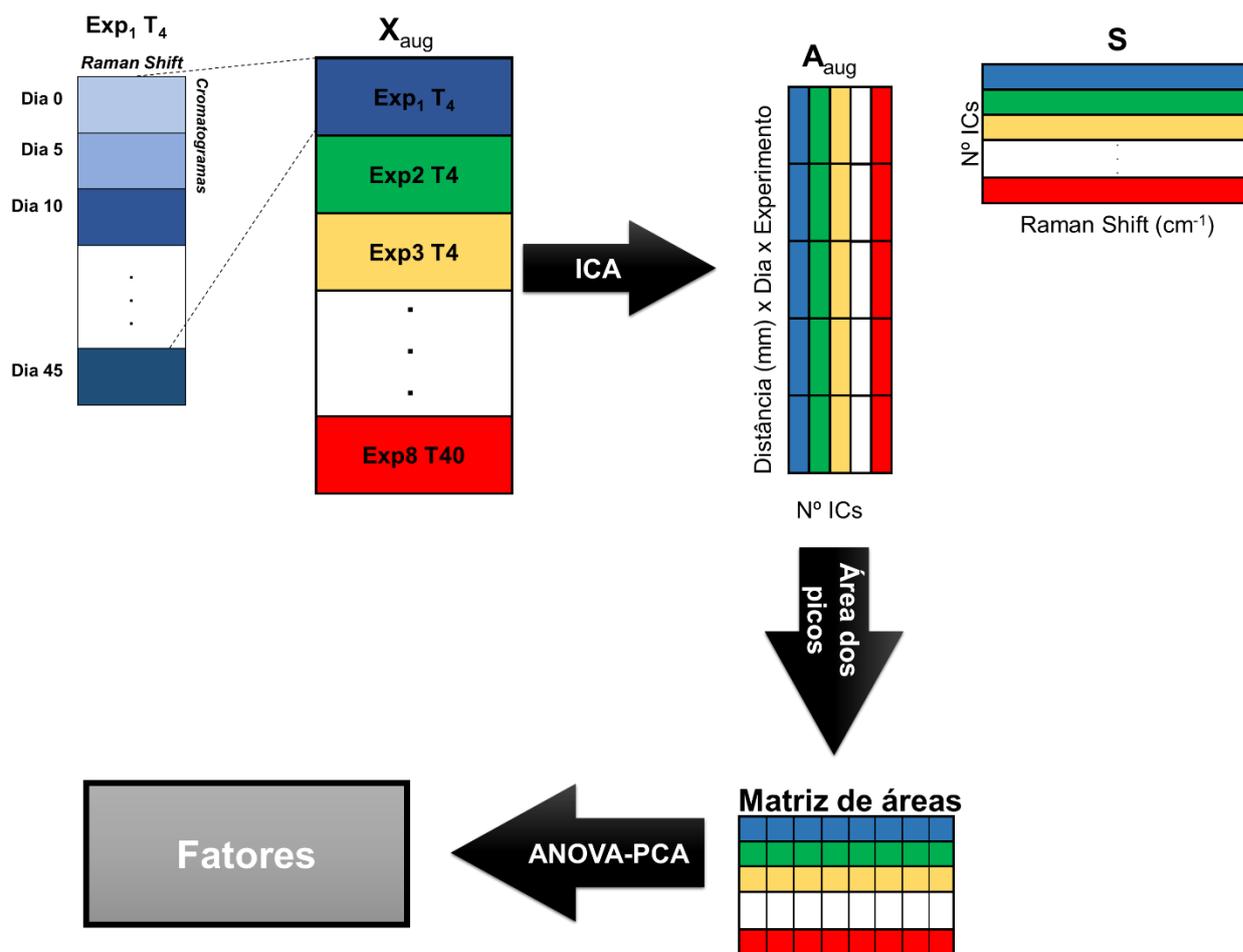


FIGURA 5.1 – Representação esquemática do tratamento quimiométrico utilizado

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Caracterização das AgNPs

A Figura 5.1 apresenta uma imagem de microscopia eletrônica de transmissão para as nanopartículas de prata e o seu gráfico de distribuição de tamanho. Pela Figura 5.1-a, é possível observar que as partículas não apresentam um formato bem definido, com algumas espécies com formato esférico, algumas hexaédrico e outras sem formato definido. Desta forma, utilizou-se duas direções da partícula para se calcular o seu tamanho médio. A Figura 5.1-b) apresenta a dispersão do tamanho das partículas, com mais da metade das partículas contabilizadas na região de 60 – 90 nm, resultando em um valor médio de $73,41 \pm 30,32$ nm. Apesar de ser observado algumas partículas com tamanhos

bem acima da média, variando entre 180 e 360 nm, estas partículas correspondem a menos de 5 % do total de partículas contabilizadas, não afetando de forma significativa o efeito SERS.

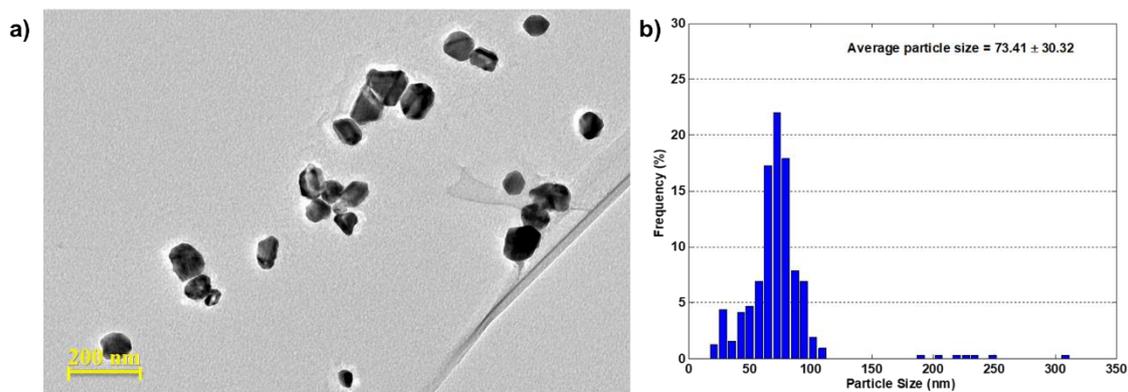


FIGURA 5.2 – Caracterização das AuNPs por MET: a) imagem de MET e b) histograma de frequência do tamanho de partícula com o tamanho médio e o desvio padrão.

5.3.2. Otimização das condições de análise SERS-CCD

Após a caracterização das nanopartículas de prata, estudou-se as melhores condições para as análises por SERS. Para cada experimento, aproximadamente 4 μL de cada amostra foram adicionados em uma placa de CCD e avaliadas utilizando uma lâmpada UV de 254 nm. A Figura 5.3 apresenta as imagens das placas cromatográficas reveladas sob a luz UV para a separação utilizando a fase móvel apresentada na literatura²⁰² como melhor mistura de solventes para a separação de vinho tinto, e três solventes puros.

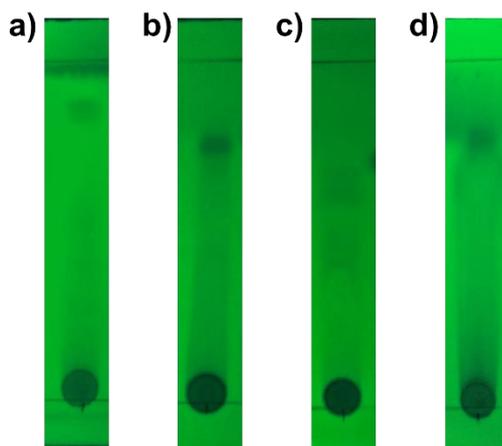


FIGURA 5.3 – Placas de CCD para uma amostra de vinho tinto reveladas por luz UV_{254nm} utilizando diferentes solventes: a) acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (20:2:2:4 v/v/v/v)²⁰², b) etanol, c) acetato de etila, d) acetona.

É possível observar que todos os solventes apresentados demonstraram uma separação visual similar: com boa parte da amostra contida na região inicial da placa cromatográfica, uma banda mais concentrada com R_f entre 0,77 – 0,84 (com exceção do acetato de etila), e uma quantidade de compostos dispersos entre as duas bandas. Por conta disso, foram realizadas medidas SERS-CCD nas quatro fases móveis de forma a selecionar o melhor procedimento a partir de informação espectral.

A Figura 5.4 apresenta os cromatogramas-SERS da amostra separadas pelas quatro fases móveis. Apesar de apresentar diferentes espectros SERS, com bandas bem resolvidas por toda a faixa de separação, a placa submetida a separação pela fase móvel da literatura (Figura 5.4-a)) apresentou o sinal SERS menos intenso quando comparado com as demais fases móveis. A placa separada por acetona mostrou uma boa intensidade do sinal SERS, porém com a maior parte dos compostos (ou grupo de compostos) na região inicial da placa. Assim como a placa por acetato de etila, que apresentou duas regiões de separação bem intensas na parte inicial da placa, e um composto ou grupo de compostos que foi eluído até o final da mesma (observado pelo mesmo sinal SERS na região de 10 a 30 mm de separação). A fase móvel de etanol puro foi a única placa de CCD

que apresentou um bom sinal com diferentes espectros SERS separados ao longo da placa de CCD. Por isso, selecionou-se etanol puro como a melhor fase móvel para conduzir os experimentos por SERS-CCD.

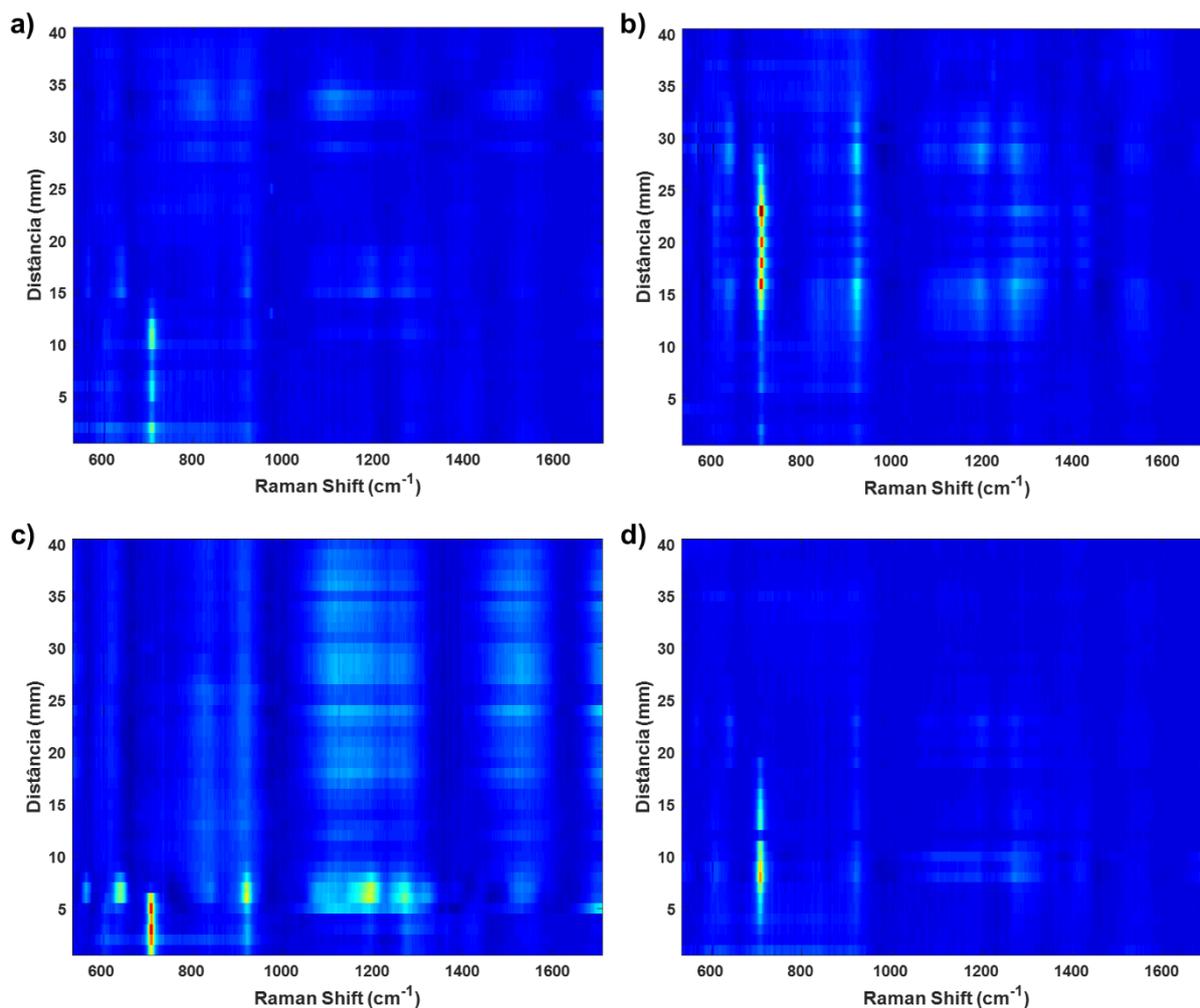


FIGURA 5.4 – SERS-CCD da amostra vinho tinto utilizando diferentes solventes: a) acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (20:2:2:4 v/v/v/v)²⁰², b) etanol, c) acetato de etila, d) acetona.

Com as condições de separação estabelecidas, realizou-se um estudo para otimizar o pH da solução da fase móvel de modo a aumentar a intensidade do sinal SERS. Foram feitas corridas na placa cromatográfica com três alterações de pH para uma única amostra. Para o pH ácido utilizou-se a fase móvel etanol:HCl (0,1 mol·L⁻¹) (9:1 v/v), para o pH básico utilizou-se a fase móvel etanol:NaOH (0,1 mol·L⁻¹) (9:1 v/v) e para fins de comparação, utilizou-se a fase móvel etanol:H₂O

(9:1 v/v). A Figura 5.5 apresenta os cromatogramas-SERS para as fases móveis em diferentes pHs, na qual pode-se observar que os espectros em pH ácido se mostraram com intensidade igual ou maior quando comparado aos outros valores de pH, apresentando uma segunda região de separação com uma boa intensidade de sinal (por volta de 30 mm). Assim, escolheu-se trabalhar com a fase móvel em pH ácido (etanol:HCl (0,1 mol·L⁻¹) (9:1 v/v)).

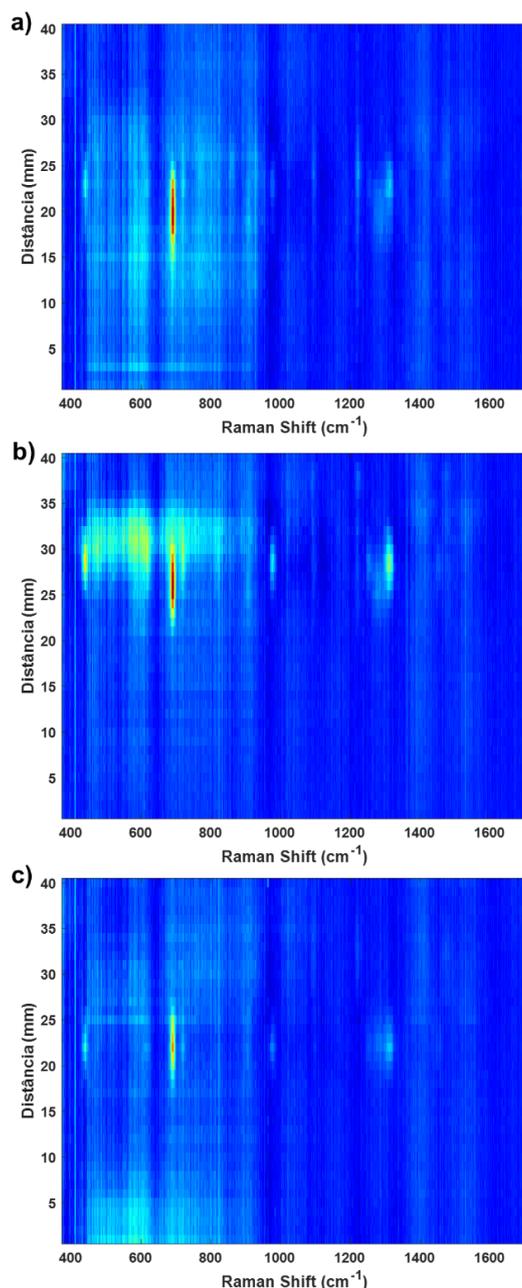


FIGURA 5.5 – SERS-CCD da amostra vinho tinto com a fase móvel em diferentes pHs: a) etanol:H₂O (9:1 v/v), b) etanol:HCl (0,1 mol·L⁻¹) (9:1 v/v) , b) etanol:NaOH (0,1 mol·L⁻¹) (9:1 v/v).

Por fim, realizou-se um teste com a quantidade de agente aglomerante (NaCl) nas nanopartículas de prata. Foram estudadas condições de análise sem adição de NaCl, com $0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl e $0,04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl em solução coloidal de AgNPs. A Figura 5.6 apresenta os cromatogramas-SERS para as diferentes condições de sal. Nota-se um claro aumento do sinal SERS para maiores quantidades de NaCl. Tal fato era esperado, uma vez que uma maior quantidade de agente aglomerante na solução coloidal promove a criação de mais *hot spots* com as nanopartículas, onde as moléculas alvo sofrem uma maior interação do efeito do *plasmon* de superfície, assim intensificando o sinal SERS. Entretanto, quantidades de sal muito altas podem levar a uma desestabilização da solução coloidal, causando a precipitação das AgNPs. No sistema proposto, a precipitação ocorria em concentrações acima de $0,04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

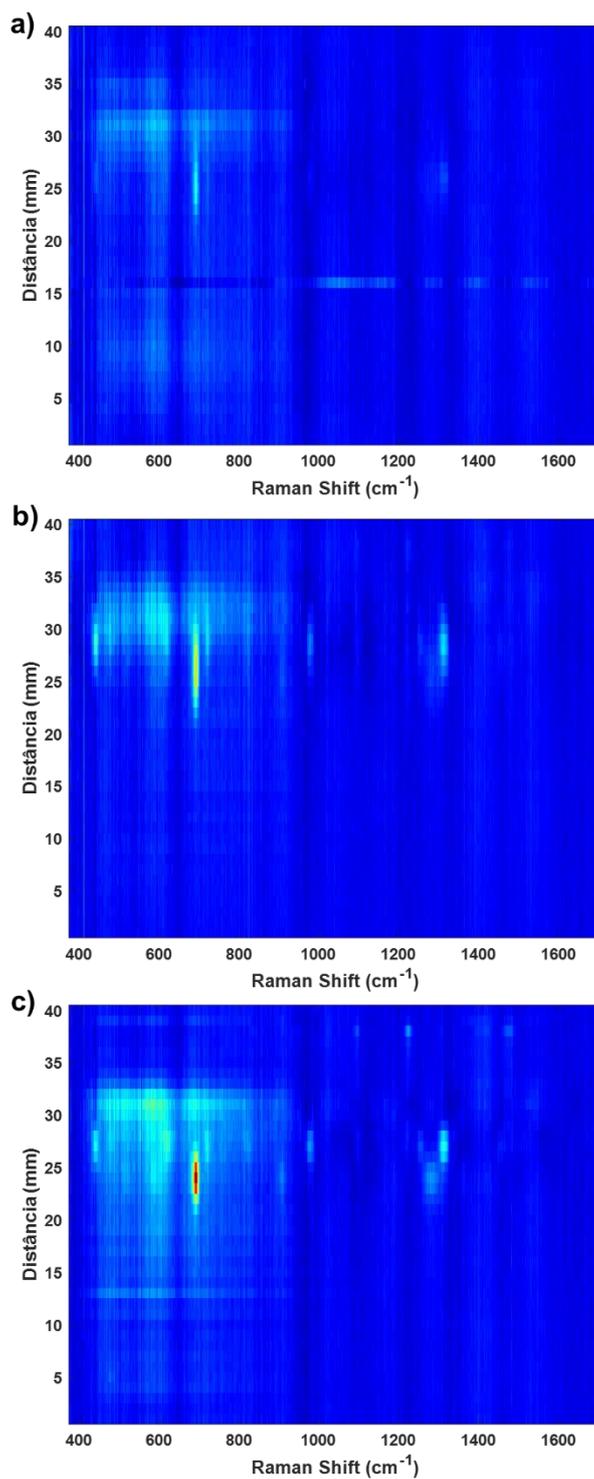


FIGURA 5.6 – SERS-CCD da amostra vinho tinto a) sem adição de NaCl, b) com 0,02 mol·L⁻¹ de NaCl, e c) com 0,04 mol·L⁻¹ de NaCl.

5.3.3. Estudo multivariado da degradação forçada de vinho tinto

O estudo de degradação forçada do vinho foi avaliado em dois aspectos: caracterização das componentes detectadas pelo SERS-CCD durante a degradação e identificação dos fatores significativos avaliados pelo estudo. Inicialmente será abordado os componentes independentes recuperados pelo ICA e o perfil cinético de cada componente a partir da área cromatográfica referente a componente. Apesar da espectroscopia Raman não apresentar uma seletividade tão alta quanto as técnicas de cromatografia e espectrometria de massas, e as amostras de vinho serem matrizes amostrais bastante complexas, esforços foram feitos para propor possíveis compostos (ou grupo de compostos) detectados pela técnica e que apresentaram alguma variação significativa durante o monitoramento.

Na análise, por ICA foram utilizados 10 componentes independentes, estimadas pelo critério de ICA por blocos. As Figuras 5.7 até 5.16 apresentam os sinais dos 10 componentes recuperados para o modelo ICA e seu perfil cinético da degradação, onde o valor apresentado é o valor médio obtido pelos 8 experimentos do planejamento fatorial, e as barras de erro são referentes as diferenças na concentração relativa de cada experimento. Devido ao alto ruído instrumental inerente das análises SERS, espalhamento térmico da sílica presente na placa de CCD e desvios de linha de base, algumas componentes independentes apresentam uma significativa influência de sinais ruidosos, como a primeira componente independente apresentada na Figura 5.7. Apesar de apresentar um banda mais evidente em 1020 cm^{-1} , referente a desdobraimento O-H¹⁸⁹, a quantidade de ruído da componente dificulta sua caracterização. Além disso, seu perfil cinético não apresenta uma evidência clara, tanto de produto de degradação (formação com o tempo) ou composto sendo degradado (diminuição com o tempo), podendo associar esta componente ao ruído inerente da técnica.

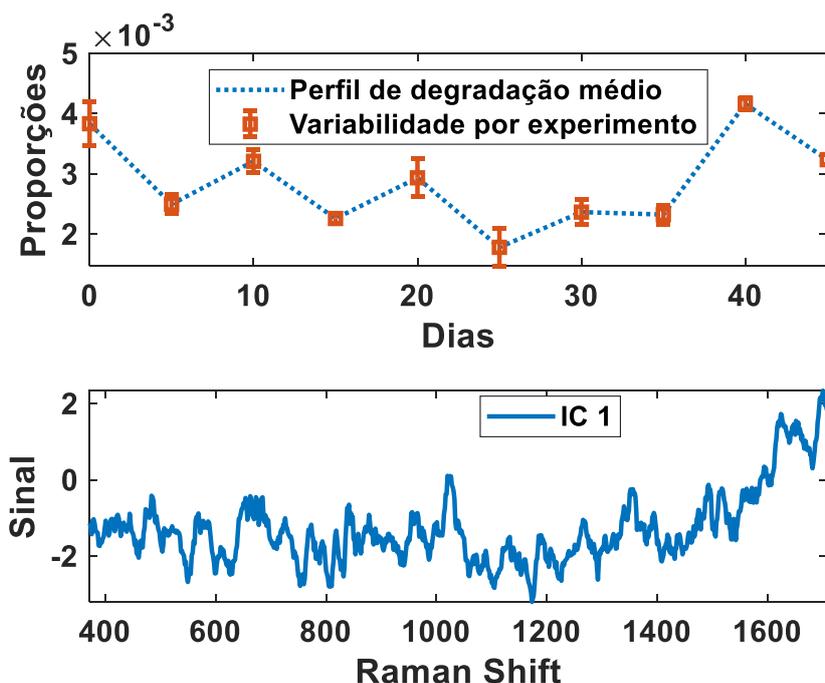


FIGURA 5.7 – Primeira componente independente (IC1) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

A segunda componente independente (Figura 5.8) demonstra um dos sinais recuperados mais bem resolvidos, com pouco ruído atrelado. O espectro da IC2 é bastante similar aos espectros SERS da adenosina, reportados na literatura²⁰⁴⁻²⁰⁶, com um perfil cinético esperado para compostos em degradação, isto é, com um perfil de concentração relativo que decai com o passar do tempo. Nota-se que a estabilidade da IC2 é baixa uma vez que há uma boa diferença de concentração relativa do dia 0 (controle) para o dia 5, com uma baixa degradação nos dias seguintes. Portanto, esta componente pode ser utilizada como marcador de frescor do vinho, podendo ser associado a algum composto mais lábil que se degrada durante as primeiras reações de oxidação do produto.

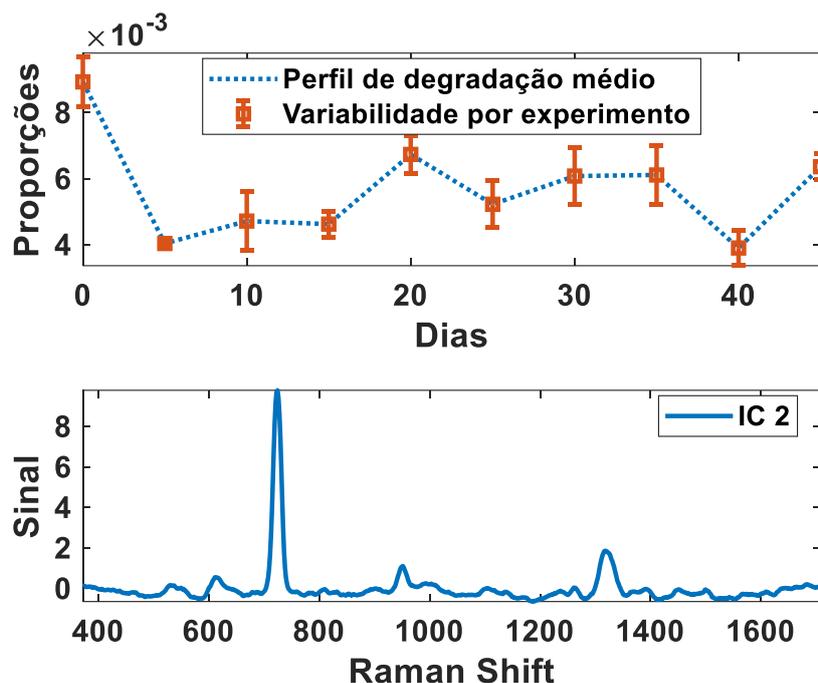


FIGURA 5.8 – Segunda componente independente (IC2) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

A terceira componente independente (Figura 5.9) mostra um perfil cinético representativo de compostos formados pelas condições de degradação, com uma taxa de formação relativamente lenta tendo uma maior concentração relativa por volta dos 40 dias. Entretanto, alguns dos picos com maior resolução são referentes a ligações químicas presentes em um grande conjunto de moléculas, tais como: vibração estrutural de arranjos cristalinos (em 410 cm^{-1}), desdobramentos C–O fora do plano (em 604 cm^{-1}), desdobramentos C–H (em 1303 cm^{-1}) e desdobramentos H–C–H no plano (em 1430 cm^{-1})¹⁸⁸. Entretanto, considerando os picos observados e as rotas conhecidas para a degradação do vinho, pode-se propor como caracterização da IC3 alguns isoprenóides oxidados, como a vitispirana e damascenona, por se tratarem de produtos de degradação do vinho com uma cinética de formação mais lenta associados a coloração amarronzada. Esta coloração foi bastante presente nos últimos dias dos experimentos.

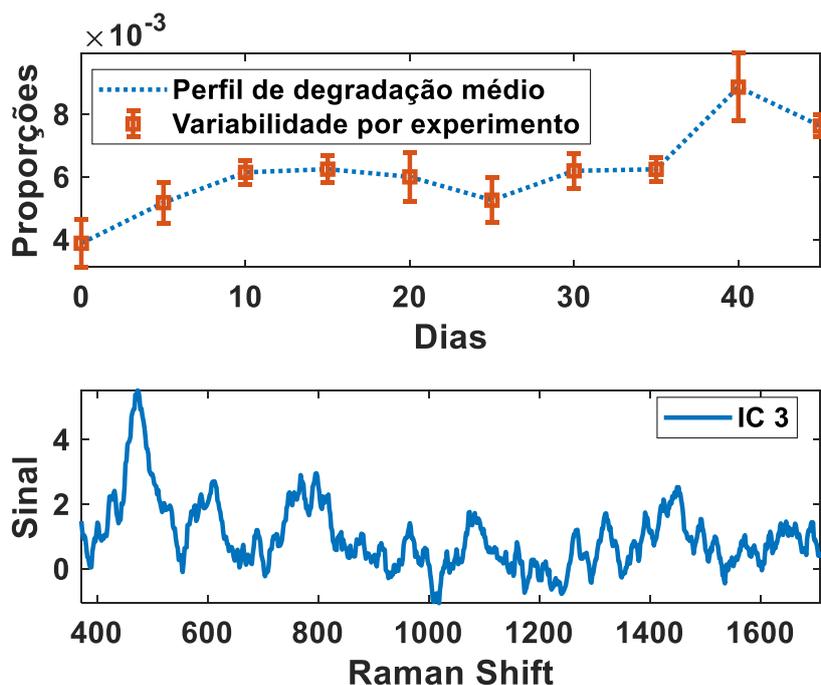


FIGURA 5.9 – Terceira componente independente (IC3) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

A IC4 (Figura 5.10) também exibe um perfil espectral bastante ruidoso. Como o perfil cinético apresenta um sinal negativo, a IC4 resulta em um perfil cinético esperado para uma componente referente a um produto degradado com uma baixa taxa de degradação. Os picos mais intensos na região de 840 até 1100 cm^{-1} (845, 868, 956 e 1066 cm^{-1}) são usualmente atribuídos a ligações estruturais C–O–C e C–C de sacarídeos ou furanos. Mesmo após a fermentação da uva, é comum encontrar sacarídeos residuais (1 - 4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em vinhos secos e $> 100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em vinhos doces). Estes sacarídeos degradam lentamente após a fermentação do vinho por reações de Maillard, gerando furanos e 2-furfural, além de alterar a coloração e aroma do vinho com notas de caramelo¹²⁷.

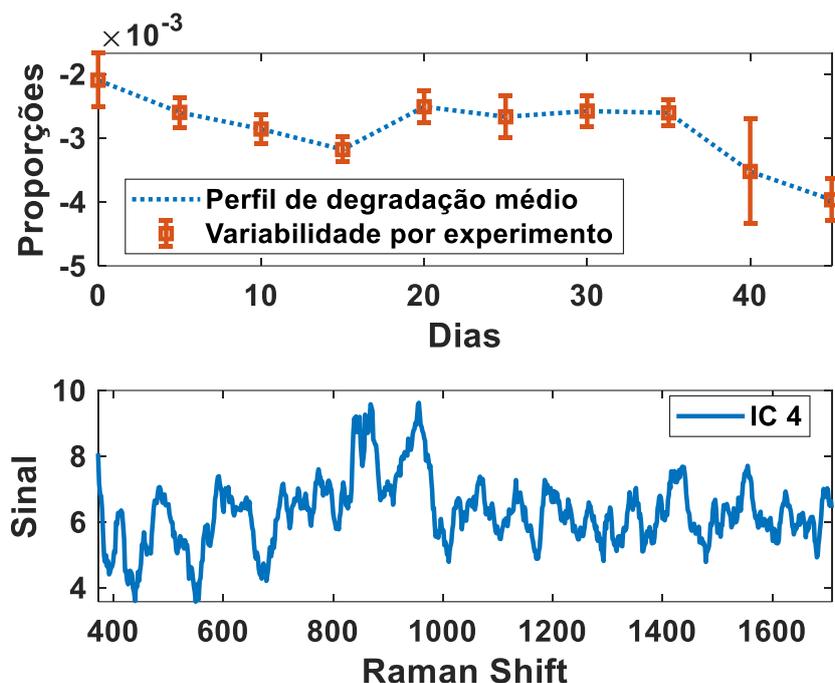


FIGURA 5.10 – Quarta componente independente (IC4) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

O perfil cinético da IC5 (Figura 5.11) é típico de um intermediário reacional, sendo produzido após alguns dias, onde com 15 dias tem seu ápice e seguido pela diminuição de sua concentração relativa. Vale ressaltar que, com 20 dias houve um decréscimo significativo da concentração relativa desta componente, porém esta pode ser um *outlier*. Zaffino et. al. identificaram picos semelhantes aos apresentados na IC5 como antocianinas derivadas de fontes vegetais por SERS²⁰⁷. Dentre eles, destacam-se o pico em 640 cm^{-1} referente ao estiramento C–C no plano, 755 cm^{-1} associado a respiração do anel, 865 cm^{-1} relativo a vibração estrutural da ligação C–O–C, 1020 cm^{-1} relativo à vibração O–H, 1240 cm^{-1} atribuído à vibração da ligação C–O–H e em 1347 cm^{-1} referente a vibração do anel aromático. As antocianinas glicosiladas são usualmente geradas durante as etapas de fermentação e maturação do vinho, formadas a partir da condensação de tanino com outros compostos. Em condições adversas, as antocianinas glicosiladas podem degradar formando diversos pigmentos ou compostos mais simples, como o acetaldeído¹²⁷.

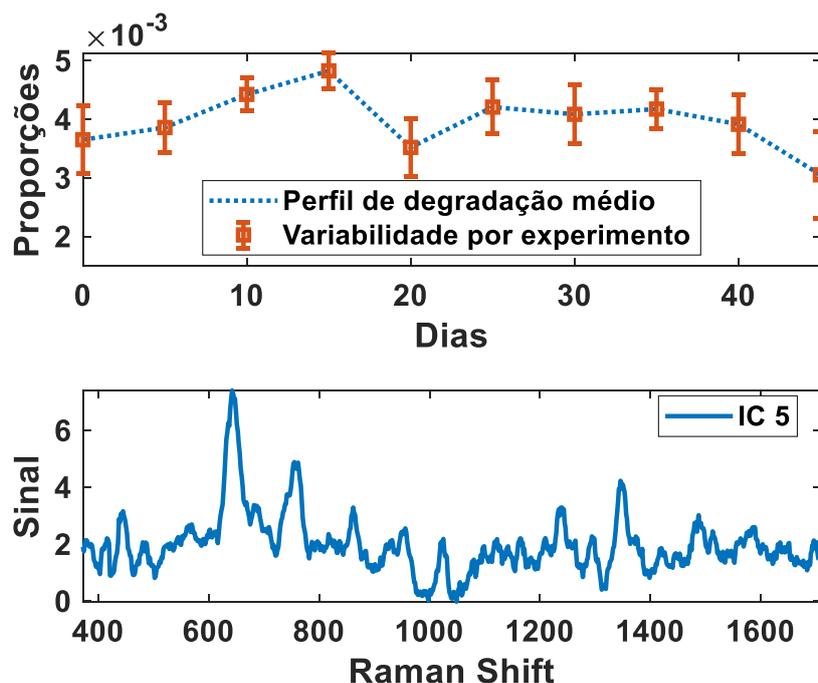


FIGURA 5.11 – Quinta componente independente (IC5) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

Os valores de área cromatográfica recuperados pela IC6 (Figura 5.12) tem um perfil cinético similar à de um produto formado durante a degradação forçada do vinho, com os principais picos em 996, 1324 e 1489 cm^{-1} . Todos picos referentes a vibrações de anel piridínico, sendo o primeiro relacionado a respiração do anel, o segundo a vibração estrutural do anel e o último, a deformação do anel¹⁸⁸. Por conta da complexidade da amostra e da pouca informação espectral, não foi possível caracterizar essa componente.

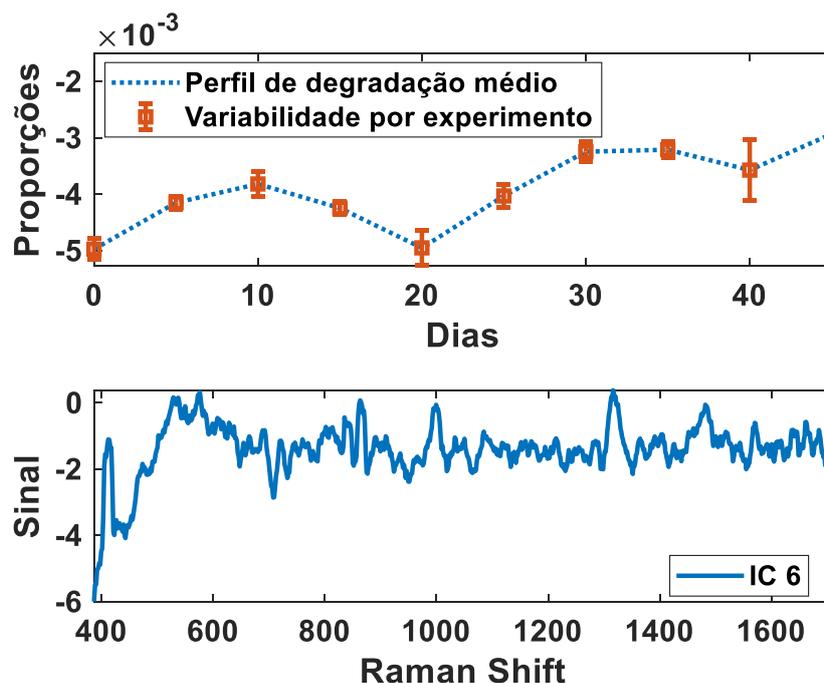


FIGURA 5.12 – Sexta componente independente (IC6) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

A sétima componente independente (Figura 5.13) apresenta um perfil cinético bastante próximo ao da IC2. O sinal recuperado por essa componente apresenta um pico negativo em um comprimento de onda levemente deslocado (em 707 cm^{-1}) do pico mais intenso da IC2, em 722 cm^{-1} referente a respiração do anel purina. Os outros picos em: 753 cm^{-1} , indicativo respiração do anel purínico; 861 cm^{-1} , referente à C–O–C; 1020 cm^{-1} relativo ao desdobramento O–H, e em 1346 cm^{-1} , relativo ao estiramento do anel purínico, também são picos característicos de bases nitrogenadas²⁰⁸. Portanto, pode-se estimar que a IC7 também apresenta informação química referente à bases nitrogenadas do vinho, como guanina, xantina ou ácido úrico²⁰⁹.

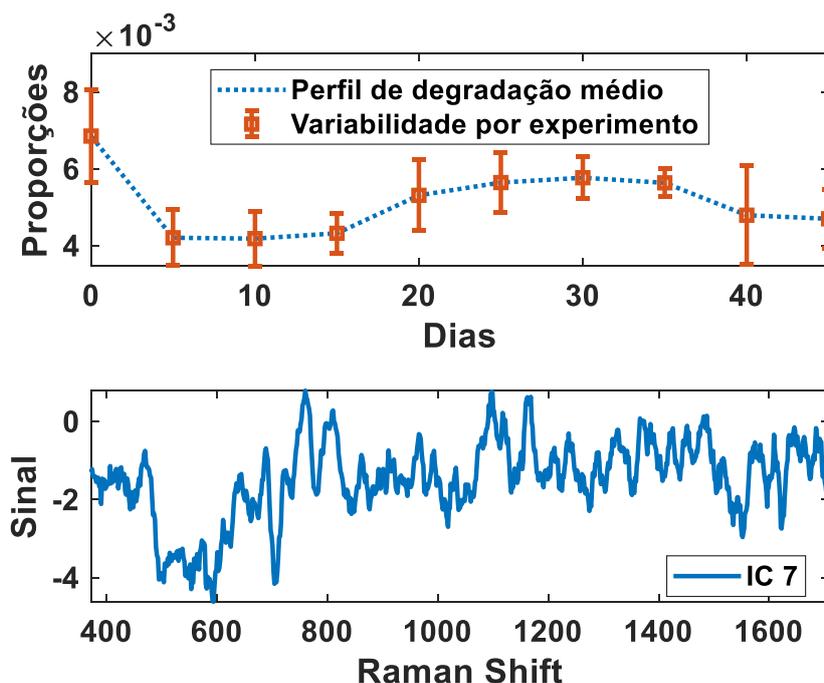


FIGURA 5.13 – Sétima componente independente (IC7) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

A IC8 (Figura 5.14) apresenta uma boa resolução espectral com picos bem definidos na região de 1000 a 1500 cm^{-1} , e um perfil cinético típico de reagente intermediário, tendo sua formação após 5 dias de degradação e decaindo após 15 dias. No último dia do monitoramento foi possível identificar um aumento em sua concentração relativa, com uma diferença significativa entre cada condição experimental (representado pela barra de erro laranja). Os picos mais intensos apresentado na IC8 podem ser caracterizados pela presença de ésteres, uma vez que apresentam o pico em 1136 cm^{-1} referente a estiramento C–C de cadeias alifáticas, 1265 cm^{-1} correspondente a deformação =C–H e 1500 cm^{-1} atribuído a estiramento da ligação C=O de carbonos próximos a grupos doadores²¹⁰. A caracterização como éster ajuda a explicar o comportamento cinético da componente, uma vez que os compostos desta classe apresentam-se em equilíbrio de formação e degradação, gerados pela reação de esterificação de ácidos carboxílicos com etanol e metanol, e decompostos pela hidrólise em meio ácido^{127,211}.

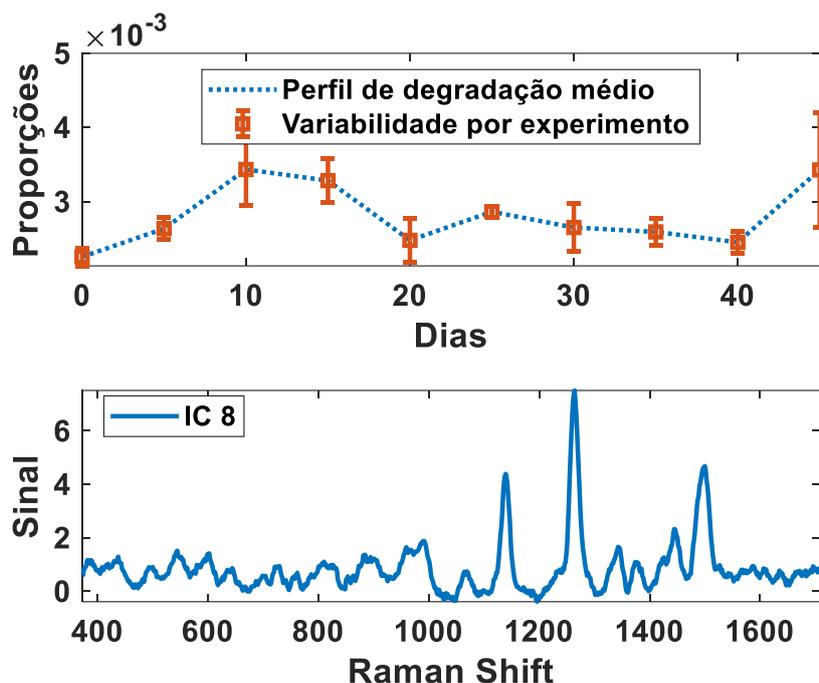


FIGURA 5.14 – Oitava componente independente (IC8) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

A nona componente independente (Figura 5.15) demonstra um espectro SERS bastante similar aos espectros SERS da forclorfenurão reportados na literatura²¹², com um perfil cinético esperado para compostos em degradação, com uma diferença significativa entre cada condição experimental nos últimos dias do monitoramento. Forclorfenurão é um aditivo químico amplamente utilizado como acelerador de crescimento de produtos vegetais, inclusive em uvas. Não necessariamente o composto recuperado é relativo a forclorfenurão, entretanto, devido a semelhança espectral, é bem provável que esta componente apresente um composto (ou grupo de compostos) com estrutura química semelhante.

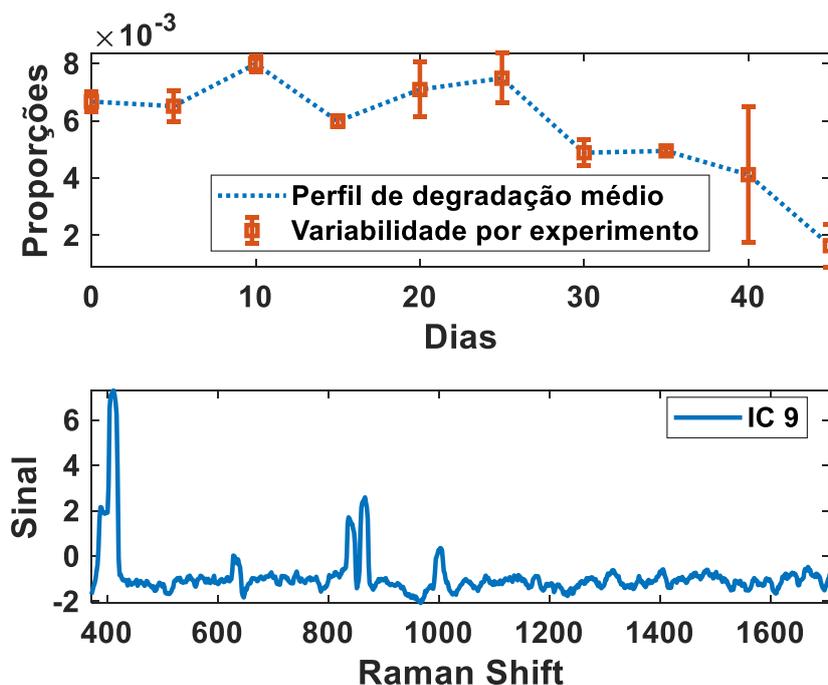


FIGURA 5.15 – Nona componente independente (IC9) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

A décima componente independente (Figura 5.16) exibe uma grande quantidade de ruído, que dificulta sua caracterização. Além disso, seu perfil cinético não apresenta uma tendência clara de produto de degradação ou composto degradado, desta forma pode-se associar esta componente ao ruído da técnica.

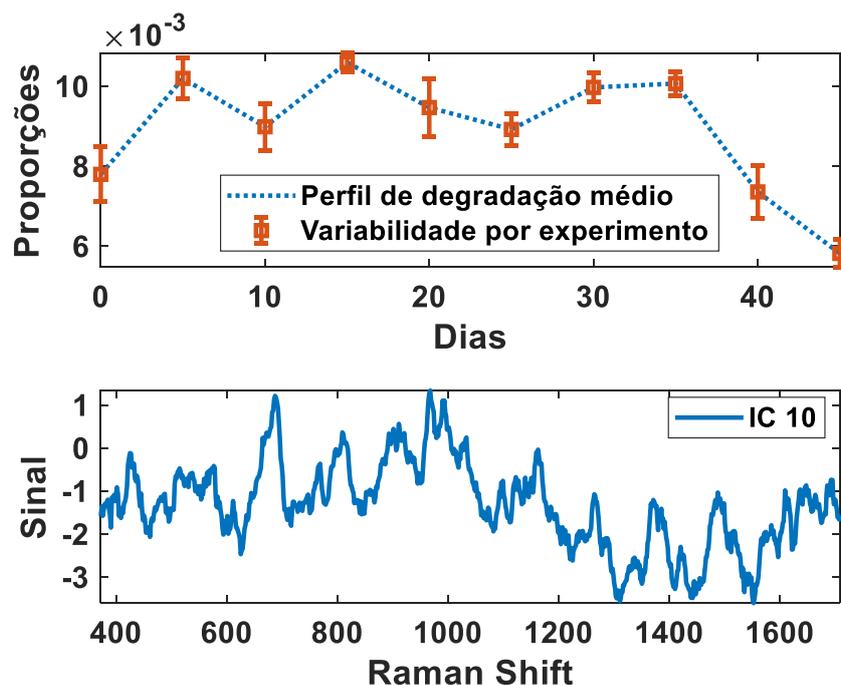


FIGURA 5.16 – Décima componente independente (IC10) e seu perfil cinético durante o estudo de degradação forçada.

5.3.4. Análise utilizando ANOVA-PCA

Apesar de ser observada uma alteração na composição do vinho durante todo o monitoramento do planejamento de degradação, os perfis cinéticos recuperados pelas componentes independentes apresentaram uma baixa variabilidade referente ao tipo de degradação aplicado nas amostras. Por se tratar de uma única amostra de vinho, sujeita a condições de degradação mais amenas, há uma grande similaridade e correlação entre as condições analisadas. Por isso, utilizou-se a ANOVA-PCA de forma a contornar a correlação dos dados, fornecendo, de maneira explícita, a influência de cada fator empregado.

Assim, a matriz de dados referente às áreas cromatográficas de cada IC, em cada experimento e em cada dia do monitoramento foi utilizada para gerar 8 novas matrizes representando os fatores do planejamento de experimentos (SO_2 , O_2 dissolvido, pH e temperatura), as interações de segunda ordem dos três primeiros fatores ($\text{SO}_2 \times \text{O}_2$ dissolvido, $\text{SO}_2 \times \text{pH}$, O_2 dissolvido \times pH) e a matriz de resíduos (ϵ). Devido à alta influência da temperatura, suas interações de segunda ordem

com os outros três fatores não foram avaliadas. Interações de ordem maior, como terceira e quarta ordem não foram implementados no modelo devido à baixa influência destes fatores. Assim, o modelo gerado resultou na seguinte equação (equação 5.1):

$$X_{(i,j)} = \bar{X}_{(j)} + \bar{S}_{(k,j)} + \bar{O}_{(k,j)} + \bar{P}_{(k,j)} + \bar{T}_{(l,j)} + \bar{SO}_{(k^2,j)} + \bar{SP}_{(k^2,j)} + \bar{OP}_{(k^2,j)} + \varepsilon_{(i,j)} \quad (5.1)$$

Onde, \mathbf{X} é a matriz de dados referente as áreas cromatográficas de cada IC, $\bar{\mathbf{X}}$ é a matriz média das áreas cromatográficas, $\bar{\mathbf{S}}$, $\bar{\mathbf{O}}$, $\bar{\mathbf{P}}$ e $\bar{\mathbf{T}}$ representam as matrizes dos fatores SO₂, O₂ dissolvido, pH e temperatura respectivamente. As matrizes $\bar{\mathbf{SO}}$, $\bar{\mathbf{SP}}$ e $\bar{\mathbf{OP}}$ representam as interações de segunda ordem dos três primeiros fatores do planejamento. Os escalares i , j , k e l são referentes ao número de amostras do planejamento ($i = 24$), o número de variáveis da matriz \mathbf{X} ($j = 10$), o número de níveis para os três primeiros fatores do planejamento ($k = 2$) e o número de níveis para o fator temperatura ($l = 3$), respectivamente. Por fim, ε representa a matriz de resíduos do modelo.

A Figura 5.17 apresenta os escores (Figura 5.17-a), e loadings (Figura 5.17-b) da matriz de SO₂ mais o erro residual. A PC1 separa de maneira evidente os grupos de amostras relativos aos níveis dos fatores, sendo as amostras em azul referentes as amostras do nível -1, as vermelhas do nível +1, para este fator. A PC2 apresenta apenas informação relacionada a variação residual. Os resultados deste PCA demonstram que o fator SO₂ é significativo, uma vez que a variabilidade das amostras está relacionada com a diferença do planejamento de experimentos.

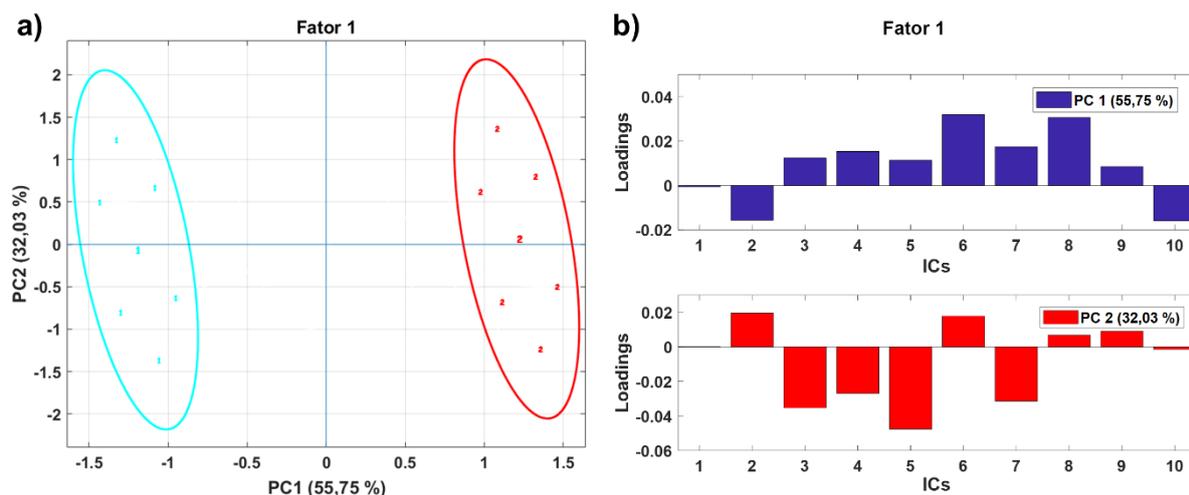


FIGURA 5.17 – Gráfico de a) escores, e b) loadings para a matriz de SO_2 + variação residual, com círculos de intervalo de confiança de 95 %. As amostras em azul representam o nível -1, e em vermelho +1.

A Figura 5.18 apresenta os escores (Figura 5.18-a e 5.18-c), e loadings (Figura 5.18-b e 5.18-d) das matrizes de O_2 dissolvido mais o erro residual (Figura 5.18-a e 5.18-b), e pH mais o erro residual (Figura 5.18-c e 5.18-d). Em ambos os fatores, não é possível separar as amostras, baseadas nos níveis do planejamento, apenas com a PC1. Isto significa que, mesmo subtraindo os fatores da matriz \mathbf{X} , ainda existe alguma variabilidade significativa na matriz de resíduos, isto é, algum fator não avaliado apresenta significância em ambos os fatores.

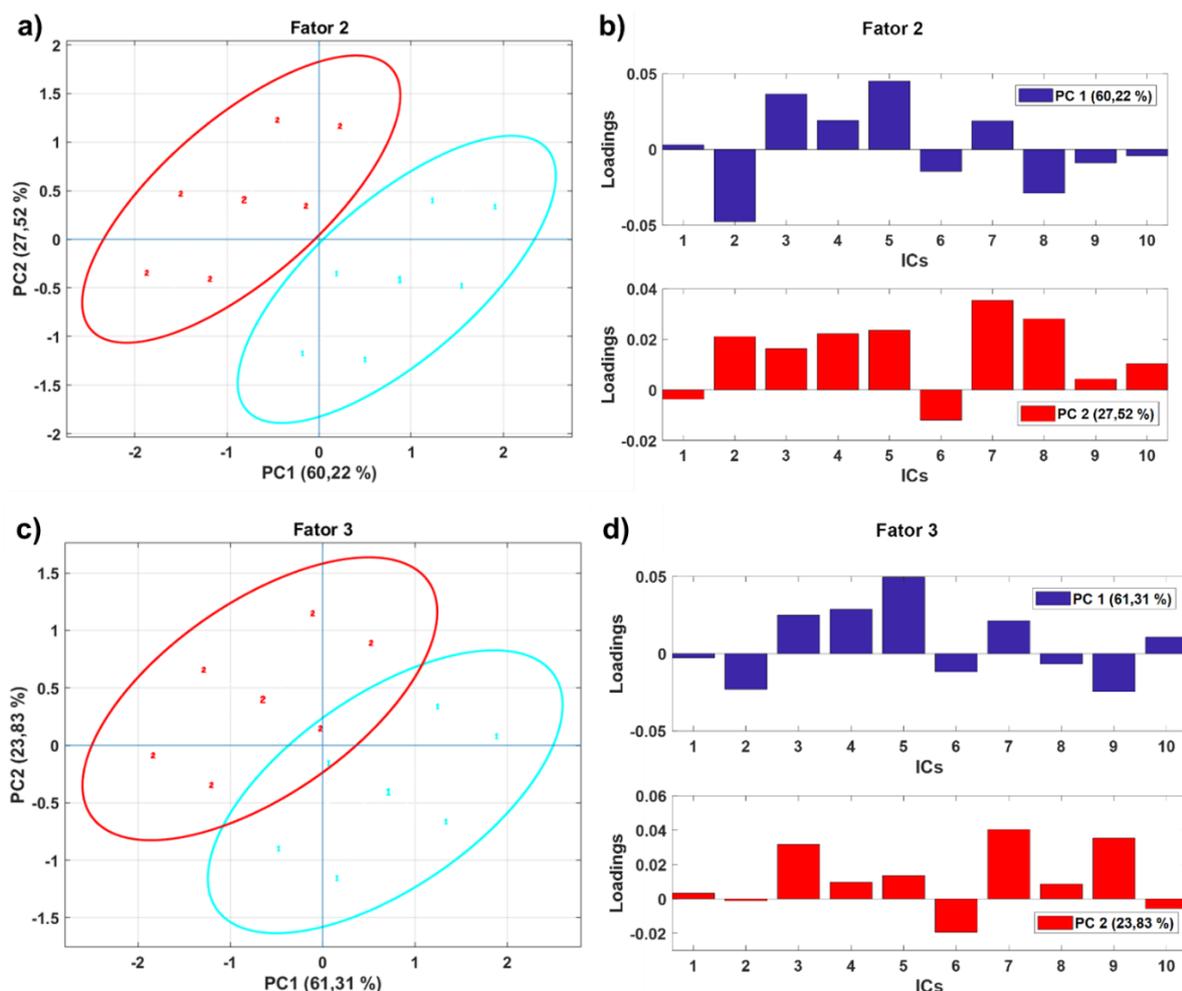


FIGURA 5.18 – Gráfico de escores (a e c), e loadings (b e d) para a matriz de O_2 dissolvido + variação residual (a e b); e pH + variação residual (c e d), com círculos de intervalo de confiança de 95 %. As amostras em azul representam o nível -1, e em vermelho +1.

A Figura 5.19 apresenta os escores (Figura 5.19-a), e loadings (Figura 5.19-b)) da matriz de temperatura mais o erro residual. A PC1 separa de maneira evidente os grupos de amostras relativos ao primeiro nível dos fatores dos demais. Enquanto, a PC2 apresenta a separação dos outros níveis do fator, sendo as amostras em azul referentes a temperatura 4 °C, as vermelhas, 24 °C, e as verdes, 40 °C. A separação obtida por PCA evidencia que este fator foi o mais significativo, uma vez que uma maior separação entre as amostras referente aos níveis do planejamento experimental foi obtida.

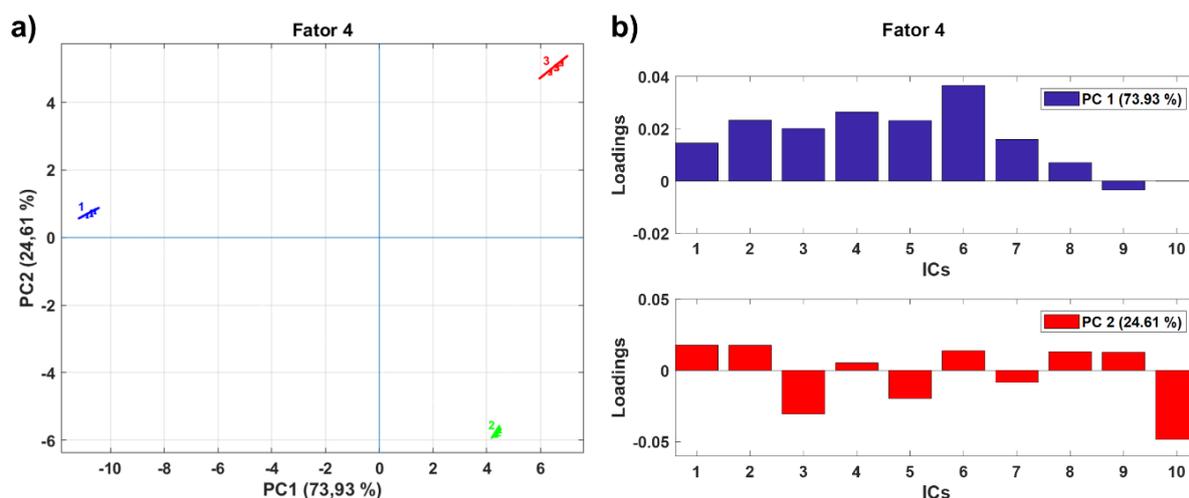


FIGURA 5.19 – Gráfico de a) escores, e b) loadings para a matriz de temperatura + variação residual, com círculos de intervalo de confiança de 95 %. As amostras em azul representam a temperatura de 4 °C, em vermelho, temperatura de 24 °C, e em verde, temperatura de 40 °C.

A Figura 5.20 apresenta os escores (Figura 5.20-a, 5.20-c e 5.20-e), e loadings (Figura 5.20-b, 5.20-d e 5.20-f) das matrizes referentes aos efeitos de interação de segunda ordem dos três primeiros fatores mais o erro residual. Assim como, para os efeitos de primeira ordem para O_2 dissolvido e pH, a variabilidade dos dados não é explicado apenas pela PC1. Entretanto, as interações 1 e 2 (SO_2 e O_2 dissolvido) e interações 2 e 3 (O_2 dissolvido e pH) apresentaram uma maior separação pela PC1 do que os fatores 2 e 3, quando avaliados de forma individual. Por isso, pode-se concluir que os fatores O_2 dissolvido e pH tem pouca significância para os resultados da degradação do vinho, mas seus efeitos sinérgicos tem uma maior significância para o sistema, reforçando o uso de abordagens multivariadas e planejamento experimentais para se realizar estudos de degradação forçada.

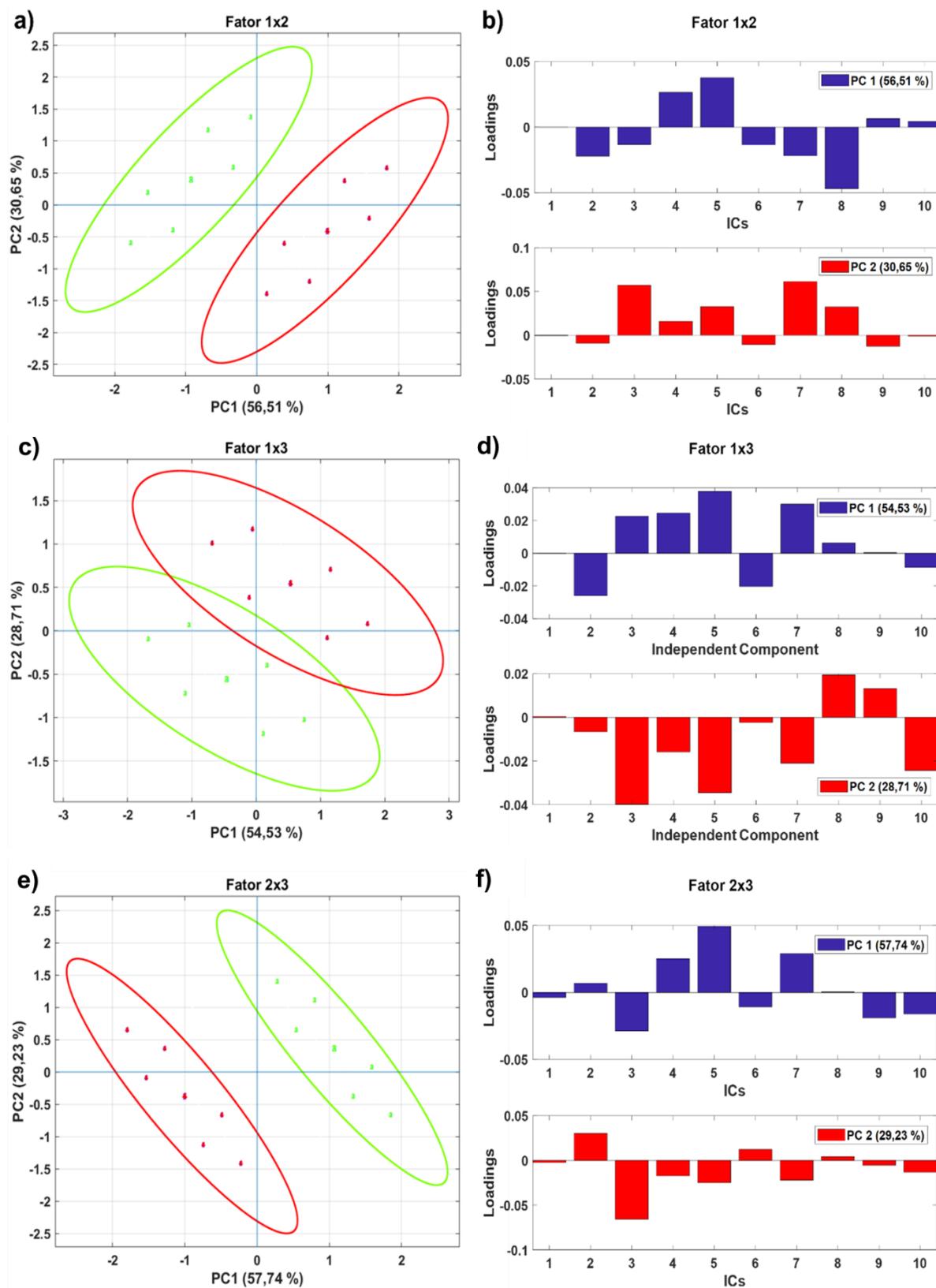


FIGURA 5.20 – Gráfico de escores (a, c e e), e loadings (b, d e f) para a matrizes de interação de segunda ordem para os três primeiros fatores, com círculos de intervalo de confiança de 95 %. As amostras em vermelho representam o nível -1, e em verde +1.

5.4. Conclusões

O uso da SERS-CCD associada a ICA possibilitou a separação de 10 componentes independentes com sinais distintos. Com os sinais recuperados pelo modelo, foi possível propor compostos (ou grupo de compostos) detectados pela técnica. Com as proporções recuperadas pelo modelo, foi possível avaliar o perfil cinético dessas 10 componentes em 45 dias de estudo de degradação.

O uso da ANOVA-PCA na área dos perfis cromatográficos das componentes recuperadas pelo ICA possibilitou identificar os fatores mais significativos para a degradação do vinho, sendo a temperatura o efeito de maior significância e, SO_2 um efeito significativo. Apesar dos efeitos individuais de O_2 dissolvido e pH, não se mostrarem significativos, o efeito sinérgico de SO_2 e O_2 dissolvido, e O_2 dissolvido com pH foram identificados como fatores importantes para a degradação.

CAPÍTULO 6 – PERPESCTIVAS FUTURAS

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A presente tese de doutorado apresenta duas principais linhas de pesquisa que podem ser ampliadas e exploradas de diversas maneiras. Uma delas é o uso da espectroscopia Raman amplificada por superfície associada a cromatografia em camada delgada para diversas outras matrizes amostrais.

Devido à versatilidade e simplicidade da técnica, esta pode ser aplicada a diversos campos da química analítica como por exemplo:

- Química ambiental, para a quantificação de pesticidas orgânicos persistentes em amostras de água;
- Análise de resíduos de fármacos em outros tipos de amostras, como água, solo, leite humano;
- Metabolômica, para análises comparativas em tecidos vegetais e/ou animais;
- Combustíveis, para análises de adulterantes ou aditivos adicionados nas amostras;
- Área forense, para identificação de origens de produção de diversos tipos de drogas;
- Entre outros.

Além disso, pode-se realizar modificações na etapa de separação para melhorar o sistema, como por exemplo análise de cromatografia em camada delgada bidimensional, onde uma imagem hiperspectral pode ser gerada para cada amostra. Uso da cromatografia em camada delgada de alta eficiência para aumentar o poder de separação da técnica e ampliar a quantidade de sinais adquiridos. Uso de substâncias para aumentar a estabilidade da placa cromatográfica, como por exemplo polivinil pirrolidona, assim seria possível realizar análises de compostos voláteis ou até mesmo aumentar o tempo de estabilidade da placa com nanopartículas.

Outra linha que pode continuar a ser estudada é a análise de alimentos utilizando outras técnicas analíticas, como por exemplo RMN, cromatografia líquida e gasosa, infravermelho próximo e médio, fluorescência molecular, entre outras.

Apesar dessa linha de pesquisa já ser aplicada regularmente por outros grupos de pesquisa, ainda existe diversos estudos que podem ser realizados nesta área, como estudos de degradação forçada de forma multivariada, monitoramento da fermentação de produtos alcóolicos e classificação de alimentos complexos a partir de diversas fontes do produto final, como por exemplo, análise de diferentes sementes, polpas e cascas de uva e do vinho como produto final.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L. & FENNEMA, O.R., *Fennema's food chemistry*. 2007: CRC press.
2. BELITZ, H. & GROSCH, W., *Food Chemistry*. 1999: Springer-Verlag.
3. CHEUNG, P.C. & MEHTA, B.M., *Handbook of Food Chemistry*. 2015: Springer.
4. TRANCHIDA, P.Q.; DUGO, P.; DUGO, G. & MONDELLO, L., "Comprehensive two-dimensional chromatography in food analysis". *Journal of Chromatography A*. **1054**(1): 3, 2004.
5. KAROUI, R.; DOWNEY, G. & BLECKER, C., "Mid-Infrared Spectroscopy Coupled with Chemometrics: A Tool for the Analysis of Intact Food Systems and the Exploration of Their Molecular Structure–Quality Relationships – A Review". *Chemical Reviews*. **110**(10): 6144, 2010.
6. RIEDL, J.; ESSLINGER, S. & FAUHL-HASSEK, C., "Review of validation and reporting of non-targeted fingerprinting approaches for food authentication". *Anal Chim Acta*. **885**: 17, 2015.
7. DANEZIS, G.P.; TSAGKARIS, A.S.; CAMIN, F.; BRUSIC, V. & GEORGIU, C.A., "Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **85**: 123, 2016.
8. NUNES-MIRANDA, J.D.; SANTOS, H.M.; REBOIRO-JATO, M.; FDEZ-RIVEROLA, F.; IGREJAS, G.; LODEIRO, C. & CAPELO, J.L., "Direct matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry-based analysis of wine as a powerful tool for classification purposes". *Talanta*. **91**: 72, 2012.

9. LONGOBARDI, F.; INNAMORATO, V.; DI GIOIA, A.; VENTRELLA, A.; LIPPOLIS, V.; LOGRIECO, A.F.; CATUCCI, L. & AGOSTIANO, A., "Geographical origin discrimination of lentils (*Lens culinaris* Medik.) using ¹H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses". *Food Chem.* **237**: 743, 2017.
10. FELLOWS, P.J., *Food processing technology: principles and practice*. 2009: Elsevier.
11. PRIETO, N.; SWIFT, M.L.; SUMMERFELT, S.T.; JUÁREZ, M.; ZIJLSTRA, R.T. & AALHUS, J.L., "A Feasibility Study on the Use of Near Infrared Spectroscopy for the Authentication of Depurated Salmon Fillets". *Food Analytical Methods.* **8**(10): 2660, 2015.
12. DE OLIVEIRA, C.R.; CARNEIRO, R.L. & FERREIRA, A.G., "Tracking the degradation of fresh orange juice and discrimination of orange varieties: An example of NMR in coordination with chemometrics analyses". *Food Chem.* **164**: 446, 2014.
13. STOLKER, A.A.M. & BRINKMAN, U.A.T., "Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review". *Journal of Chromatography A.* **1067**(1): 15, 2005.
14. LATTUPALLI, R.; KOLLURU, A. & YEE, J., "Nephrotoxicity of Mala Fide Melamine: Modern Era Milk Scandal". *TheScientificWorldJOURNAL.* **8**: 949, 2008.
15. YANG, S.; DING, J.; ZHENG, J.; HU, B.; LI, J.; CHEN, H.; ZHOU, Z. & QIAO, X., "Detection of melamine in milk products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry". *Anal Chem.* **81**(7): 2426, 2009.

16. ABBOTS, E.-J. & COLES, B., "Horsemeat-gate". *Food, Culture & Society*. **16**(4): 535, 2013.
17. BOYACI, İ.H.; TEMİZ, H.T.; UYSAL, R.S.; VELIOĞLU, H.M.; YADEGARI, R.J. & RISHKAN, M.M., "A novel method for discrimination of beef and horsemeat using Raman spectroscopy". *Food Chem.* **148**: 37, 2014.
18. GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J.B.; CHRISTENSEN, A.B. & GIVSKOV, M., "Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria". *International Journal of Food Microbiology*. **78**(1): 79, 2002.
19. DE PAULA PASETO FERNANDES, R.; DE ALVARENGA FREIRE, M.T.; DA COSTA CARRER, C. & TRINDADE, M.A., "Evaluation of Physicochemical, Microbiological and Sensory Stability of Frozen Stored Vacuum-Packed Lamb Meat". *Journal of Integrative Agriculture*. **12**(11): 1946, 2013.
20. CHRISTENSEN, J.; POVLSEN, V.T. & SØRENSEN, J., "Application of Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics in the Evaluation of Processed Cheese During Storage". *Journal of Dairy Science*. **86**(4): 1101, 2003.
21. AMMARI, F.; BOUVERESSE, D.J.-R.; EVELEIGH, L.; BOUGHANMI, N. & RUTLEDGE, D.N., "Independent components analysis applied to mid-infrared spectra of edible oils to study the thermal stability of heated oils". *Journal of Food Measurement and Characterization*. **7**(2): 90, 2013.
22. NÚÑEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; MARTINS, C.P.B. & LUCCI, P., "New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis". *Journal of Chromatography A*. **1228**: 298, 2012.
23. YANG, D.T. & YING, Y.B., "Applications of Raman Spectroscopy in Agricultural Products and Food Analysis: A Review". *Appl Spectrosc Rev.* **46**(7): 539, 2011.

24. HERRERO, A.M., "Raman spectroscopy a promising technique for quality assessment of meat and fish: A review". *Food Chem.* **107**(4): 1642, 2008.
25. HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A. & CROUCH, S.R., *Princípios de Análise Instrumental*. 6 ed. 2009, Porto Alegre: Bookman.
26. SKOOG, D.A.; WEST, D.M. & HOLLER, F.J., *Fundamentos de química analítica*. Vol. 2. 1997: Reverté.
27. SMITH, E. & DENT, G., *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. 2013: John Wiley & Sons.
28. HARRIS, D.C., *Quantitative chemical analysis*. 2010: Macmillan.
29. DAS, R.S. & AGRAWAL, Y., "Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications". *Vibrational spectroscopy*. **57**(2): 163, 2011.
30. SMEKAL, A., "Zur quantentheorie der dispersion". *Naturwissenschaften*. **11**(43): 873, 1923.
31. MOMBER, A.W., "The 50th anniversary of the death of Adolf Gustav Smekal (1895–1959), a pioneer in materials physics". *Journal of Materials Science*. **45**(3): 750, 2009.
32. KRAMERS, H.A. & HEISENBERG, W., "Über die streuung von strahlung durch atome". *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*. **31**(1): 681, 1925.
33. CLARK, R.J., "Rayleigh, Ramsay, Rutherford and Raman—their connections with, and contributions to, the discovery of the Raman effect". *Analyst*. **138**(3): 729, 2013.
34. RAMAN, C.V. & KRISHNAN, K.S., "A new type of secondary radiation". *Nature*. **121**(3048): 501, 1928.

35. DE FARIA, D.; SANTOS, L. & GONCALVES, N., "A demonstration on inelastic light scattering: The Raman experiment revisited". *Quimica Nova*. **20**(3): 319, 1997.
36. SALA, O., *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*. 1996: UNESP.
37. NASDALA, L.; SMITH, D.C.; KAINDL, R. & ZIEMANN, M.A., "Raman spectroscopy: analytical perspectives in mineralogical research". *Spectroscopic methods in mineralogy*. **6**: 281, 2004.
38. COLTHUP, N., *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 2012: Elsevier.
39. LARKIN, P.J., *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. 2011: Elsevier.
40. FERRARO, J.R.; NAKAMOTO, K. & BROWN, C.W., *Introductory Raman Spectroscopy*. 2nd ed. 2003, Boston: Academic Press.
41. BUMBRAH, G.S. & SHARMA, R.M., "Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse". *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. **6**(3): 209, 2016.
42. SMITH, R.; WRIGHT, K.L. & ASHTON, L., "Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies". *Analyst*. **141**(12): 3590, 2016.
43. BREITKREITZ, M.C.; SABIN, G.P.; POLLA, G. & POPPI, R.J., "Characterization of semi-solid Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS) of atorvastatin calcium by Raman image spectroscopy and chemometrics". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **73**: 3, 2013.

44. EDWARDS, H.G.M. & VANDENABEELE, P., "Raman spectroscopy in art and archaeology". *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*. **374**(2082): 20160052, 2016.
45. NGO, Y.H.; LI, D.; SIMON, G.P. & GARNIER, G., "Paper surfaces functionalized by nanoparticles". *Advances in Colloid and Interface Science*. **163**(1): 23, 2011.
46. KNEIPP, K.; KNEIPP, H. & BOHR, H.G., *Single-molecule SERS spectroscopy*, in *Surface-Enhanced Raman Scattering*. 2006, Springer. p. 261.
47. FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P.J. & MCQUILLAN, A.J., "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode". *Chemical Physics Letters*. **26**(2): 163, 1974.
48. HAYNES, C.L.; YONZON, C.R.; ZHANG, X. & VAN DUYNE, R.P., "Surface-enhanced Raman sensors: early history and the development of sensors for quantitative biowarfare agent and glucose detection". *J Raman Spectrosc.* **36**(6-7): 471, 2005.
49. SCHATZ, G.; YOUNG, M. & DUYNE, R., *Electromagnetic Mechanism of SERS*, in *Surface-Enhanced Raman Scattering*, KNEIPP, K.; MOSKOVITS, M. & KNEIPP, H., Editors. 2006, Springer Berlin Heidelberg. p. 19.
50. STAMPLECOSKIE, K.G.; SCAIANO, J.C.; TIWARI, V.S. & ANIS, H., "Optimal Size of Silver Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy". *J Phys Chem C*. **115**(5): 1403, 2011.
51. KOTTMANN, J.P.; MARTIN, O.J.F.; SMITH, D.R. & SCHULTZ, S., "Dramatic localized electromagnetic enhancement in plasmon resonant nanowires". *Chemical Physics Letters*. **341**(1–2): 1, 2001.

52. RYCENGA, M.; XIA, X.; MORAN, C.H.; ZHOU, F.; QIN, D.; LI, Z.-Y. & XIA, Y., "Generation of Hot Spots with Silver Nanocubes for Single-Molecule Detection by Surface-Enhanced Raman Scattering". *Angewandte Chemie International Edition*. **50**(24): 5473, 2011.
53. CAMPION, A. & KAMBHAMPATI, P., "Surface-enhanced Raman scattering". *Chem Soc Rev*. **27**(4): 241, 1998.
54. VALLEY, N.; GREENELTCH, N.; VAN DUYNE, R.P. & SCHATZ, G.C., "A Look at the Origin and Magnitude of the Chemical Contribution to the Enhancement Mechanism of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS): Theory and Experiment". *J Phys Chem Lett*. **4**(16): 2599, 2013.
55. LOMBARDI, J.R. & BIRKE, R.L., "A unified approach to surface-enhanced Raman spectroscopy". *J Phys Chem C*. **112**(14): 5605, 2008.
56. VO-DINH, T., "Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures". *Trac-Trend Anal Chem*. **17**(8-9): 557, 1998.
57. MORTON, S.M. & JENSEN, L., "Understanding the Molecule-Surface Chemical Coupling in SERS". *J Am Chem Soc*. **131**(11): 4090, 2009.
58. SCHLÜCKER, S., "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications". *Angewandte Chemie International Edition*. **53**(19): 4756, 2014.
59. XIE, X.; PU, H. & SUN, D.-W., "Recent advances in nanofabrication techniques for SERS substrates and their applications in food safety analysis". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 1, 2017.
60. DI ANIBAL, C.V.; MARSAL, L.F.; CALLAO, M.P. & RUISÁNCHEZ, I., "Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) and multivariate analysis as a

screening tool for detecting Sudan I dye in culinary spices". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **87**: 135, 2012.

61. CHEUNG, W.; SHADI, I.T.; XU, Y. & GOODACRE, R., "Quantitative Analysis of the Banned Food Dye Sudan-1 Using Surface Enhanced Raman Scattering with Multivariate Chemometrics". *The Journal of Physical Chemistry C*. **114**(16): 7285, 2010.

62. LIU, B.; LIN, M. & LI, H., "Potential of SERS for rapid detection of melamine and cyanuric acid extracted from milk". *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*. **4**(1): 13, 2010.

63. GIOVANNOZZI, A.M.; ROLLE, F.; SEGA, M.; ABETE, M.C.; MARCHIS, D. & ROSSI, A.M., "Rapid and sensitive detection of melamine in milk with gold nanoparticles by Surface Enhanced Raman Scattering". *Food Chem.* **159**: 250, 2014.

64. ZHENG, J. & HE, L., "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Chemical Analysis of Food". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **13**(3): 317, 2014.

65. SALLUM, L.F.; SOARES, F.L.F.; ARDILA, J.A. & CARNEIRO, R.L., "Determination of acetylsalicylic acid in commercial tablets by SERS using silver nanoparticle-coated filter paper". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **133**(0): 107, 2014.

66. CABALÍN, L.M.; RUPÉREZ, A. & LASERNA, J.J., "Flow-injection analysis and liquid chromatography: surface-enhanced Raman spectrometry detection by using a windowless flow cell". *Anal Chim Acta*. **318**(2): 203, 1996.

67. SUBAIHI, A.; TRIVEDI, D.K.; HOLLYWOOD, K.A.; BLUETT, J.; XU, Y.; MUHAMADALI, H.; ELLIS, D.I. & GOODACRE, R., "Quantitative Online

Liquid Chromatography–Surface-Enhanced Raman Scattering (LC-SERS) of Methotrexate and its Major Metabolites". *Anal Chem.* **89**(12): 6702, 2017.

68. HEAPS, D.A. & GRIFFITHS, P.R., "Off-Line Direct Deposition Gas Chromatography/Surface-Enhanced Raman Scattering and the Ramifications for On-Line Measurements". *Appl Spectrosc.* **59**(11): 1305, 2005.

69. ROTH, E. & KIEFER, W., "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Detection Method in Gas Chromatography". *Appl Spectrosc.* **48**(10): 1193, 1994.

70. DIJKSTRA, R.J.; GERSSEN, A.; EFREMOV, E.V.; ARIESE, F.; BRINKMAN, U.A.T. & GOOIJER, C., "Substrates for the at-line coupling of capillary electrophoresis and surface-enhanced Raman spectroscopy". *Anal. Chim. Acta.* **508**(2): 127, 2004.

71. HU, Y.; FENG, S.; GAO, F.; LI-CHAN, E.C.Y.; GRANT, E. & LU, X., "Detection of melamine in milk using molecularly imprinted polymers–surface enhanced Raman spectroscopy". *Food Chem.* **176**: 123, 2015.

72. KANTAROVICH, K.; TSARFATI, I.; GHEBER, L.A.; HAUPT, K. & BAR, I., "Writing Droplets of Molecularly Imprinted Polymers by Nano Fountain Pen and Detecting Their Molecular Interactions by Surface-Enhanced Raman Scattering". *Anal Chem.* **81**(14): 5686, 2009.

73. FREYE, C.E.; CRANE, N.A.; KIRCHNER, T.B. & SEPANIAK, M.J., "Surface Enhanced Raman Scattering Imaging of Developed Thin-Layer Chromatography Plates". *Anal. Chem.* **85**(8): 3991, 2013.

74. WALL, P.E., *Thin-layer Chromatography: A Modern Practical Approach*, ed. SMITH, R.M. 2005, Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.

75. POOLE, C.F., "Thin-layer chromatography: challenges and opportunities". *Journal of Chromatography A.* **1000**(1–2): 963, 2003.

76. SHERMA, J., *Thin-Layer Chromatography*. 2006: Wiley Online Library.
77. TOUCHSTONE, J.C., *Practice of thin layer chromatography*. 1992: John Wiley & Sons.
78. SMITH, I., *Chromatography*. 2013: Elsevier.
79. KOCSIS, L.; HORVÁTH, E.; KRISTÓF, J.; FROST, R.L.; RÉDEY, Á. & MINK, J., "Effect of the preparation conditions on the surface-enhanced Raman-spectrometric identification of thin-layer-chromatographic spots". *Journal of Chromatography A*. **845**(1–2): 197, 1999.
80. ZHANG, Z.-M.; LIU, J.-F.; LIU, R.; SUN, J.-F. & WEI, G.-H., "Thin Layer Chromatography Coupled with Surface-Enhanced Raman Scattering as a Facile Method for On-Site Quantitative Monitoring of Chemical Reactions". *Analytical Chemistry*. **86**(15): 7286, 2014.
81. XIE, Z.; WANG, Y.; CHEN, Y.; XU, X.; JIN, Z.; DING, Y.; YANG, N. & WU, F., "Tuneable surface enhanced Raman spectroscopy hyphenated to chemically derivatized thin-layer chromatography plates for screening histamine in fish". *Food Chem*. **230**: 547, 2017.
82. SANCHEZ-CORTES, S.; FRANCIOSO, O.; CIAVATTA, C.; GARCIA-RAMOS, J.V. & GESSA, C., "pH-dependent adsorption of fractionated peat humic substances on different silver colloids studied by surface-enhanced Raman spectroscopy". *J Colloid Interf Sci*. **198**(2): 308, 1998.
83. ZHANG, Z.M.; LIU, J.F.; LIU, R.; SUN, J.F. & WEI, G.H., "Thin Layer Chromatography Coupled with Surface-Enhanced Raman Scattering as a Facile Method for On-Site Quantitative Monitoring of Chemical Reactions". *Anal. Chem*. **86**(15): 7286, 2014.

84. HUANG, R.F.; HAN, S.Y. & LI, X., "Detection of tobacco-related biomarkers in urine samples by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with thin-layer chromatography". *Anal. Bioanal. Chem.* **405**(21): 6815, 2013.
85. BROSSEAU, C.L.; GAMBARDELLA, A.; CASADIO, F.; GRZYWACZ, C.M.; WOUTERS, J. & VAN DUYNNE, R.P., "Ad-hoc Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Methodologies for the Detection of Artist Dyestuffs: Thin Layer Chromatography-Surface Enhanced Raman Spectroscopy and in Situ On the Fiber Analysis". *Anal Chem.* **81**(8): 3056, 2009.
86. LI, D.W.; QU, L.L.; ZHAI, W.L.; XUE, J.Q.; FOSSEY, J.S. & LONG, Y.T., "Facile On-Site Detection of Substituted Aromatic Pollutants in Water Using Thin Layer Chromatography Combined with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy". *Environ Sci Technol.* **45**(9): 4046, 2011.
87. YAO, C.P.; CHENG, F.S.; WANG, C.; WANG, Y.H.; GUO, X.W.; GONG, Z.J.; FAN, M.K. & ZHANG, Z.Y., "Separation, identification and fast determination of organophosphate pesticide methidathion in tea leaves by thin layer chromatography-surface-enhanced Raman scattering". *Anal. Methods.* **5**(20): 5560, 2013.
88. WANG, C.; CHENG, F.S.; WANG, Y.H.; GONG, Z.J.; FAN, M.K. & HU, J.M., "Single point calibration for semi-quantitative screening based on an internal reference in thin layer chromatography-SERS: the case of Rhodamine B in chili oil". *Anal. Methods.* **6**(18): 7218, 2014.
89. GAO, F.; HU, Y.X.; CHEN, D.; LI-CHAN, E.C.Y.; GRANT, E. & LU, X.N., "Determination of Sudan I in paprika powder by molecularly imprinted polymers-thin layer chromatography-surface enhanced Raman spectroscopic biosensor". *Talanta.* **143**: 344, 2015.

90. LI, H.; ZHU, Q.X.; CHWEE, T.S.; WU, L.; CHAI, Y.F.; LU, F. & YUAN, Y.F., "Detection of structurally similar adulterants in botanical dietary supplements by thin-layer chromatography and surface enhanced Raman spectroscopy combined with two-dimensional correlation spectroscopy". *Anal. Chim. Acta.* **883**: 22, 2015.
91. DA SILVA, G.A.; AUGUSTO, F. & POPPI, R.J., "Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC". *Food Chem.* **111**(4): 1057, 2008.
92. ESSLINGER, H.M., *Handbook of brewing: processes, technology, markets*. 2009: John Wiley & Sons.
93. HARDWICK, W., *Handbook of brewing*. 1994: CRC Press.
94. HORNSEY, I.S., *A history of beer and brewing*. Vol. 34. 2003: Royal Society of Chemistry.
95. BLANCO, C.A.; DE LA FUENTE, R.; CABALLERO, I. & RODRIGUEZ-MENDEZ, M.L., "Beer discrimination using a portable electronic tongue based on screen-printed electrodes". *J Food Eng.* **157**: 57, 2015.
96. DANIELS, R., *Designing great beers: The ultimate guide to brewing classic beer styles*. 1998: Brewers Publications.
97. OLIVER, G. & COLICCHIO, T., *The Oxford companion to beer*. 2011: Oxford University Press.
98. GROUP, B.-H., *The Barth Report: Hops 2014-2015*, GROUP, B.-H., Editor. 2015: Strasbourg.
99. GROUP, B.-H., *Beer Production - Market Leaders and their Challengers in the Top 40 Countries in 2012* GROUP, B.-H., Editor. 2013: Strasbourg.

100. DI EGIDIO, V.; OLIVERI, P.; WOODCOCK, T. & DOWNEY, G., "Confirmation of brand identity in foods by near infrared transreflectance spectroscopy using classification and class-modelling chemometric techniques - The example of a Belgian beer". *Food Res Int.* **44**(2): 544, 2011.
101. IDBORG, H.; ZAMANI, L.; EDLUND, P.O.; SCHUPPE-KOISTINEN, I. & JACOBSSON, S.P., "Metabolic fingerprinting of rat urine by LC/MS Part 1. Analysis by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry". *J Chromatogr B.* **828**(1-2): 9, 2005.
102. MIGNANI, A.G.; CIACCHERI, L.; MENCAGLIA, A.A.; OTTEVAERE, H.; BACA, E.E.S. & THIENPONT, H., "Optical measurements and pattern-recognition techniques for identifying the characteristics of beer and distinguishing Belgian beers". *Sensor Actuat B-Chem.* **179**: 140, 2013.
103. FARAG, M.A.; PORZEL, A.; SCHMIDT, J. & WESSJOHANN, L.A., "Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics". *Metabolomics.* **8**(3): 492, 2012.
104. RODRIGUES, J.A.; BARROS, A.S.; CARVALHO, B.; BRANDAO, T. & GIL, A.M., "Probing beer aging chemistry by nuclear magnetic resonance and multivariate analysis". *Anal Chim Acta.* **702**(2): 178, 2011.
105. CAJKA, T.; RIDDELLOVA, K.; TOMANIOVA, M. & HAJŠLOVA, J., "Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint". *Journal of Chromatography A.* **1217**(25): 4195, 2010.
106. PEREIRA, H.V.; AMADOR, V.S.; SENA, M.M.; AUGUSTI, R. & PICCIN, E., "Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers". *Anal Chim Acta.* **940**: 104, 2016.

107. ARAUJO, A.S.; DA ROCHA, L.L.; TOMAZELA, D.M.; SAWAYA, A.C.H.F.; ALMEIDA, R.R.; CATHARINO, R.R. & EBERLIN, M.N., "Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer". *Analyst*. **130**(6): 884, 2005.
108. CETO, X.; GUTIERREZ-CAPITAN, M.; CALVO, D. & DEL VALLE, M., "Beer classification by means of a potentiometric electronic tongue". *Food Chem*. **141**(3): 2533, 2013.
109. RUDNITSKAYA, A.; POLSHIN, E.; KIRSANOV, D.; LAMMERTYN, J.; NICOLAI, B.; SAISON, D.; DELVAUX, F.R.; DELVAUX, F. & LEGIN, A., "Instrumental measurement of beer taste attributes using an electronic tongue". *Anal Chim Acta*. **646**(1-2): 111, 2009.
110. NERY, E.W. & KUBOTA, L.T., "Integrated, paper-based potentiometric electronic tongue for the analysis of beer and wine". *Anal Chim Acta*. **918**: 60, 2016.
111. BIANCOLILLO, A.; BUCCI, R.; MAGRI, A.L.; MAGRI, A.D. & MARINI, F., "Data-fusion for multiplatform characterization of an italian craft beer aimed at its authentication". *Anal Chim Acta*. **820**: 23, 2014.
112. WALSTRA, P.; WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T. & GEURTS, T.J., *Dairy science and technology*. 2005: CRC press.
113. VARNAM, A. & SUTHERLAND, J.P., *Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology*. Vol. 1. 2001: Springer Science & Business Media.
114. VILELA, D.; RESENDE, J.C.D.; LEITE, J.B. & ALVES, E., "A evolução do leite no Brasil em cinco décadas". *Revista de Política Agrícola*. **26**(1): 5, 2017.

115. NASCIMENTO, C.F.; SANTOS, P.M.; PEREIRA-FILHO, E.R. & ROCHA, F.R.P., "Recent advances on determination of milk adulterants". *Food Chem.* **221**: 1232, 2017.
116. RAZA, N. & KIM, K.-H., "Quantification techniques for important environmental contaminants in milk and dairy products". *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* **98**: 79, 2018.
117. ANDRADE, L.S.; DE MORAES, M.C.; ROCHA-FILHO, R.C.; FATIBELLO-FILHO, O. & CASS, Q.B., "A multidimensional high performance liquid chromatography method coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond electrode for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk". *Anal Chim Acta.* **654**(2): 127, 2009.
118. CAMPBELL, W.C., "History of the Discovery of Sulfaquinoxaline as a Coccidiostat". *Journal of Parasitology.* **94**(4): 934, 2008.
119. BOUSOVA, K.; SENYUVA, H. & MITTENDORF, K., "Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A.* **1274**: 19, 2013.
120. DE PAULA, F.C.C.R.; DE PIETRO, A.C. & CASS, Q.B., "Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up". *Journal of Chromatography A.* **1189**(1): 221, 2008.
121. HAJIAN, R.; MOUSAVI, E. & SHAMS, N., "Net analyte signal standard addition method for simultaneous determination of sulphadiazine and

trimethoprim in bovine milk and veterinary medicines". *Food Chemistry*. **138**(2): 745, 2013.

122. PEREIRA, A.V. & CASS, Q.B., "High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column". *Journal of Chromatography B*. **826**(1): 139, 2005.

123. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P.E.A., *INSTRUÇÃO NORMATIVA No 09*. 2017.

124. SUN, N.; WU, S.; CHEN, H.; ZHENG, D.; XU, J. & YE, Y., "Determination of sulfamethoxazole in milk using molecularly imprinted polymer monolith microextraction coupled to HPLC". *Microchimica Acta*. **179**(1): 33, 2012.

125. ROULLIER-GALL, C.; WITTING, M.; GOUGEON, R.D. & SCHMITT-KOPPLIN, P., "High precision mass measurements for wine metabolomics". *Frontiers in Chemistry*. **2**: 102, 2014.

126. DOS SANTOS, C.A.T.; PÁSCOA, R.N.M.J. & LOPES, J.A., "A review on the application of vibrational spectroscopy in the wine industry: From soil to bottle". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **88**: 100, 2017.

127. WATERHOUSE, A.L.; SACKS, G.L. & JEFFERY, D.W., *Understanding wine chemistry*. 2016: John Wiley & Sons.

128. OLIVEIRA, C.M.; BARROS, A.S.; SILVA FERREIRA, A.C. & SILVA, A.M.S., "Influence of the temperature and oxygen exposure in red Port wine: A kinetic approach". *Food Res Int*. **75**: 337, 2015.

129. MARTINS, R.C.; MONFORTE, A.R. & SILVA FERREIRA, A., "Port Wine Oxidation Management: A Multiparametric Kinetic Approach". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**(22): 5371, 2013.

130. LI, H.; GUO, A. & WANG, H., "Mechanisms of oxidative browning of wine". *Food Chem.* **108**(1): 1, 2008.
131. MARTINS, R.C.; OLIVEIRA, R.; BENTO, F.; GERALDO, D.; LOPES, V.V.; GUEDES DE PINHO, P.; OLIVEIRA, C.M. & SILVA FERREIRA, A.C., "Oxidation Management of White Wines Using Cyclic Voltammetry and Multivariate Process Monitoring". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **56**(24): 12092, 2008.
132. JACOBSON, J.L., *Introduction to wine laboratory practices and procedures.* 2006: Springer Science & Business Media.
133. FULCRAND, H.; DUEÑAS, M.; SALAS, E. & CHEYNIER, V., "Phenolic reactions during winemaking and aging". *American Journal of Enology and Viticulture.* **57**(3): 289, 2006.
134. ROULLIER-GALL, C.; HEMMLER, D.; GONSIOR, M.; LI, Y.; NIKOLANTONAKI, M.; ARON, A.; COELHO, C.; GOUGEON, R.D. & SCHMITT-KOPPLIN, P., "Sulfites and the wine metabolome". *Food Chem.* **237**: 106, 2017.
135. MORENO-ARRIBAS, M.V. & POLO, M.C., *Wine chemistry and biochemistry.* Vol. 378. 2009: Springer.
136. NETO, B.D.B.; SCARMINIO, I.S. & BRUNS, R.E., "25 Anos de Quimiometria no Brasil". *Química Nova.* **29**(6): 1401, 2006.
137. MARTENS, H. & NAES, T., *Multivariate Calibration.* 1 ed. 2002, New York: John Wiley & Sons. 419.
138. OTTO, M., *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry.* 2 ed. 2007, New York: Wiley-VCH.

139. BEEBE, K.R.; PELL, R.J. & SEASHOLTZ, M.B., *Chemometrics: A Practical Guide*. 1ª ed. 1998, New York: Wiley Interscience Publication.
140. THOMAS, E.V., "A primer on multivariate calibration". *Anal Chem.* **66**(15): 795A, 1994.
141. GOLUB, G.H. & LOAN, C.F.V., *Matrix Computation*. 3rd ed. 1996, New York: Johns Hopkins.
142. HARRINGTON, P.D.B.; VIEIRA, N.E.; ESPINOZA, J.; NIEN, J.K.; ROMERO, R. & YERGEY, A.L., "Analysis of variance–principal component analysis: A soft tool for proteomic discovery". *Anal Chim Acta.* **544**(1): 118, 2005.
143. CHEN, P.; LU, Y. & HARRINGTON, P.B., "Biomarker Profiling and Reproducibility Study of MALDI-MS Measurements of Escherichia coli by Analysis of Variance–Principal Component Analysis". *Anal Chem.* **80**(5): 1474, 2008.
144. HARRINGTON, P.D.B.; VIEIRA, N.E.; CHEN, P.; ESPINOZA, J.; NIEN, J.K.; ROMERO, R. & YERGEY, A.L., "Proteomic analysis of amniotic fluids using analysis of variance–principal component analysis and fuzzy rule-building expert systems applied to matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry". *Chemometr Intell Lab.* **82**(1): 283, 2006.
145. CLIMACO PINTO, R.; BOSC, V.; NOÇAIRI, H.; BARROS, A.S. & RUTLEDGE, D.N., "Using ANOVA-PCA for discriminant analysis: Application to the study of mid-infrared spectra of carraghenan gels as a function of concentration and temperature". *Anal Chim Acta.* **629**(1): 47, 2008.
146. SAREMBAUD, J.; PINTO, R.; RUTLEDGE, D.N. & FEINBERG, M., "Application of the ANOVA-PCA method to stability studies of reference materials". *Anal Chim Acta.* **603**(2): 147, 2007.

147. JUAN, A.D. & TAULER, R., "Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures. Revisiting latest trends in multivariate resolution". *Anal Chim Acta*. **500**: 195, 2003.
148. MAS, S.; DE JUAN, A.; LACORTE, S. & TAULER, R., "Photodegradation study of decabromodiphenyl ether by UV spectrophotometry and a hybrid hard- and soft-modelling approach". *Anal Chim Acta*. **618**(1): 18, 2008.
149. WINDIG, W., "Mixture Analysis of Spectral Data by Multivariate Methods". *Chemometr Intell Lab*. **4**(3): 201, 1988.
150. WINDIG, W., "Self-Modeling Mixture Analysis of Spectral Data with Continuous Concentration Profiles". *Chemometr Intell Lab*. **16**(1): 1, 1992.
151. TAULER, R., "Multivariate curve resolution applied to second order data". *Chemometr Intell Lab*. **30**(1): 133, 1995.
152. ABDOLLAHI, H. & TAULER, R., "Uniqueness and rotation ambiguities in Multivariate Curve Resolution methods". *Chemometr Intell Lab*. **108**(2): 100, 2011.
153. DE JUAN, A.; VANDER HEYDEN, Y.; TAULER, R. & MASSART, D.L., "Assessment of new constraints applied to the alternating least squares method". *Anal Chim Acta*. **346**(3): 307, 1997.
154. CARDOSO, J.F., "Blind signal separation: Statistical principles". *P Ieee*. **86**(10): 2009, 1998.
155. STONE, J.V., *Independent Component Analysis: A Tutorial Introduction*. 2004: MIT Press.
156. HYVARINEN, A. & OJA, E., "Independent component analysis: algorithms and applications". *Neural Networks*. **13**(4-5): 411, 2000.

157. HYVÄRINEN, A.; KARHUNEN, J. & OJA, E., *Independent Component Analysis*. 2001: Wiley.
158. COMON, P., "Higher Order Statistics Independent component analysis, A new concept?". *Signal Processing*. **36**(3): 287, 1994.
159. RUTLEDGE, D.N. & JOUAN-RIMBAUD BOUVERESSE, D., "Independent Components Analysis with the JADE algorithm". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **50**: 22, 2013.
160. BOUVERESSE, D.J.R.; BENABID, H. & RUTLEDGE, D.N., "Independent component analysis as a pretreatment method for parallel factor analysis to eliminate artefacts from multiway data". *Anal Chim Acta*. **589**(2): 216, 2007.
161. BRO, R. & SMILDE, A.K., "Principal component analysis". *Analytical Methods*. **6**(9): 2812, 2014.
162. ZARZOSO, V. & HYVÄRINEN, A., *Chapter 6 - Iterative algorithms*, in *Handbook of Blind Source Separation*. 2010, Academic Press: Oxford. p. 179.
163. BINGHAM, E. & HYVÄRINEN, A., "A FAST FIXED-POINT ALGORITHM FOR INDEPENDENT COMPONENT ANALYSIS OF COMPLEX VALUED SIGNALS". *International Journal of Neural Systems*. **10**(01): 1, 2000.
164. BACH, F.R. & JORDAN, M.I., "Kernel independent component analysis". *J. Mach. Learn. Res.* **3**: 1, 2003.
165. STÖGBAUER, H.; KRASKOV, A.; ASTAKHOV, S.A. & GRASSBERGER, P., "Least-dependent-component analysis based on mutual information". *Physical Review E*. **70**(6): 066123, 2004.

166. CARDOSO, J.F. & SOULOUMIAC, A., "Blind beamforming for non-Gaussian signals". *IEE Proceedings F - Radar and Signal Processing*. **140**(6): 362, 1993.
167. MONAKHOVA, Y.B.; KOLESNIKOVA, S.S. & MUSHTAKOVA, S.P., "Independent component analysis algorithms for spectral decomposition in UV/VIS analysis of metal-containing mixtures including multimineral food supplements and platinum concentrates". *Analytical Methods*. **5**(11): 2761, 2013.
168. WANG, G.Q.; HOU, Z.Y.; TANG, Y.X.; ZHAO, J.B.; SUN, Y.A.; DONG, C.H. & FU, D.X., "Determination of endpoint of procedure for radix rehmanniae steamed based on ultraviolet spectrophotometry combination with continuous wavelet transform and kernel independent component analysis". *Anal Chim Acta*. **679**(1-2): 43, 2010.
169. WALTERS-WILLIAMS, J. & LI, Y., "Performance Comparison of Known ICA Algorithms to a Wavelet-ICA Merger". *Signal Processing: An International Journal*. **5**(3): 80, 2011.
170. NAIK, G.R., "A comparison of ICA algorithms in surface EMG signal processing". *International Journal of Biomedical Engineering and Technology*. **6**(4): 363, 2011.
171. SOULOUMIAC, A. & CARDOSO, J.-F. *Comparaisons de methodes de separation de sources*. in *13^o Colloque sur le traitement du signal et des images, FRA, 1991*. 1991: GRETSI, Groupe d'Etudes du Traitement du Signal et des Images.
172. BOUVERESSE, D.J.R.; MOYA-GONZALEZ, A.; AMMARI, F. & RUTLEDGE, D.N., "Two novel methods for the determination of the number of components in independent components analysis models". *Chemometr Intell Lab*. **112**: 24, 2012.

173. DEWAEST, M.; VILLEMEJANE, C.; JOUAN-RIMBAUD BOUVERESSE, D.; EVELEIGH, L.; RUTLEDGE, D.N.; VEREL, A. & MICHON, C., "Interest of coupling ATR-MIR spectroscopy with independent components analysis to follow starch hydrothermal transformations". *Food Hydrocolloids*. **58**: 298, 2016.
174. DURBIN, J. & WATSON, G.S., "Testing for Serial Correlation in Least Squares Regression .3.". *Biometrika*. **58**(1): 1, 1971.
175. AMMARI, F.; CORDELLA, C.B.Y.; BOUGHANMI, N. & RUTLEDGE, D.N., "Independent components analysis applied to 3D-front-face fluorescence spectra of edible oils to study the antioxidant effect of *Nigella sativa* L. extract on the thermal stability of heated oils". *Chemometr Intell Lab*. **113**: 32, 2012.
176. GOURVÉNEC, S.; MASSART, D.L. & RUTLEDGE, D.N., "Determination of the number of components during mixture analysis using the Durbin–Watson criterion in the Orthogonal Projection Approach and in the SIMPLE-to-use Interactive Self-modelling Mixture Analysis approach". *Chemometr Intell Lab*. **61**(1–2): 51, 2002.
177. RUTLEDGE, D.N. & BARROS, A.S., "Durbin–Watson statistic as a morphological estimator of information content". *Anal Chim Acta*. **454**(2): 277, 2002.
178. TAULER, R. 2010.
179. PIERNA, J.A.F.; DUPONCHEL, L.; RUCKEBUSCH, C.; BERTRAND, D.; BAETEN, V. & DARDENNE, P., "Trappist beer identification by vibrational spectroscopy: A chemometric challenge posed at the 'Chimiometrie 2010' congress". *Chemometr Intell Lab*. **113**: 2, 2012.
180. LEE, P.C. & MEISEL, D., "Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols". *J Phys Chem-US*. **86**(17): 3391, 1982.

181. SCHWAB, N.V.; PORCARI, A.M.; COELHO, M.B.; SCHMIDT, E.M.; JARA, J.L.; VISENTAINER, J.V. & EBERLIN, M.N., "Easy dual-mode ambient mass spectrometry with Venturi self-pumping, canned air, disposable parts and voltage-free sonic-spray ionization". *Analyst*. **137**(11): 2537, 2012.
182. GEIMAN, I.; LEONA, M. & LOMBARDI, J.R., "Application of Raman Spectroscopy and Surface-Enhanced Raman Scattering to the Analysis of Synthetic Dyes Found in Ballpoint Pen Inks". *J Forensic Sci*. **54**(4): 947, 2009.
183. MATEJKA, P.; STAVEK, J.; VOLKA, K. & SCHRADER, B., "Near-infrared surface-enhanced Raman scattering spectra of heterocyclic and aromatic species adsorbed on TLC plates activated with silver". *Appl Spectrosc*. **50**(3): 409, 1996.
184. RAU, A., "Basic Experiments in Thin-Layer Chromatography Fourier-Transform Raman-Spectrometry". *J Raman Spectrosc*. **24**(4): 251, 1993.
185. BYWALEZ, R.; KARACUBAN, H.; NIENHAUS, H.; SCHULZ, C. & WIGGERS, H., "Stabilization of mid-sized silicon nanoparticles by functionalization with acrylic acid". *Nanoscale Res Lett*. **7** 2012.
186. HAKIMZADEH, N.; PARASTAR, H. & FATTAHI, M., "Combination of multivariate curve resolution and multivariate classification techniques for comprehensive high-performance liquid chromatography-diode array absorbance detection fingerprints analysis of *Salvia reuterana* extracts". *Journal of Chromatography A*. **1326**: 63, 2014.
187. SALVATORE, E.; COCCHI, M.; MARCHETTI, A.; MARINI, F. & DE JUAN, A., "Determination of phenolic compounds and authentication of PDO Lambrusco wines by HPLC-DAD and chemometric techniques". *Anal Chim Acta*. **761**: 34, 2013.

188. SOCRATES, G., *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*. 2004: John Wiley & Sons.
189. LIN-VIEN, D.; COLTHUP, N.B.; FATELEY, W.G. & GRASSELLI, J.G., *The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules*. 1991: Elsevier.
190. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, *INSTRUÇÃO NORMATIVA No 09*. 2017.
191. ARAYA, J.A.; CARNEIRO, R.L.; ARÉVALO, C.; FREER, J. & CASTILLO, R.D.P., "Single pixel quantification strategies using middle infrared hyperspectral imaging of lignocellulosic fibers and MCR-ALS analysis". *Microchemical Journal*. **134**: 164, 2017.
192. AGUILERA-LUIZ, M.M.; VIDAL, J.L.M.; ROMERO-GONZÁLEZ, R. & FRENICH, A.G., "Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*. **1205**(1–2): 10, 2008.
193. CHEN, Y. & SCHWACK, W., "Planar chromatography mediated screening of tetracycline and fluoroquinolone antibiotics in milk by fluorescence and mass selective detection". *Journal of Chromatography A*. **1312**: 143, 2013.
194. JÄHNKE, R.W.O., *A Concise Quality Control Guide on Essential Drugs and other Medicines: Volume II - Thin Layer Chromatographic Tests*. 2008, Global Pharma Health Fund (GPHF): Frankfurt.
195. JUNIOR, B.R.A.; SOARES, F.L.F.; ARDILA, J.A.; DURANGO, L.G.C.; FORIM, M.R. & CARNEIRO, R.L., "Determination of B-complex vitamins in pharmaceutical formulations by surface-enhanced Raman spectroscopy". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **188**: 589, 2018.

196. VIJAYA CHAMUNDEESWARI, S.P.; JAMES JEBASEELAN SAMUEL, E. & SUNDARAGANESAN, N., "Molecular structure, vibrational spectra, NMR and UV spectral analysis of sulfamethoxazole". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **118**: 1, 2014.
197. UNGUREAN, A.; LEOPOLD, N.; DAVID, L. & CHIȘ, V., "Vibrational spectroscopic and DFT study of trimethoprim". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **102**: 52, 2013.
198. SOARES, F.L.F.; ARDILA, J.A. & CARNEIRO, R.L., "Thin-layer chromatography–surface-enhanced Raman spectroscopy and chemometric tools applied to Pilsner beer fingerprint analysis". *J Raman Spectrosc.* **48**(7): 943, 2017.
199. FORTUNATO DE CARVALHO ROCHA, W.; SABIN, G.P.; MARÇO, P.H. & POPPI, R.J., "Quantitative analysis of piroxicam polymorphs pharmaceutical mixtures by hyperspectral imaging and chemometrics". *Chemometr Intell Lab.* **106**(2): 198, 2011.
200. SABIN, G.P.; DE CARVALHO ROCHA, W.F. & POPPI, R.J., "Study of the similarity between distribution maps of concentration in near-infrared spectroscopy chemical imaging obtained by different multivariate calibration approaches". *Microchemical Journal*. **99**(2): 542, 2011.
201. VAN RHIJN, J.A.; LASAROMS, J.J.P.; BERENDSEN, B.J.A. & BRINKMAN, U.A.T., "Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk". *Journal of Chromatography A*. **960**(1): 121, 2002.
202. HOSU, A.; DANCIU, V. & CIMPOIU, C., "Validated HPTLC fingerprinting and antioxidant activity evaluation of twenty-seven Romanian red wines". *Journal of Food Composition and Analysis*. **41**: 174, 2015.

203. VAHL, J. & CONVERSE, J., "Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study". *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. **63**(2): 194, 1980.
204. LEEM, J.; KANG, H.W.; KO, S.H. & SUNG, H.J., "Controllable Ag nanostructure patterning in a microfluidic channel for real-time SERS systems". *Nanoscale*. **6**(5): 2895, 2014.
205. KNEIPP, K.; KNEIPP, H.; KARTHA, V.B.; MANOHARAN, R.; DEINUM, G.; ITZKAN, I.; DASARI, R.R. & FELD, M.S., "Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS)". *Physical Review E*. **57**(6): R6281, 1998.
206. KIM, S.K.; JOO, T.H.; SUH, S.W. & KIM, M.S., "Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of nucleic acid components in silver sol: Adenine series". *J Raman Spectrosc*. **17**(5): 381, 1986.
207. ZAFFINO, C.; BRUNI, S.; RUSSO, B.; PILU, R.; LAGO, C. & COLONNA, G.M., "Identification of anthocyanins in plant sources and textiles by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS)". *J Raman Spectrosc*. **47**(3): 269, 2016.
208. KUROKAWA, Y.; IMAI, Y.; SASAKI, Y. & MAEDA, T., "Surface-Enhanced Raman Spectroscopic Detection of CO₂-3, SO₂-3, and Nucleic Acid Bases Using Polyvinyl Alcohol Film Doped with Ag Fine Particles". *Analytical Biochemistry*. **209**(2): 247, 1993.
209. PREMASIRI, W.R.; LEE, J.C.; SAUER-BUDGE, A.; THÉBERGE, R.; COSTELLO, C.E. & ZIEGLER, L.D., "The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **408**(17): 4631, 2016.
210. LARKIN, P., *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. 2017: Elsevier.

211. JACKSON, R.S., *Wine tasting: a professional handbook*. 2016: Academic Press.

212. QIAN, H.; LIN, M. & ZHOU, P., "Measurement of Forchlorfenuron in Grapes by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy coupled with Gold Nano substrates". *Int J Food Sci Nutr Diet*. **5**(1): 258, 2016.