



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Física

Dissertação de Mestrado

**Caracterização e detecção de adulterações em mel de
abelha *Apis Mellifera Scutellata* (da região de
Maringá) via métodos espectroscópicos**

Daniele Castilho Oliveira

Maringá, Julho, 2025



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Física

Dissertação de Mestrado

**Caracterização e detecção de adulterações em mel de abelha
Apis Mellifera Scutellata (da região de Maringá) via métodos
espectroscópicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Física

Acadêmica: Daniele Castilho Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Vitor Santaella Zanuto

Maringá, Julho, 2025



State University of Maringá
Center of Exact Sciences
Graduate Program in Physics

Master's thesis

**Characterization and Detection of Adulterations in Honey from
Apis mellifera scutellata (from the Maringá Region) via
Spectroscopic Methods**

Dissertation presented to the Graduate Program
in Physics at the State University of Maringá, as
part of the requirements for obtaining the degree
of Master in Physics

Academic: Daniele Castilho Oliveira

Supervisor: Prof. Dr. Vitor Santaella Zanuto

Maringá, July, 2025

Daniele Castilho Oliveira

**Caracterização e detecção de adulterações em mel de abelha
Apis Mellifera Scutellata (da região de Maringá) via métodos
espectroscópicos**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em Maringá, 24 de julho de 2025.

BANCA AVALIADORA:



Prof. Dr. Vitor Santaella Zanuto - PFI/UEM
Orientador - Presidente



Prof. Dr. Otávio Augusto Capeloto - ISB/UFAM-Coari
Membro Externo



Profa. Dra. Ana Cláudia Nogueira Mulati - UFPR-Jandaia do Sul
Membro Interno (Pós-doutorado PFI/UEM)

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

O48c

Oliveira, Daniele Castilho

Caracterização e detecção de adulterações em mel de abelha *Apis Mellifera Scutellata* (da região de Maringá) via métodos espectroscópicos / Daniele Castilho Oliveira. -- Maringá, PR, 2025.

117 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Vitor Santaella Zanuto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2025.

1. *Apis Mellifera Scutellata*. 2. Quimiometria. 3. Espectroscopia fotoacustica. I. Zanuto, Vitor Santaella, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 23.ed. 535.84

Dedico este trabalho aos meus pais, Denise e Sebastião, por terem priorizado a minha educação, mesmo em meio às dificuldades. Em cada passo desta caminhada, levei comigo a força e o amor de vocês. Esta conquista também é de vocês!

*Palavras são, na minha nada humilde
opinião, nossa inesgotável fonte de
magia.*

J. K. Rowling

Harry Potter e as Relíquias da Morte

Agradecimentos

A Deus, por renovar minhas forças quando pensei em desistir e por abrir caminhos onde antes só havia dúvidas.

Ao meu orientador, Dr. Vitor Zanuto, por toda a paciência, pela orientação, pela confiança depositada em meu trabalho e por me conduzir com dedicação ao longo desta jornada — e, sobretudo, por compreender minhas dificuldades. Sou profundamente grata pela oportunidade de aprendizado e crescimento. Admiro-o imensamente.

À minha família, por todo apoio. Aos meus pais, Denise e Sebastião, obrigada por nunca colocarem obstáculos, apenas apoio — mesmo sem entender muito bem o que eu faço. À minha irmã Ana Kelle, por nunca medir esforços para me ajudar e por estar sempre ali, pronta para tudo. À minha irmã Dayane, pelo carinho, pela escuta e pelas palavras certas nas horas incertas. Ao meu irmão Francisco Alcione, que, mesmo de longe, sempre torceu por mim. E ao meu cunhado Luiz Sant’Anna, pelos conselhos e pelo apoio — que chegou depois, mas logo se tornou parte da família como se sempre estivesse ali. Amo vocês!

Ao Lucas, meu namorado, que viveu cada etapa dessa jornada comigo — dividindo a rotina, os prazos, as dúvidas, o cansaço, os cafés e também as pequenas vitórias.

Aos colegas do grupo de pesquisa: Mari, Vitória, Brenno, Henrique, Jhonathan, Monique, Tel e Marcos, pela ajuda nos laboratórios e pela paciência com minhas dúvidas. Foi um privilégio dividir esse caminho com vocês.

A todos os professores que fazem parte do grupo de pesquisa, meu muito obrigada. Em especial, à Professora Dra. Francielle Sato, pela contribuição e pelos conselhos valiosos durante minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Otávio Capeloto, que acreditou em mim e me incentivou a seguir para o mestrado, inclusive me indicando para estar aqui. Seu apoio teve um papel decisivo nesta caminhada.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho se tornasse possível: meu sincero obrigada.

Resumo

Nesta pesquisa foram avaliadas estratégias espectroscópicas e quimiométricas para caracterizar e identificar adulterações em mel de *Apis mellifera scutellata* do noroeste do Paraná, especificamente da região de Maringá. Amostras puras e adulteradas com diferentes tipos e concentrações de açúcares foram analisadas por espectroscopia fotoacústica na região UV-Vis, espectroscopia Raman e FTIR-ATR. Os açúcares foram: açúcar refinado comercial e açúcares padrão com pureza de 99%, sendo eles frutose, sacarose e glicose. A espectroscopia fotoacústica evidenciou bandas associadas a compostos aromáticos e mostrou resposta fotoquímica relacionada à varredura espectral. A espectroscopia Raman apresentou perfis dominados por bandas de carboidratos, com grande semelhança entre amostras puras e adulteradas, dificultando a diferenciação direta. A espectroscopia por FTIR-ATR revelou maior sensibilidade a alterações composicionais, sobretudo na região de 1200 a 900 cm^{-1} . A Análise de Componentes Principais aplicada aos espectros FTIR permitiu separar amostras conforme o tipo e teor de adulterante, com maior eficácia em concentrações mais elevadas. Os resultados demonstram que métodos espectroscópicos rápidos, aliados a ferramentas multivariadas, são promissores para a triagem e controle de qualidade do mel, possibilitando detectar adulterações com sensibilidade superior à observação visual dos espectros.

Palavras-chave: FTIR-ATR, Raman, Fotoacústica, Quimiometria.

Abstract

This study evaluated spectroscopic and chemometric strategies to characterize and detect adulterations in *Apis mellifera scutellata* honey from the northwest of Paraná, specifically in the Maringá region. Pure samples and samples adulterated with different sugars and concentrations were analyzed by UV-Vis photoacoustic spectroscopy, Raman spectroscopy, and FTIR-ATR. The sugars were commercial refined sugar and standard sugars with 99% purity, namely fructose, sucrose, and glucose. Photoacoustic spectroscopy evidenced bands associated with aromatic compounds and showed photochemical response related to the scan direction. Raman spectroscopy presented spectra dominated by carbohydrate bands, with high similarity between pure and adulterated samples, limiting direct discrimination. FTIR-ATR spectroscopy showed higher sensitivity to compositional changes, especially between 1200 and 900 cm^{-1} . Principal Component Analysis applied to FTIR spectra allowed separation of samples according to adulterant type and level, with greater effectiveness at higher concentrations. The results demonstrate that fast spectroscopic methods combined with multivariate tools are promising for honey screening and quality control, enabling the detection of adulteration with higher sensitivity than visual inspection.

Keywords: FTIR-ATR, Raman, Photoacoustic, Chemometrics.

Lista de Figuras

2.1	Composição aproximada do mel (%). Representação em gráfico de setores dos principais componentes, evidenciando a predominância dos carboidratos em relação à água e às frações minoritárias (minerais, vitaminas, enzimas e outros).	8
3.1	Representação esquemática unidimensional de uma célula fotoacústica modelo RG.	19
3.2	Esquema dos mecanismos de espalhamento.	22
3.3	Espectro Raman do tetracloreto de carbono (CCl_4), obtido com radiação laser de excitação em 488 nm. Observam-se claramente as regiões Stokes, Rayleigh e anti-Stokes.	23
3.4	Representação esquemática dos principais modos vibracionais de uma molécula. (a) Modos de estiramento: estiramento simétrico e assimétrico. (b) Modos de deformação: balanço no plano, tesoura no plano, abanar fora do plano e torção fora do plano. Esses movimentos correspondem aos diferentes tipos de vibrações que podem ser observadas na espectroscopia vibracional.	28
3.5	Esquema de um interferômetro de Michelson iluminado por uma fonte monocromática.	30
3.6	Esquema do acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR).	32
4.1	Espectros de absorção no infravermelho para amostras de mel puro e mel adulterado com diferentes concentrações ($x\%$) de solução de água e açúcar comercial, na região espectral de 1300 a 930 cm^{-1} .	40
4.2	Gráfico das intensidades registradas em 1147 cm^{-1} e 1026 cm^{-1} .	41
5.1	Amostras dos açúcares padrão utilizados nos experimentos, todos com grau de pureza de 99%: a) frutose, b) sacarose e c) glicose.	49
5.2	Amostras de mel puras e adulteradas utilizadas na pesquisa experimental, acondicionadas em microtubos devidamente identificados.	51
5.3	Ilustração da montagem experimental da Espectroscopia Fotoacústica.	53

6.1	Espectro fotoacústico para amostra de mel puro de abelhas (<i>A. Mellifera Scutellata</i>). Círculos abertos são dados experimentais e linha vermelha é um guia para os olhos.	57
6.2	Espectros fotoacústicos obtidos para (a) mel puro, (b) mel + açúcar comercial, (c) mel + frutose, e (d) mel + glicose, todos com 30% de solução adulterante a 45%. Cada amostra foi medida em duas condições: varredura espectral crescente (230 a 600 nm) e decrescente (600 a 230 nm).	59
6.3	Espectros Raman das amostras de mel puro (P1 e P2). (a) Espectros brutos, sem aplicação de qualquer pré-processamento; (b) Espectros após correção de linha de base e aplicação de suavização de ruído (<i>smooth</i>). Os principais picos foram anotados com seus respectivos deslocamentos Raman (cm^{-1}).	61
6.4	Espectros Raman normalizados de amostras de mel puro e mel adulterado com diferentes açúcares. Os espectros correspondem a: (a) mel puro, (b) mel adulterado com sacarose, (c) mel adulterado com glicose, (d) mel adulterado com frutose e (e) mel adulterado com açúcar comercial.	63
6.5	<i>Score plots</i> da PCA aplicados aos espectros Raman das amostras de mel puro e adulterado com diferentes tipos de açúcares. (a) Projeção das amostras nos componentes principais PC1 e PC2. (b) Projeção nos componentes PC1 e PC3.	65
6.6	Espectros de FTIR-ATR de 02 amostras estudadas de mel de abelha (<i>A. Mellifera Scutellata</i>) na região de 4000 a 400 cm^{-1}	68
6.7	Espectros de FTIR-ATR de mel puro e amostras adulteradas na região de 3750 a 430 cm^{-1}	71
6.8	Espectros de absorção normalizados de amostras de mel adulterado com 30% de diferentes tipos de carboidratos, obtidos a partir de soluções aquosas com 15% (a) e 45% (b) de açúcar. A faixa espectral considerada vai de 1750 a 500 cm^{-1}	72
6.9	Evolução dos espectros FTIR-ATR de uma amostra composta por 50% de mel puro e 50% de água destilada ao longo de 5 horas.	75
6.10	<i>Score plots</i> obtidos por PCA aplicada aos espectros FTIR-ATR, considerando a faixa espectral de 1500 a 500 cm^{-1} , com exclusão da banda em 1642 cm^{-1} . Os símbolos correspondem às amostras adulteradas com soluções aquosas contendo (a) 15%, (b) 30% e (c) 45% de açúcar.	78
6.11	<i>Loading plots</i> das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) para o Grupo 4.	81

6.12	<i>Score plots, PC2 versus PC1.</i> As amostras foram agrupadas conforme o tipo de adulterante utilizado: açúcar comercial (quadrado azul), frutose (círculo vermelho), glicose (triângulo magenta), sacarose (losango verde) e mel puro (triângulo invertido roxo). Os rótulos associados aos pontos representam a porcentagem de adulteração da amostra (10%, 20% ou 30%) e o grupo da solução adulterante entre parênteses: (2) solução com 15% de açúcar, (3) com 30%, e (4) com 45%.	83
6.13	Pesos associados às duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2). .	85

Lista de Tabelas

5.1	Composição das amostras do Grupo 1 (controle).	50
5.2	Composição das amostras do Grupo 2 (solução adulterante a 15%).	50
5.3	Composição das amostras do Grupo 3 (solução adulterante a 30%).	50
5.4	Composição das amostras do Grupo 4 (solução adulterante a 45%).	51

Lista de Símbolos

I	Simboliza a intensidade luminosa após atravessar a amostra.
I_0	Simboliza a intensidade inicial da luz incidente.
β	Simboliza o coeficiente de absorção óptica.
x	Simboliza a profundidade de penetração óptica.
l_β	Simboliza o comprimento de absorção óptica.
f	Simboliza a frequência de modulação.
D	Simboliza a difusividade térmica.
μ_s	Simboliza o comprimento de difusão térmica na amostra.
l_s	Simboliza a espessura da amostra.
l_b	Simboliza a espessura do suporte.
$h\nu_0$	Simboliza a energia do fóton incidente.
ε_ν	Simboliza a energia vibracional.
λ	Simboliza o comprimento de onda.
$\mathbf{X}$	Simboliza a matriz de dados original (amostras $\times$ variáveis).
$\tilde{\mathbf{X}}$	Simboliza a matriz de dados centrada.
$\bar{\mathbf{x}}$	Simboliza o vetor de médias das variáveis.
$\mathbf{1}$	Simboliza o vetor coluna de elementos iguais a 1.
$\mathbf{T}$	Simboliza a matriz de <i>scores</i> .
$\mathbf{P}$	Simboliza a matriz de <i>loadings</i> .
$\mathbf{E}$	Simboliza a matriz de resíduos.
λ_j	Simboliza o autovalor da componente principal j .
σ_j	Simboliza o desvio padrão da componente j .
k	Simboliza o número de componentes principais retidos.
$\mathbf{I}$	Simboliza a matriz identidade.

Sumário

1	Introdução	1
2	Considerações sobre o mel	5
2.1	O mel como produto natural	5
2.2	Composição química do mel	7
2.3	Adulteração do mel	9
3	Técnicas de Caracterização	14
3.1	Espectroscopia Fotoacústica	14
3.1.1	Breve contexto histórico	14
3.1.2	Efeito Fotoacústico	15
3.1.3	Comportamento óptico e térmico das amostras	16
3.1.4	Teoria da célula convencional	18
3.2	Espectroscopia Raman	20
3.3	Espectroscopia no Infravermelho	23
3.3.1	Regiões do Infravermelho	25
3.3.2	Modos de Vibração Molecular	26
3.3.3	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR	29
3.3.4	Reflectância Total Atenuada – ATR	32
4	Método Quimiométrico	34
4.1	Introdução	34
4.2	Organização e pré-tratamento de dados	36
4.3	Análise de Componentes Principais - PCA	39
4.3.1	Fundamentos Matemáticos	42
4.3.2	Decomposição por Valores Singulares – SVD	45
5	Procedimentos Experimentais	48
5.1	Preparação de Amostras	48
5.2	Espectroscopia Fotoacústica	52
5.3	Espectroscopia Raman	53
5.4	Espectroscopia FTIR modo ATR	54
6	Resultados e Discussão	56
6.1	Espectroscopia Fotoacústica - PAS	56
6.2	Espectroscopia Raman	60
6.2.1	PCA aplicada aos espectros Raman	64
6.3	Espectroscopia FTIR em modo ATR	67
6.3.1	PCA aplicada aos espectros de FTIR-ATR	76

7 Conclusões	87
Referências Bibliográficas	90

Capítulo 1

Introdução

A fraude alimentar pode ser entendida como a prática intencional de adulterar produtos alimentícios, geralmente motivada por ganhos econômicos, com o objetivo de enganar o consumidor quanto à qualidade, autenticidade, origem ou composição dos alimentos [1, 2]. Essa prática engloba uma variedade de ações deliberadas, como a substituição de ingredientes, a inclusão de substâncias estranhas, alterações físicas ou químicas e representações incorretas ou enganosas nos rótulos e embalagens. De modo geral, a adulteração pode ser classificada em intencional, quando ocorre a adição proposital de materiais de qualidade inferior ou características semelhantes ao produto original, e não intencional, que decorre de contaminações acidentais ao longo da cadeia produtiva, transporte ou armazenamento [1, 3]. Como resultado, estima-se que a fraude alimentar, motivada predominantemente por interesses econômicos, afete diretamente a competitividade justa dos mercados, impondo custos sociais e econômicos expressivos aos produtores e consumidores. Além disso, representa riscos substanciais à saúde pública quando substâncias tóxicas ou alergênicas são utilizadas como adulterantes [4, 5]. De acordo com revisões recentes, a ingestão de produtos adulterados pode provocar efeitos adversos imediatos, como diarreia, vômitos e reações alérgicas, além de consequências crônicas mais graves, incluindo hepatopatias, doenças cardiovasculares e câncer [3]. Frente à gravidade do problema e à dificuldade crescente em identificar fraudes por métodos convencionais, há uma demanda urgente por técnicas analíticas ágeis, sensíveis e preferencialmente não destrutivas, capazes de atuar como ferramentas eficazes de rastreio e autenticação em alimentos diversos [1, 6]. Por isso, têm-se buscado abordagens não-alvo baseadas em técnicas espectroscópicas

rápidas, associadas a análises quimiométricas, que permitam triagens eficazes em tempo reduzido [6, 7].

O mel é um alimento natural, doce e de alto valor nutricional, constituído predominantemente por açúcares como frutose e glicose, além de água, minerais, enzimas, aminoácidos e compostos fenólicos que conferem valor nutricional e diversas propriedades biológicas reconhecidas, incluindo ação antimicrobiana e potencial antioxidante [8, 9]. Produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar floral, que é transformado e armazenado em favos até sua maturação, o mel apresenta composição variável em função da origem botânica e geográfica, das condições climáticas e dos métodos de processamento [8]. Apesar de ser tradicionalmente valorizado como alimento e recurso terapêutico, seu elevado valor comercial e a demanda crescente tornaram-no um dos produtos mais suscetíveis à fraude alimentar global [10]. Revisões recentes apontam que o mel figura de forma recorrente entre os principais alimentos alvo de adulteração em diversos países, seja por práticas de diluição com xaropes de açúcar, seja por rotulagem enganosa de origem floral ou geográfica [10, 11]. Segundo levantamento divulgado pelo Jornal Estadão e pela BBC News Brasil em 2024, o mel ocupa atualmente o terceiro lugar entre os alimentos mais adulterados no mundo, atrás apenas do leite e do azeite de oliva [12, 13]. A matéria publicada pelo portal Food Manufacture reforça que tais adulterações comprometem não apenas a qualidade e o valor nutritivo do produto, mas também a saúde pública e a confiança do consumidor, uma vez que a fraude pode introduzir contaminantes não declarados [14]. Além disso, o impacto econômico dessas práticas é relevante, afetando produtores legítimos que enfrentam concorrência desleal e têm dificuldade de manter preços competitivos frente a produtos fraudulentos [10, 11]. Assim, a adulteração do mel representa uma ameaça real à integridade da cadeia produtiva, exigindo o desenvolvimento e a aplicação de métodos analíticos modernos e sensíveis capazes de autenticar sua composição e origem de forma confiável [10].

Tradicionalmente, a detecção de fraudes no mel recorre a métodos físico-químicos detalhados, como cromatografia, espectrometria de massa isotópica e análise de marcadores químicos, que são precisos, porém, custosos, demorados e demandam preparo extenso

da amostra [15, 16]. Diante disso, cresce o interesse por metodologias rápidas de triagem que possam ser aplicadas em larga escala. Nesse cenário, técnicas espectroscópicas têm se destacado por permitirem análises sem necessidade de reagentes, nem destruição das amostras [6]. Por exemplo, investigações recentes mostraram sucesso na detecção de adulterantes em mel por meio da espectroscopia Raman e do infravermelho, associadas à análise multivariada [15, 17]. A espectroscopia fotoacústica, embora ainda pouco explorada especificamente para mel, demonstrou alto poder discriminativo em outros alimentos [18]. Adicionalmente, estudos recentes empregando espectroscopia na região do UV-visível aplicada à análise de méis adulterados com diferentes tipos de xaropes comercialmente disponíveis demonstraram que, ao associar os dados espectrais a modelos baseados em redes neurais artificiais, foi possível identificar adulterações em níveis superiores a 10% de forma consistente e confiável [19]. Em síntese, a combinação de espectros obtidos em diferentes faixas do espectro eletromagnético, como infravermelho médio por FTIR-ATR, Raman e UV-Vis, com ferramentas estatísticas multivariadas, tem se mostrado promissora para diferenciar méis puros de adulterados.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo caracterizar amostras de mel e identificar eventuais adulterantes por meio de diferentes técnicas espectroscópicas associadas à quimiometria, em especial a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês: *Principal Component Analysis*). Além disso, procurou-se avaliar e comparar a aplicabilidade e o desempenho de cada técnica na diferenciação entre méis puros e adulterados, com o propósito de verificar qual método apresentou melhor resposta e maior capacidade discriminativa no conjunto de amostras analisado. Foram empregados três métodos: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com acessório de reflexão total atenuada (FTIR-ATR, do inglês: *Fourier Transform Infrared spectroscopy - Attenuated Total Reflectance*), espectroscopia Raman e espectroscopia de absorção na região UV-visível por técnica fotoacústica. As amostras de mel utilizadas neste estudo foram coletadas de fontes confiáveis na região de Maringá, Paraná, sendo provenientes de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera scutellata*), tradicionalmente exploradas na apicultura nacional. O conjunto experimental incluiu tanto amostras puras quanto

amostras adulteradas de forma controlada, elaboradas com a adição de soluções preparadas a partir de diferentes tipos de açúcares — açúcar comercial, frutose, glicose e sacarose, sendo estes últimos três utilizados em grau de pureza superior a 99% — com o objetivo de simular situações reais de fraude e avaliar a sensibilidade das técnicas empregadas. A intenção foi identificar adulterações e verificar qual abordagem espectroscópica se mostrou mais eficaz para autenticação do mel, considerando a viabilidade operacional, a rapidez e a sensibilidade analítica. Espera-se, assim, contribuir com o desenvolvimento de protocolos de controle de qualidade que empreguem métodos não destrutivos e análises multivariadas para triagem de fraudes alimentares.

Capítulo 2

Considerações sobre o mel

Este capítulo apresenta uma visão geral sobre o mel como produto natural, abordando seu processo de produção pelas abelhas do gênero *Apis*, com destaque para *Apis mellifera scutellata*, espécie predominante nas amostras deste trabalho. São descritos os principais aspectos da composição química do mel, caracterizada pelo alto teor de açúcares redutores, presença de compostos bioativos, minerais e enzimas que conferem propriedades nutricionais e funcionais. Também são discutidas as principais práticas de adulteração do mel, incluindo a adição de xaropes e açúcares externos, e seus impactos na qualidade, autenticidade e valor comercial do produto, destacando a relevância de métodos analíticos modernos para a detecção eficaz dessas fraudes.

2.1 O mel como produto natural

O mel é um alimento natural produzido biologicamente pelas abelhas a partir do néctar das flores. Segundo a definição do *Codex Alimentarius*, trata-se de uma substância doce natural que as abelhas produzem a partir do néctar de plantas ou secreções de partes vivas das plantas que as abelhas coletam, transformam e armazenam nos favos da colmeia [20]. Historicamente, o mel é utilizado pelo ser humano desde a pré-história, tanto como alimento quanto por suas propriedades terapêuticas [21]. Registros arqueológicos e textos antigos indicam seu uso em civilizações como o Egito e a Grécia antigas, seja na alimentação, na medicina ou em contextos religiosos. Com o passar dos séculos, a relação

do homem com o mel evoluiu de uma simples coleta extrativista em colmeias silvestres para a prática da apicultura racional, que surgiu quando o homem aprendeu a manejar e proteger os enxames de forma sustentável, aumentando a produção sem destruir as colônias [22, 23].

No mundo, existem aproximadamente 20 mil espécies de abelhas (com estimativas chegando a 30 mil) [24]. Dentro desse vasto conjunto, o gênero *Apis* – as chamadas abelhas do mel – destaca-se apesar de englobar apenas uma pequena fração da diversidade total de abelhas. Atualmente, são reconhecidas cerca de 7 a 10 espécies no gênero *Apis* [25], o que representa menos de 0,05% do total de espécies de abelhas conhecidas. Ainda assim, as espécies de *Apis* têm importância desproporcional: elas são as principais abelhas manejadas para polinização agrícola e produção de mel e outros produtos apícolas, com enorme impacto econômico [26]. *Apis mellifera* (abelha-europeia ou ocidental) é a espécie mais difundida e amplamente domesticada desse gênero, tendo sido introduzida por apicultores em todos os continentes, exceto a Antártica [27]. Essa espécie exibiu grande variação geográfica, diferenciando-se em várias dezenas de subespécies ou raças regionais ao longo de sua distribuição nativa na Europa, África e Ásia ocidental [28]. Entre essas subespécies está a *Apis mellifera scutellata*, nativa da África subsaariana, conhecida por sua adaptabilidade às condições tropicais [28].

A subespécie *Apis mellifera scutellata* foi introduzida no Brasil na década de 1950 com o intuito de aumentar a produtividade das colmeias e aprimorar a resistência das abelhas às condições tropicais. O cruzamento natural entre essa subespécie africana e as linhagens europeias de *Apis mellifera* previamente introduzidas no século XIX resultou no surgimento das chamadas **abelhas africanizadas**, híbridas altamente adaptadas às regiões tropicais das Américas [29, 30]. Desde então, *A. mellifera* (incluindo *A. m. scutellata* e seus híbridos) consolidou-se como a principal produtora de mel nos trópicos, aproveitando a diversidade floral para gerar um produto de elevado valor ecológico e econômico. Ressalta-se a relevância da subespécie *Apis mellifera scutellata* neste trabalho, pois todas as amostras de mel utilizadas ao longo dessa pesquisa são provenientes de colônias compostas por abelhas africanizadas, derivadas dessa subespécie.

2.2 Composição química do mel

Quimicamente, o mel é um alimento de composição complexa e variável, contendo mais de 200 diferentes substâncias naturais [31]. Os principais constituintes do mel são os carboidratos, especialmente os açúcares redutores, frutose e glicose, que juntos compõem cerca de 70 a 80% da matéria seca do mel. Em média, a frutose corresponde à maior fração (32 a 44%) e a glicose em torno de 23 a 38%, enquanto dissacarídeos como a sacarose e maltose geralmente somam cerca de 5 a 10% [11, 31, 32]. Além desses açúcares majoritários, o mel pode apresentar, em menores proporções, outros mono-, di-, oligo- e polissacarídeos [32]. O teor de água no mel maduro geralmente varia entre 15% e 20%, sendo tipicamente próximo de 17%, valor fundamental para a estabilidade e conservação do produto, visto que teores de umidade superiores a 20% podem favorecer fermentações indesejadas. Segundo o *Codex Alimentarius*, o mel deve conter no máximo 20% de água em sua composição [20]; no entanto, vale ressaltar que o teor de umidade pode variar conforme o tipo de mel, a região, o clima e o ano de colheita [33].

A matéria seca do mel é composta predominantemente por carboidratos, que correspondem a cerca de 95% de sua massa, sendo os 5% restantes formados por constituintes minoritários, que são importantes para suas características funcionais e nutricionais [21]. Estes incluem ácidos orgânicos (como o ácido glucônico, acético e cítrico), vitaminas (particularmente do complexo B e vitamina C) e minerais como potássio, cálcio, magnésio, sódio, fósforo e ferro, ainda que em concentrações relativamente baixas [31, 32, 33]. O mel também contém proteínas em traços, incluindo enzimas adicionadas pelas abelhas, como invertase, diastase e glicose oxidase, e aminoácidos livres, sendo a prolina o mais abundante, proveniente tanto das abelhas quanto do néctar; além disso, contém grãos de pólen em suspensão [32, 33].

De forma ilustrativa, a Figura 2.1 apresenta a composição aproximada do mel, destacando a predominância dos carboidratos em relação aos demais constituintes

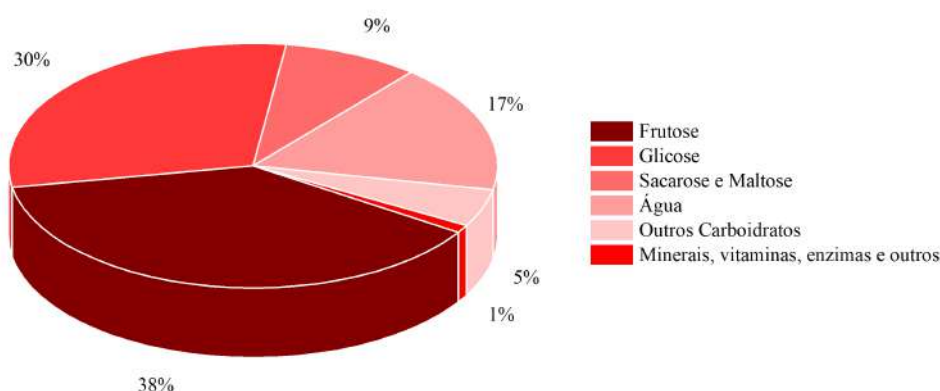


Figura 2.1: Composição aproximada do mel (%). Representação em gráfico de setores dos principais componentes, evidenciando a predominância dos carboidratos em relação à água e às frações minoritárias (minerais, vitaminas, enzimas e outros).

Fonte: Elaborado pela autora.

Destaca-se ainda a presença de compostos bioativos, em especial os compostos fenólicos e flavonoides, conhecidos por sua atividade antioxidante [33]. A quantidade e o perfil desses compostos variam consideravelmente em função da origem floral e geográfica do mel, conferindo ao produto um potencial antioxidante significativo. Análises de méis de diversas origens florais detectaram ácidos fenólicos (como ácido cafeico e ácido ferúlico) e flavonoides (como quercetina e kaempferol), que contribuem para a cor, o sabor e as propriedades funcionais do mel. É importante frisar que estudos indicam que méis de coloração mais escura apresentam, em geral, maior teor de compostos fenólicos do que méis de coloração mais clara [33]. Estes componentes têm sido associados à capacidade antimicrobiana e anti-inflamatória do mel, reforçando seu uso tradicional em aplicações medicinais [33, 34].

Outro parâmetro relevante é o pH do mel, que geralmente varia entre 3,5 e 4,5, refletindo sua acidez natural, a qual contribui tanto para a estabilidade microbiológica quanto para as propriedades sensoriais do produto [31, 32, 35]. A condutividade elétrica é outro indicador útil, correlacionando-se com o teor de minerais e permitindo a diferenciação entre méis de néctar floral e méis de melada, sendo que méis de melada tipicamente apresentam condutividade mais elevada [31, 33].

É importante ressaltar que a composição química do mel pode variar consideravelmente em função de diversos fatores. A origem botânica do néctar constitui o principal determinante. Méis monoflorais, obtidos predominantemente a partir de uma única es-

pécie vegetal, como a laranjeira ou o eucalipto, apresentam perfis sensoriais e químicos específicos. Já os méis multiflorais, conhecidos como silvestres, tendem a apresentar uma composição mais heterogênea. Por exemplo, méis de floradas escuras geralmente contêm mais minerais e compostos fenólicos, apresentando coloração mais intensa e sabor marcante, ao passo que méis claros (ex.: de laranja) apresentam sabor mais suave e menor conteúdo de fenólicos [31]. A região geográfica e as condições climáticas também influenciam a composição. Fatores como tipo de solo, temperatura e umidade afetam a concentração de açúcares e a umidade residual do mel.

Além disso, a espécie de abelha produtora pode impactar determinados parâmetros: embora a maior parte do mel comercializado mundialmente seja produzida por *Apis mellifera*, diferentes subespécies ou espécies de abelhas geram méis com características particulares. No Brasil, por exemplo, as abelhas africanizadas (híbridas derivadas de *A. mellifera scutellata*) predominam nas colmeias, e estudos mostram que seus méis atendem plenamente aos padrões de qualidade, embora pequenas variações em parâmetros físico-químicos possam ocorrer em função da florada utilizada [36]. Méis de abelhas sem ferrão (*Meliponini*), por sua vez, apresentam geralmente maior teor de umidade e acidez, e diferem em sabor e viscosidade em relação ao mel de *Apis*, refletindo diferenças tanto na biologia das abelhas quanto nas fontes de néctar. Assim, cada mel carrega a assinatura química do ecossistema e das abelhas que o produziram, o que explica sua rica diversidade em propriedades organolépticas e nutricionais.

2.3 Adulteração do mel

A adulteração do mel é uma prática fraudulenta que consiste em modificar ou falsificar o produto natural com a finalidade de reduzir custos de produção ou enganar o consumidor quanto à qualidade. A adulteração do mel pode ocorrer de forma direta - com a adição intencional de açúcares externos ou xaropes ao mel puro - ou indireta - por meio da alimentação forçada das abelhas com xaropes durante o período de produção, o que resulta em mel com perfil alterado e aparência de produto genuíno [11, 37].

A forma de adulteração mais comum e preocupante do mel consiste na adição delibe-

rada de açúcares externos, com o objetivo de aumentar de maneira ilícita o volume total do produto e reduzir custos de produção [11]. Entre os adulterantes mais empregados destacam-se diversos xaropes de baixo custo e ampla disponibilidade no mercado, cada um com características específicas de composição e processo produtivo.

O xarope de milho com alto teor de frutose (HFCS, do inglês: *High Fructose Corn Syrup*) é obtido a partir do amido de milho, que passa por hidrólise enzimática para converter as cadeias de amido em glicose, seguida de isomerização parcial dessa glicose em frutose por ação da enzima glicose isomerase. O produto resultante é uma mistura de monossacarídeos livres, predominantemente glicose e frutose, sendo comuns as formulações HFCS-42 ($\approx 42\%$ de frutose) ou HFCS-55 ($\approx 55\%$ de frutose), dependendo do grau de processamento e da aplicação industrial [38].

Outro adulterante recorrente é o açúcar invertido, obtido por hidrólise ácida ou enzimática da sacarose (açúcar comum), processo no qual a ligação glicosídica entre glicose e frutose é quebrada, originando uma solução equimolar desses monossacarídeos [11]. Quando esse produto é mantido em solução aquosa concentrada, recebe o nome de xarope de açúcar invertido, sendo quimicamente equivalente ao açúcar invertido sólido ou cristalizado após evaporação parcial da água. O termo xarope de cana invertido refere-se especificamente ao produto derivado da sacarose extraída da cana-de-açúcar, mas sua composição final é praticamente idêntica à de outros xaropes invertidos de origem vegetal, consistindo de aproximadamente 50% de glicose e 50% de frutose. Apesar das semelhanças quanto ao conteúdo de açúcares simples, esses produtos não são equivalentes ao HFCS, que apresenta maior proporção de frutose e origem amilácea. Essa distinção é relevante porque cada tipo de adulterante interfere de modo particular nas propriedades físico-químicas do mel adulterado e pode ser rastreado por métodos analíticos específicos.

A adição desses xaropes ao mel dilui a concentração de seus constituintes naturais, tais como enzimas, compostos fenólicos e minerais, além de alterar parâmetros críticos de qualidade, incluindo a razão entre frutose e glicose e o teor de açúcares não redutores, como a sacarose residual. Essas alterações configuram clara perda de autenticidade e comprometem a composição nutricional do alimento [10, 11].

Outro efeito importante associado ao uso desses adulterantes é o aumento do teor de 5-hidroxi metilfurfural (HMF), um composto orgânico de baixo peso molecular formado principalmente pela degradação térmica e ácida da frutose, embora também possa derivar, em menor escala, da glicose [33, 39, 40]. O HMF é reconhecido como um marcador sensível da qualidade e do grau de frescor do mel, pois méis recém-processados contêm quantidades muito baixas desse subproduto, geralmente inferiores a 10 mg/kg. A sua formação é favorecida pelo aquecimento prolongado durante processos de pasteurização, pelo armazenamento em temperaturas elevadas e pela presença de xaropes industriais que já contêm HMF gerado durante o processamento prévio do amido ou da sacarose.

Por esse motivo, concentrações elevadas de HMF são frequentemente interpretadas como indicativas de envelhecimento excessivo, tratamento térmico inadequado ou adulteração deliberada com açúcares externos [33, 39, 40]. Nesse sentido, Silva *et al.* [40] relataram que amostras de mel adulteradas com xarope invertido apresentaram elevação significativa dos níveis de HMF, em decorrência das etapas de hidrólise e concentração do xarope, que favorecem a formação desse composto e tornam sua detecção laboratorial uma ferramenta valiosa na identificação de fraudes.

Consequentemente, laboratórios de controle de qualidade costumam monitorar o HMF e a atividade diastásica (enzimas) como indicadores indiretos de adulteração ou superaquecimento do mel. Além dos açúcares, outras adulterações possíveis incluem a adição de água (para aumentar o volume, embora isso tipicamente resulte em mel com umidade fora do padrão e suscetível à fermentação) ou mesmo a alimentação forçada das colmeias com xarope de açúcar durante períodos de produção, prática que, se realizada imediatamente antes da colheita, pode resultar em mel com perfil sacarídico alterado, assemelhando-se a uma fraude [11, 41]. Tal forma de adulteração indireta é considerada particularmente difícil de detectar, pois o mel produzido pelas abelhas a partir de xaropes fornecidos artificialmente apresenta um perfil de açúcares aparentemente genuíno.

Outro desafio atual refere-se ao uso crescente de xaropes oriundos de plantas do ciclo C3, como arroz ou beterraba, que possuem assinaturas isotópicas semelhantes às dos açúcares naturais do mel. Essas fraudes sofisticadas dificultam a detecção por métodos tra-

dicionais, como a análise isotópica de carbono total por espectrometria de razão isotópica (IRMS), tornando necessária a utilização de técnicas analíticas mais avançadas e combinadas [42]. Entre as abordagens modernas destacam-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de razão isotópica (LC-IRMS), que permite determinar a assinatura isotópica individual dos açúcares presentes no mel [43], e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS), capaz de identificar marcadores específicos de adulteração, como manose, difructose anidrido III e oligossacarídeos com elevado grau de polimerização [43]. Destaca-se também a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (^1H -NMR), que fornece perfis químicos abrangentes (*fingerprints*) [43, 44]. Além dessas técnicas, métodos emergentes como a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) associada à quimiometria, a espectroscopia Raman e a imagem hiperespectral (HSI, do inglês: *hyperspectral imaging*) têm sido empregados como ferramentas rápidas e não destrutivas para triagem preliminar de adulterações [44].

As adulterações impactam negativamente a qualidade e o valor nutricional do mel. A diluição com xaropes reduz a concentração dos compostos benéficos (enzimas, antioxidantes, minerais), tornando o produto resultante apenas uma solução açucarada de menor valor biológico. Estudos apontam que méis fraudulentos carecem da atividade antimicrobiana típica do mel genuíno e podem não alcançar o mesmo efeito terapêutico esperado, dada a diminuição de componentes-chave como peróxido de hidrogênio e flavonoides [11, 45].

Do ponto de vista comercial, a adulteração do mel configura uma fraude econômica grave. O consumidor paga por um produto *premium* que não corresponde às características declaradas, enquanto produtores honestos sofrem concorrência desleal de mel falsificado vendido a preços inferiores. Segundo avaliação da União Europeia, pelo menos 14% das amostras de mel inspecionadas em um plano coordenado apresentaram indícios de adulteração de composição, evidenciando a escala desse problema no mercado internacional [41].

Embora o consumo de mel adulterado com açúcares próprios para alimentação hu-

mana não traga, a princípio, grandes riscos diretos à saúde, ele prejudica a confiança do consumidor e compromete a reputação do mel como produto natural [41]. Além disso, certas adulterações podem introduzir contaminantes: por exemplo, xaropes artesanais de baixa qualidade podem conter resíduos de amido ou micro-organismos. Um caso extremo foi a adulteração com xarope de arroz contaminado com melamina, que resultou em escândalos internacionais e demonstrou que fraudes podem introduzir riscos inesperados à saúde [11].

Outras práticas fraudulentas incluem a falsificação da origem botânica ou geográfica, rotular um mel comum como “mel de laranjeira” ou “mel da região X” para agregar valor indevido, e a comercialização de méis de baixa qualidade (por exemplo, mel industrial para uso em alimentos processados) como se fossem mel de mesa de alta qualidade [41]. Em síntese, a adulteração do mel degrada sua qualidade intrínseca, engana o consumidor e provoca danos econômicos e sanitários, sendo objeto de crescente vigilância por órgãos reguladores em todo o mundo.

Por esta razão, o desenvolvimento e aprimoramento contínuo de métodos analíticos para detecção de adulteração em mel constituem uma prioridade na área de controle de qualidade de alimentos.

Capítulo 3

Técnicas de Caracterização

Este capítulo descreve os fundamentos teóricos e aspectos experimentais das técnicas espectroscópicas utilizadas na caracterização das amostras de mel. São abordados os princípios da espectroscopia fotoacústica, destacando seu mecanismo de geração de sinal a partir da absorção óptica e conversão térmica. A espectroscopia Raman é apresentada como técnica complementar baseada na dispersão inelástica da radiação laser. Por fim, são discutidos os fundamentos da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier na modalidade de reflexão total atenuada (FTIR-ATR), ressaltando sua sensibilidade a grupos funcionais.

3.1 Espectroscopia Fotoacústica

3.1.1 Breve contexto histórico

A origem do efeito fotoacústico remonta ao final do século XIX, quando Alexander Graham Bell, em 1880, observou que certos materiais emitiam sons audíveis ao serem expostos à luz solar modulada. Posteriormente, o pesquisador denominou tal fenômeno de *radiophony*. Ainda no trabalho publicado em 1880, Bell também havia desenvolvido o *photophone*, dispositivo que transmitia som por meio de luz modulada, representando uma das primeiras aplicações práticas desse efeito [46]. No ano seguinte, John Tyndall aprofundou o estudo do efeito fotoacústico, investigando gases e vapores. Utilizando um

aparato semelhante ao espectrofone, Tyndall detectou sons gerados pela absorção de luz em diferentes substâncias [47]. Em 1881, Lord Rayleigh propôs que os sons detectados eram resultado de vibrações causadas por aquecimento desigual de diafragmas ou placas iluminadas por luz intermitente, consolidando o entendimento inicial do fenômeno [47].

Apesar do entusiasmo inicial, os estudos sobre o efeito fotoacústico diminuíram nas décadas seguintes, principalmente devido às limitações tecnológicas da época, como a baixa intensidade das fontes luminosas disponíveis e a falta de detectores de áudio sensíveis. Até meados do século XX, o fenômeno foi explorado apenas esporadicamente. A verdadeira retomada do interesse científico e tecnológico ocorreu com a introdução de fontes luminosas intensas, como os lasers, e de detectores acústicos mais sensíveis. Em 1971, L. B. Kreuzer demonstrou a detecção fotoacústica de óxido nítrico (NO) em concentrações de 0,1 partes por bilhão, utilizando um laser de CO₂ modulado, evidenciando o potencial da técnica para análises ultra-sensíveis [48].

Em 1973, Allan Rosencwaig publicou os primeiros espectros fotoacústicos de materiais sólidos, estabelecendo a base para a aplicação da espectroscopia fotoacústica em sistemas condensados [49]. Três anos depois, em 1976, Rosencwaig e Gersho apresentaram uma formulação teórica abrangente para o efeito fotoacústico em sólidos, além de proporem um modelo padrão de célula fotoacústica, baseado nos experimentos que haviam realizado [50]. Nesse trabalho, os autores demonstraram que o sinal fotoacústico é resultado do fluxo periódico de calor entre a superfície do material iluminado e o gás contido na célula. Esse fluxo térmico provoca variações periódicas de pressão no interior da célula, que podem ser detectadas por microfones sensíveis. Além disso, ficou estabelecido que a intensidade do sinal é diretamente proporcional ao coeficiente de absorção óptica da amostra, o que consolidou o uso da técnica como método quantitativo e não destrutivo para materiais opacos.

3.1.2 Efeito Fotoacústico

O efeito fotoacústico pode ser compreendido a partir da conversão de energia luminosa em energia térmica e, subsequentemente, em energia acústica. Quando uma amostra

absorve radiação eletromagnética modulada, parte da energia dos fótons é transferida para suas moléculas, que relaxam por processos não radiativos e dissipam calor no meio [51]. Essa elevação de temperatura ocorre de forma periódica, acompanhando a frequência da modulação da luz.

O aquecimento periódico gera expansões e contrações térmicas do material e/ou do meio ao seu redor (geralmente um gás de acoplamento dentro da célula fotoacústica). Em materiais sólidos, a absorção superficial aquece camadas externas que atuam como um pistão térmico, transferindo calor para o gás adjacente; quando a luz é interrompida, há subsequente contração ao esfriar, puxando o gás de volta. Já em amostras gasosas, a própria absorção da luz pelo gás causa diretamente oscilações de pressão [47]. O resultado é uma onda de pressão sincronizada com a modulação da fonte luminosa, detectável por microfones sensíveis. Para que a geração do som seja eficiente, a frequência da modulação deve ser adequada ao tempo de resposta térmica do sistema. Em resumo, o mecanismo fotoacústico envolve: (i) absorção de fótons pela amostra, (ii) conversão rápida da energia absorvida em calor, (iii) geração de uma variação de temperatura local e consequente expansão/contração periódica, (iv) emissão de ondas acústicas correspondentes a essas oscilações de pressão [51]. Esse princípio – muitas vezes descrito como um “efeito foto-térmico” seguido de um “efeito termoacústico” – explica a origem do sinal fotoacústico detectado externamente.

3.1.3 Comportamento óptico e térmico das amostras

Na Espectroscopia Fotoacústica (PAS, do inglês *Photoacoustic Spectroscopy*), a amostra absorve a luz incidente em determinadas faixas de comprimento de onda, convertendo essa energia luminosa em energia térmica por meio de relaxações não radiativas [50, 52]. A energia dos fótons é absorvida, elevando moléculas/elétrons a estados excitados, que, posteriormente, decaem liberando calor. Essa conversão fototérmica provoca um aumento local de temperatura nas regiões onde ocorre a absorção óptica. Segundo a Lei de Beer-Lambert, a intensidade luminosa decresce exponencialmente conforme atravessa o material:

$$I(x) = I_0 e^{-\beta x}, \quad (3.1)$$

em que x é a coordenada em que a luz está se propagando (considerando $x = 0$ a superfície do meio), I é a intensidade da luz após atravessar a profundidade x , I_0 é a intensidade inicial da luz incidente e β o coeficiente de absorção óptica do meio. Essa relação define um comprimento de absorção óptica (l_β) da ordem de $1/\beta$ [52]. Em materiais altamente absorvedores, o calor gerado se concentra em uma região próxima da superfície. Em materiais mais transparentes, a absorção e, portanto, o aquecimento, ocorrem ao longo de uma camada mais extensa. Essa distribuição determina qual parte da amostra efetivamente contribui para o sinal fotoacústico.

A luz modulada aquece ciclicamente essa camada do material devido à absorção. O aumento de temperatura gera gradientes térmicos que resultam na difusão de calor tanto para o interior da amostra quanto em direção à sua superfície. Forma-se uma onda de difusão térmica cuja profundidade depende da difusividade térmica do material (D) e da frequência de modulação (f). Esses parâmetros definem o comprimento de difusão térmica (μ_s) conforme $\mu_s = \sqrt{D/\pi f}$. Ao alcançar a interface amostra-gás, o calor é transferido, provocando expansão e contração periódica do gás. Este movimento cíclico funciona como um êmbolo térmico, produzindo ondas sonoras no interior da célula fotoacústica, que são detectadas por microfone acoplado ao sistema [52].

Vale salientar que a eficiência desse acoplamento termoacústico depende tanto das propriedades térmicas da amostra e do gás quanto da frequência de modulação da luz, já que somente a camada da amostra aquecida dentro do período de modulação contribui efetivamente para a pressão oscilante gerada [52].

A intensidade do sinal acústico gerado é proporcional à energia luminosa absorvida. Em condições ideais, existe uma relação linear entre o coeficiente de absorção óptica da amostra e a magnitude do sinal gerado, o que permite quantificar absorções ópticas mesmo em materiais opacos. No entanto, em amostras muito espessas ou com altíssima absorção, o sinal fotoacústico tende à saturação — adicionar mais espessura não aumenta o sinal, pois a luz já foi absorvida nas camadas externas [52, 53]. Vale lembrar que, em

condições reais, a amostra não absorve integralmente a luz incidente: parte da radiação pode ser refletida ou transmitida. Essa quantidade de energia não será convertida em calor e, consequentemente, não gerará o sinal fotoacústico. Além disso, se a amostra for termicamente espessa — ou seja, se o calor gerado não atingir a superfície em um ciclo de modulação — parte da energia será dissipada internamente, sem contribuir para a geração do sinal. Portanto, para máxima eficiência, a amostra deve ser tanto opticamente quanto termicamente fina em relação à modulação empregada.

Essa relação integrada entre comportamento óptico e térmico é o que fundamenta a interpretação correta dos sinais gerados em PAS. Assim, a técnica se destaca por permitir a análise de materiais opacos, a obtenção de espectros de absorção e a investigação de processos de relaxação não radiativa com alta sensibilidade. [52].

3.1.4 Teoria da célula convencional

O modelo clássico de célula fotoacústica, desenvolvido por Rosencwaig e Gersho e amplamente conhecido na literatura como modelo RG [50], consiste em uma célula hermeticamente vedada de pequenas dimensões preenchida com gás, na qual se posiciona uma amostra sólida. Esta amostra fica instalada a certa distância de uma janela de vedação óptica que deve apresentar boa transparência à radiação utilizada no experimento.

A Figura 3.1 ilustra a configuração unidimensional tradicional desse sistema. Por meio da janela, um feixe de radiação modulada incide diretamente sobre a superfície da amostra. Nas paredes laterais da célula, é acoplado um microfone capacitivo de alta sensibilidade, responsável por registrar as variações periódicas de pressão no gás. Essas flutuações surgem como consequência do aquecimento cíclico da amostra sólida, que transfere calor ao meio gasoso adjacente, produzindo assim o sinal fotoacústico detectado.

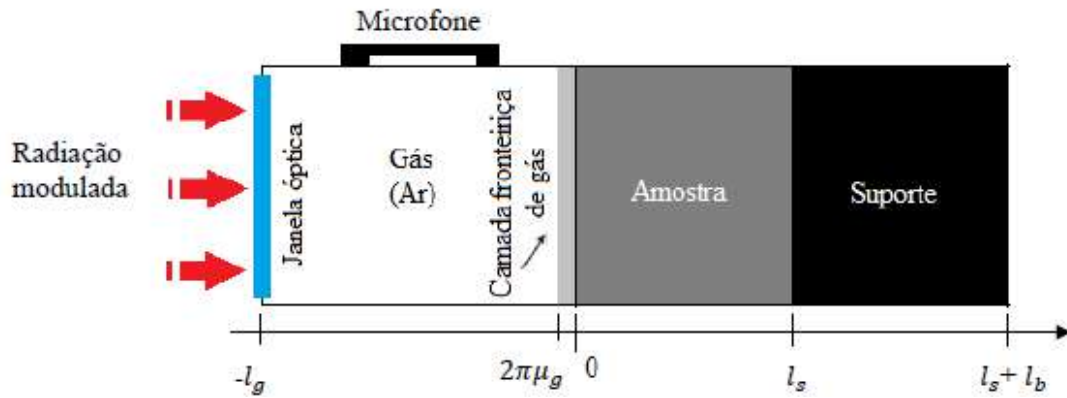


Figura 3.1: Representação esquemática unidimensional de uma célula fotoacústica modelo RG.

Fonte: Reproduzido de Castro (2015) [54].

No modelo unidimensional, define-se a origem da coordenada axial na interface gás-amostra. A coluna de gás possui uma espessura l_g , enquanto a amostra apresenta espessura l_s e, posteriormente, pode haver um suporte de espessura l_b . Dessa forma, a espessura total do sistema amostra-suporte é $l_s + l_b$. Um aspecto crítico no projeto experimental é a espessura relativa da coluna de gás: se a camada gasosa for termicamente espessa — isto é, se l_g exceder consideravelmente o comprimento de difusão térmica do gás, a intensidade do sinal se torna muito reduzida, podendo chegar a valores próximos de zero em função da dissipação térmica. A máxima intensidade do sinal ocorre quando a espessura do gás é aproximadamente igual ao comprimento de difusão térmica, ou seja, $l_g \approx \mu_g$.

A espectroscopia fotoacústica, assim denominada, caracteriza-se justamente pela obtenção de espectros de absorção óptica a partir do sinal gerado pela absorção de radiação modulada de comprimento de onda conhecido. O sinal resultante reflete a interação entre a energia incidente e a amostra, convertida parcialmente em calor e transformada em ondas de pressão detectáveis.

No âmbito experimental, dois parâmetros principais descrevem o comportamento do sinal fotoacústico: a amplitude e a fase. A amplitude, que corresponde à intensidade do sinal, é dependente de diversas contribuições; por exemplo, ela é proporcional à potência da radiação incidente, é inversamente relacionada à temperatura média do gás e à espessura da coluna gasosa, ainda é dependente do perfil térmico que se estabelece na interface amostra-gás. A quantidade de radiação absorvida, a profundidade de penetração óptica e

as características de difusão térmica da amostra afetam diretamente a amplitude do sinal, uma vez que determinam o gradiente de temperatura gerado na superfície irradiada [50, 52].

Por outro lado, a fase do sinal fotoacústico apresenta características distintas: ela não depende da potência da fonte de iluminação, sendo relativamente imune a variações de intensidade luminosa durante a medição. Isso confere à fase vantagens específicas, pois flutuações da potência radiante influenciam sobretudo a amplitude e tendem a não afetar o deslocamento de fase do sinal detectado. A fase está intimamente ligada ao comprimento de difusão térmica na amostra e varia com a profundidade na qual ocorre a geração de calor. Além disso, diferentes mecanismos de absorção óptica e de relaxação térmica podem produzir respostas de fase distintas, permitindo que se identifiquem centros absorvedores ou regiões de acúmulo de calor na amostra [54].

Assim, a análise combinada da amplitude e da fase do sinal fotoacústico fornece informações complementares sobre as propriedades ópticas e térmicas do material investigado, constituindo um recurso poderoso na caracterização espectroscópica de sólidos.

3.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica vibracional que se fundamenta no estudo do espalhamento inelástico da luz ao interagir com a matéria, proporcionando informações detalhadas sobre os modos de vibração e, conseqüentemente, sobre a estrutura molecular dos compostos investigados [55]. De modo geral, as técnicas espectroscópicas envolvem a incidência de radiação sobre uma amostra e a análise dos diversos fenômenos resultantes dessa interação, como absorção, transmissão, reflexão, fotoluminescência ou espalhamento. No caso específico da espectroscopia Raman, o princípio básico consiste em irradiar o material com um feixe monocromático, frequentemente proveniente de um laser operando na região do visível ou do infravermelho próximo, e medir o espectro da radiação espalhada em ângulo adequado, geralmente 90° [56, 57].

Historicamente, o efeito Raman foi observado pela primeira vez em 1928 pelo físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman (1888–1970), que, ao irradiar um líquido e ana-

lisar cuidadosamente o espalhamento, identificou componentes de luz com comprimentos de onda distintos do feixe incidente. Esse fenômeno, então inédito, ficou conhecido como espalhamento Raman em sua homenagem [58, 59]. Na experiência pioneira de Raman, utilizava-se inicialmente a luz solar como fonte de excitação, filtrada antes de incidir sobre a amostra, e a detecção era realizada meramente com o auxílio do olho humano. Com o desenvolvimento tecnológico, a utilização de lasers e detectores sensíveis possibilitou grande avanço na precisão e na reprodutibilidade dos espectros Raman.

Do ponto de vista físico, o efeito Raman ocorre quando o campo eletromagnético oscilante do feixe incidente interage com as ligações químicas da molécula, provocando uma polarização temporária. Nessa interação, a molécula é excitada a um estado virtual, que não corresponde a um nível eletrônico real, mas sim a uma perturbação transitória altamente instável. Devido ao caráter efêmero desse estado virtual, a molécula retorna quase imediatamente a um nível vibracional diferente daquele em que se encontrava, resultando na emissão de um fóton espalhado com energia distinta daquela do fóton incidente.

Dependendo do estado vibracional inicial da molécula, diferentes tipos de espalhamento podem ocorrer durante a interação com a radiação incidente de energia $h\nu_0$. Quando a molécula se encontra em seu nível vibracional fundamental e, após a interação, decai para um estado vibracional excitado de energia e_ν , o fóton reemitido apresenta energia reduzida ($h\nu_0 - e_\nu$). Esse processo é denominado *espalhamento Raman Stokes*. Por outro lado, se a molécula já estiver previamente em um nível vibracional excitado (e_ν) — situação descrita pela distribuição estatística de Boltzmann —, a interação pode promovê-la a um estado virtual, seguida de decaimento para o estado fundamental. Nesse caso, o fóton espalhado possui energia superior à do fóton incidente ($h\nu_0 + e_\nu$), caracterizando o *espalhamento Raman anti-Stokes*. Por fim, quando não ocorre qualquer variação no conteúdo energético da molécula, de modo que ela retorne ao mesmo nível vibracional após a perturbação, há apenas mudança na direção de propagação da radiação, sem alteração de frequência. Esse fenômeno corresponde ao *espalhamento Rayleigh*, no qual o fóton espalhado conserva integralmente a energia da radiação incidente ($h\nu_0$). O es-

palhamento Rayleigh responde por mais de 99% da radiação espalhada na maioria das amostras [56, 57]. A Figura 3.2 ilustra esses três tipos de espalhamento: *Stokes*, *Rayleigh* e *anti-Stokes*, apresentados da esquerda para a direita.

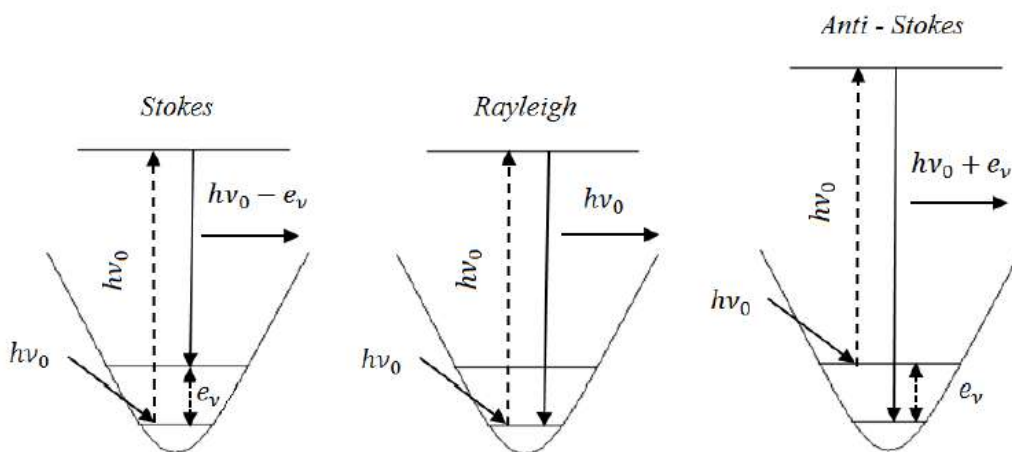


Figura 3.2: Esquema dos mecanismos de espalhamento.

Fonte: Reproduzido de Rodrigues (2017) [60].

Apesar do espectro Raman apresentar regiões correspondentes tanto ao espalhamento Stokes quanto ao anti-Stokes, na prática, os sinais Stokes são mais intensos, uma vez que a maior parte das moléculas encontra-se no estado vibracional fundamental. Além disso, o pico Rayleigh é extremamente intenso e, portanto, frequentemente é filtrado durante a aquisição do espectro, de modo a não ofuscar os sinais Raman, que representam apenas uma fração ínfima da radiação total incidente, da ordem de 1 fóton em 10 milhões. Ainda assim, a utilização de detectores altamente sensíveis, como dispositivos de carga acoplada (CCDs) e sistemas de rejeição eficiente da radiação Rayleigh, possibilita a obtenção de espectros Raman com elevada relação sinal-ruído [58].

É importante ressaltar que a atividade Raman de uma determinada vibração molecular depende fundamentalmente da variação da polarizabilidade ao longo da vibração. Em outras palavras, para que o modo vibracional seja Raman ativo, a interação com o feixe incidente deve induzir uma deformação na distribuição eletrônica da molécula. Esse requisito distingue a espectroscopia Raman da espectroscopia no infravermelho, cuja seleção depende da variação do momento dipolar molecular durante a vibração [55, 57]. Assim, essas técnicas são frequentemente consideradas complementares, permitindo acesso

a diferentes modos vibracionais e informações estruturais.

De maneira simplificada, cada pico no espectro Raman reflete a diferença de energia entre o estado vibracional inicial e o final da molécula e, portanto, corresponde a uma frequência vibracional característica. Essas assinaturas vibracionais constituem uma espécie de “impressão digital” que possibilita a identificação e caracterização qualitativa e quantitativa dos materiais investigados. Por fim, o espectro Raman é normalmente expresso em função do deslocamento de frequência em número de onda (cm^{-1}) em relação ao feixe laser de excitação, contemplando as regiões Stokes e, eventualmente, anti-Stokes, como mostrado na Figura 3.3.

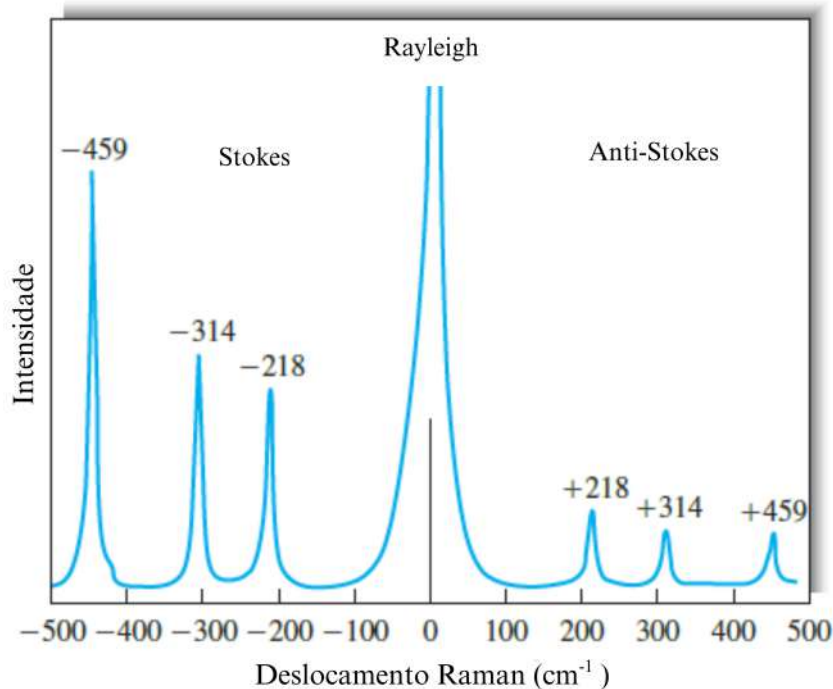


Figura 3.3: Espectro Raman do tetracloreto de carbono (CCl_4), obtido com radiação laser de excitação em 488 nm. Observam-se claramente as regiões Stokes, Rayleigh e anti-Stokes.

Fonte: Adaptado de Skoog *et al.* (2017) [61].

3.3 Espectroscopia no Infravermelho

A espectroscopia infravermelho (IR, do inglês *infrared*) é uma técnica amplamente empregada na identificação e caracterização de substâncias, fundamentada na absorção de radiação eletromagnética infravermelha por moléculas. Quando uma molécula é irradiada com luz infravermelha, podem ocorrer transições entre níveis vibracionais de suas liga-

ções químicas e grupos funcionais, desde que a energia do fóton incidente corresponda à diferença de energia vibracional entre esses níveis. Esse processo origina o espectro de absorção no infravermelho, caracterizado por bandas de absorção em frequências específicas que funcionam como uma “impressão digital” molecular [62].

De modo geral, cada tipo de ligação química ou grupo funcional apresenta frequências vibracionais características na região do infravermelho, com níveis de energia que dependem de diversos fatores, como a geometria molecular, o perfil de energia potencial da molécula e as massas dos átomos envolvidos. Por exemplo, a ligação dupla carbono-oxigênio ($C=O$), presente em compostos carbonílicos, costuma produzir uma banda intensa em torno de 1700 cm^{-1} , enquanto ligações $O-H$ geralmente originam bandas largas na região de $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ [62]. Essas chamadas *frequências grupais* permitem inferir quais grupos funcionais estão presentes em uma amostra desconhecida, o que torna a técnica extremamente valiosa em química orgânica e na análise de materiais [62].

A espectroscopia IR é classificada como uma técnica de espectroscopia vibracional, assim como a espectroscopia Raman. Ambas fornecem informações sobre os modos vibracionais das moléculas, embora por mecanismos distintos. No caso da absorção no infravermelho, um requisito fundamental é que a vibração molecular provoque uma variação no momento de dipolo — apenas nesse caso a radiação infravermelha poderá ser absorvida e gerar um sinal observável [63]. Consequentemente, moléculas diatômicas homonucleares, como N_2 ou O_2 , que não apresentam variações de dipolo durante as vibrações, são transparentes à radiação infravermelha, ou seja, não exibem bandas no espectro IR, ainda que possuam modos vibracionais [64]. Por outro lado, a espectroscopia Raman fundamenta-se nas variações da polarizabilidade molecular durante a vibração, conforme discutido na seção anterior. Dessa forma, ambas as técnicas se complementam na caracterização de substâncias, uma vez que modos vibracionais inativos no IR podem ser observáveis no espectro Raman, e vice-versa [64].

3.3.1 Regiões do Infravermelho

A região infravermelha do espectro eletromagnético abrange comprimentos de onda entre aproximadamente $0,78\ \mu\text{m}$ e $100\ \mu\text{m}$, correspondendo a frequências vibracionais de cerca de ($13000\ \text{cm}^{-1}$ até $100\ \text{cm}^{-1}$). Convencionalmente, divide-se o IR em três sub-regiões: infravermelho próximo, médio e distante [63, 65]. O IR próximo (NIR) corresponde ao intervalo $0,7 - 2,5\ \mu\text{m}$ ($13000 - 4000\ \text{cm}^{-1}$) e faz fronteira com a região do visível. Nessa faixa de energias mais elevadas ocorrem principalmente sobretons e combinações de modos vibracionais fundamentais, isto é, transições vibracionais de ordem superior, geralmente de intensidade fraca [66]. Apesar de menos informativo quanto à identificação de grupos funcionais específicos (visto que as bandas NIR são largas e sobrepostas), o IR próximo encontra amplo uso em aplicações industriais e ambientais para análises quantitativas rápidas, empregando técnicas de quimiometria e calibração multivariada [66].

O infravermelho médio (MIR), aproximadamente entre $2,5 - 50\ \mu\text{m}$ ($4000 - 400\ \text{cm}^{-1}$), abrange os principais modos vibracionais fundamentais das moléculas e é a região de maior interesse para caracterização química qualitativa [63, 65]. Nessa região encontram-se as frequências de estiramento e deformação correspondentes às ligações comuns em compostos orgânicos e inorgânicos – por exemplo, as vibrações C–H, N–H e O–H aparecem entre $2700-3700\ \text{cm}^{-1}$; duplas ligações C=C em torno de $1600\ \text{cm}^{-1}$; ligações C–O entre $1000-1300\ \text{cm}^{-1}$, e assim por diante [62]. Devido à riqueza de informações e à especificidade das bandas, a região do IR médio é considerada a “impressão digital” molecular: pequenas diferenças estruturais refletem-se em mudanças nas posições e intensidades das bandas, permitindo diferenciar substâncias e identificar estruturas desconhecidas. Grande parte dos espectrofotômetros de IR operam nesse intervalo, e técnicas acessórias (como ATR, discutida adiante) foram otimizadas especialmente para o IR médio [67].

Por fim, o IR distante, cobre aproximadamente $50-100\ \mu\text{m}$, o que corresponde a cerca de $400-100\ \text{cm}^{-1}$, fazendo a transição para a região de micro-ondas e terahertz. As energias nessa faixa são baixas o suficiente para excitar modos vibracionais envolvendo átomos mais pesados ou estruturas coletivas em sólidos cristalinos (redes iônicas, complexos metálicos, etc.), bem como rotações moleculares de moléculas simples [55]. Por exemplo,

vibrações de ligações metal–ligante e oscilações de retículo cristalino aparecem no IR distante, frequentemente abaixo de 300 cm^{-1} [68]. Embora seja uma região menos explorada em laboratórios de rotina – em parte devido à menor intensidade luminosa das fontes e à menor sensibilidade dos detectores nessa faixa – o IR distante tem aplicações especializadas em espectroscopia de materiais inorgânicos, mineralogia e estudos de semicondutores [55].

3.3.2 Modos de Vibração Molecular

Ao tratar dos modos de vibração molecular, é essencial compreender como os átomos podem se mover. Cada átomo possui liberdade de movimento em três coordenadas, ou seja, em um espaço tridimensional. Assim, em um sistema contendo N átomos livres, existem $3N$ graus de liberdade. Esses graus de liberdade correspondem a modos independentes pelos quais uma molécula pode se mover ou armazenar energia. Quando os átomos se combinam para formar uma molécula composta por N átomos, a molécula resultante mantém $3N$ graus de liberdade. Desses, três estão associados à translação do centro de massa da molécula e outros três à rotação ao redor de seus eixos coordenados. Portanto, restam $3N - 6$ graus de liberdade vibracional para moléculas não lineares. Para moléculas lineares, uma das rotações — aquela em torno do eixo internuclear — não é considerada, resultando em $3N - 5$ graus de liberdade vibracional. Esses graus de liberdade correspondem aos modos normais de vibração da molécula [57, 63].

Os modos normais de vibração molecular podem ser agrupados em duas categorias principais: vibrações de estiramento (ou alongamento) e vibrações de deformação angular (também chamadas de flexão ou dobramento) [63]. Nas vibrações de estiramento, dois átomos ligados oscilam ao longo do eixo da ligação, variando seu comprimento como se estivessem conectados por uma mola. Nas vibrações de deformação, a distância entre os átomos permanece praticamente constante, mas o ângulo da ligação varia — como se as ligações se “dobrassem” periodicamente.

Um exemplo ilustrativo é a molécula de dióxido de carbono ($\text{O}=\text{C}=\text{O}$), linear e simétrica, como ilustrado na Figura 3.4. Essa molécula apresenta um modo de estiramento

simétrico (em que os dois átomos de oxigênio oscilam em fase, aproximando-se e afastando-se do carbono) e um modo de estiramento assimétrico (em que um oxigênio se aproxima enquanto o outro se afasta, oscilando fora de fase). O modo de estiramento assimétrico do CO_2 é ativo no infravermelho, pois envolve variação do dipolo, e aparece como uma banda intensa próxima de 2349 cm^{-1} . Já o modo simétrico, que não gera variação de dipolo, é inativo no infravermelho, embora seja Raman-ativo. Em geral, estiramentos simétricos ocorrem quando ligantes idênticos vibram em fase, e estiramentos assimétricos, quando vibram fora de fase. Para um mesmo grupo funcional, o estiramento assimétrico tende a ocorrer em frequências mais altas que o simétrico, devido à maior variação do momento de dipolo e à maior constante de força [63].

As vibrações de deformação subdividem-se em diferentes tipos, de acordo com a direção do movimento em relação ao plano molecular. No grupo metileno (CH_2), por exemplo, existem quatro modos de deformação distintos: dois no plano e dois fora do plano. Os modos no plano incluem a deformação de tesoura (*scissoring*), na qual os átomos de hidrogênio oscilam aproximando-se e afastando-se, como lâminas de uma tesoura, e a deformação de balanço (*rocking*), em que ambos os hidrogênios se movem na mesma direção dentro do plano, como um balanço. Os modos fora do plano incluem a deformação de abaulamento (*wagging*), em que os hidrogênios oscilam juntos para fora e para dentro do plano molecular, e a deformação de torção (*twisting*), na qual um hidrogênio se move para fora do plano enquanto o outro entra, torcendo o grupo CH_2 [69].

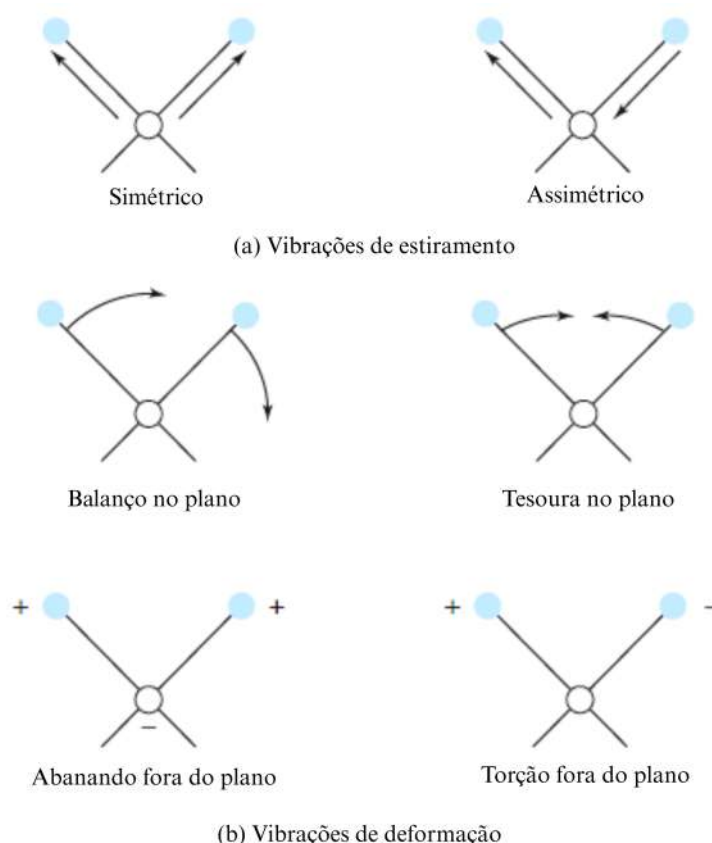


Figura 3.4: Representação esquemática dos principais modos vibracionais de uma molécula. (a) Modos de estiramento: estiramento simétrico e assimétrico. (b) Modos de deformação: balanço no plano, tesoura no plano, abanar fora do plano e torção fora do plano. Esses movimentos correspondem aos diferentes tipos de vibrações que podem ser observadas na espectroscopia vibracional.

Fonte: Adaptado de Skoog *et al.* (2017) [61].

Cada um desses modos possui frequência vibracional própria e pode, ou não, ser ativo no espectro IR, dependendo da simetria da molécula. Em moléculas maiores, é comum utilizar letras gregas para designar os modos vibracionais: ν para estiramento (*stretching*), δ para flexão no plano (*bending/scissoring*), ρ para balanço (*rocking*), ω para abaulamento (*wagging*) e τ para torção (*twisting*) [69]. De modo geral, as vibrações de deformação ocorrem em frequências mais baixas que os estiramentos correspondentes, pois envolvem deslocamentos angulares, que requerem menos energia. No caso do grupo metileno CH_2 , por exemplo, as bandas de deformação aparecem tipicamente em 1465 cm^{-1} (deformação assimétrica) e entre $1450\text{--}1375\text{ cm}^{-1}$ (deformações simétricas), enquanto os estiramentos C–H ocorrem entre $2850\text{--}2930\text{ cm}^{-1}$ [62].

Identificar os tipos de vibração presentes em um espectro é fundamental para sua in-

interpretação. Frequentemente, a confirmação da presença de um grupo funcional específico resulta da observação conjunta de um estiramento e de uma deformação associados. Por exemplo, álcoois exibem uma banda de estiramento O–H larga em torno de 3400 cm^{-1} e, simultaneamente, uma banda de deformação O–H fora do plano (deformação livre) por volta de $650\text{--}600\text{ cm}^{-1}$. A presença de ambas as bandas confirma a existência do grupo –OH. Assim, compreender os diversos tipos de vibração — estiramentos (simétrico e assimétrico) e deformações (tesoura, balanço, abaulamento, torção) — fornece as ferramentas necessárias para interpretar espectros de IR de maneira abrangente, correlacionando cada banda observada com um movimento vibracional específico da molécula em estudo [63].

3.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR

Os primeiros espectrofotômetros de infravermelho, desenvolvidos nas décadas de 1940 e 1950, utilizavam prismas ou grades de difração para dispersar a luz e varrer as frequências individualmente — o chamado método dispersivo, análogo ao espectrofotômetro UV-Vis tradicional [61, 63]. Embora revolucionários para a época, esses instrumentos apresentavam limitações quanto à sensibilidade e velocidade, pois exigiam a varredura ponto a ponto de todo o espectro, com fendas estreitas para garantir resolução adequada. Isso resultava em baixo rendimento de luz (pouca energia atingindo o detector) e em relações sinal/ruído reduzidas.

A partir dos anos 1960 — e especialmente com os avanços computacionais das décadas de 1970 e 1980 — houve uma verdadeira revolução na espectroscopia IR com a introdução da técnica de espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR). Diferentemente do método dispersivo, um espectrômetro FTIR não utiliza fendas nem varredura monocromática; em vez disso, emprega um interferômetro de Michelson para coletar dados no domínio do tempo, os quais são posteriormente convertidos para o domínio das frequências por meio da transformada de Fourier [70].

O interferômetro de Michelson — esquematizado na Figura 3.5 — é composto por uma fonte de radiação, um colimador, um divisor de feixe (*beamsplitter*) e dois espelhos: um

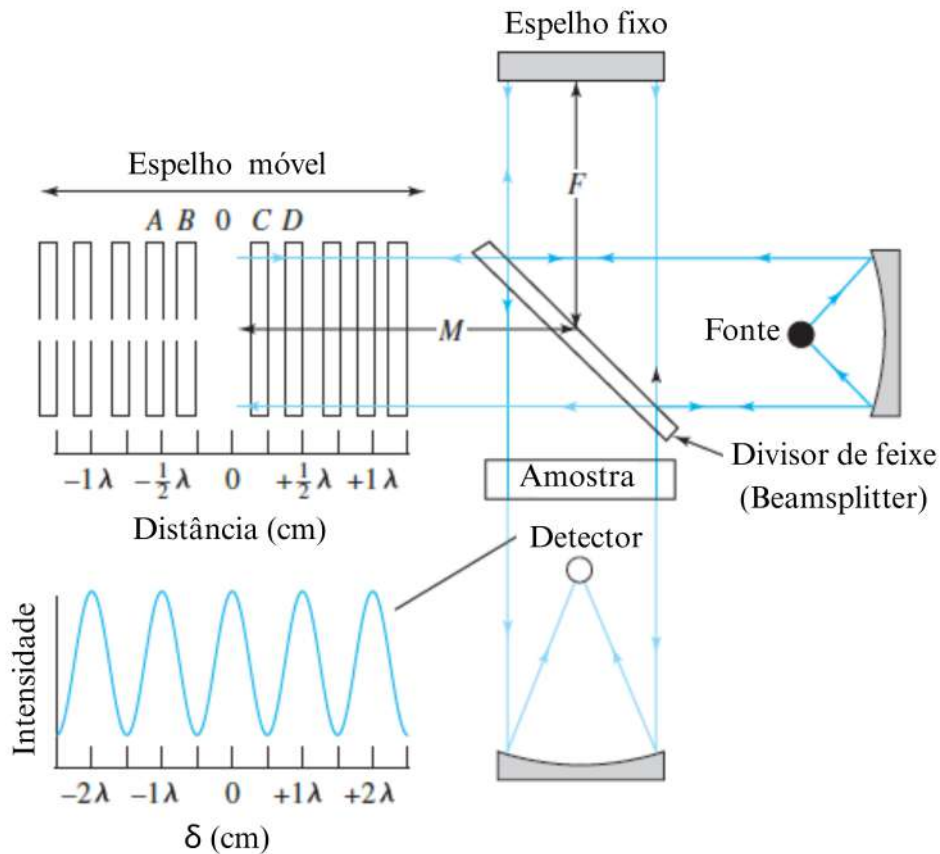


Figura 3.5: Esquema de um interferômetro de Michelson iluminado por uma fonte monocromática.

Fonte: Adaptado de Skoog *et al.* (2017) [61].

fixo e um móvel. A radiação colimada incide sobre o divisor de feixe, sendo separada em dois caminhos ópticos distintos: um em direção ao espelho fixo e outro ao espelho móvel. Após serem refletidos, os feixes retornam ao divisor de feixe, onde são recombinais e direcionados ao compartimento da amostra [61]. O deslocamento horizontal do espelho móvel provoca variações periódicas na diferença de caminho óptico entre os feixes, gerando interferência construtiva ou destrutiva, conforme a diferença de fase entre eles. O feixe resultante, então, segue para o detector.

O princípio fundamental da interferência baseia-se nessa diferença de caminho óptico. Para uma fonte monocromática, quando o espelho móvel se desloca por uma distância de $\lambda/4$, o caminho óptico total do feixe que atinge esse espelho varia em $\lambda/2$, pois a radiação percorre essa distância duas vezes (ida e volta), ou deixa de percorrer essa distância. Esse deslocamento induz uma diferença de fase entre os dois feixes recombinados, modulando

a intensidade detectada de forma reprodutível.

Quando a diferença de caminho óptico corresponde a múltiplos pares de $\lambda/2$, os feixes estão em fase e ocorre interferência construtiva, resultando em intensidade máxima no detector. Por outro lado, quando essa diferença corresponde a múltiplos ímpares de $\lambda/2$, ocorre interferência destrutiva, com intensidade mínima. Essa variação periódica de intensidade em função do deslocamento do espelho móvel dá origem ao chamado *interferograma*, que é o sinal bruto registrado pelo detector.

O atraso óptico (δ) entre os feixes é definido como $\delta = 2(M - F)$, em que M é a posição do espelho móvel e F , a do espelho fixo. O gráfico da intensidade detectada em função de δ corresponde ao interferograma. No caso de uma fonte monocromática, esse interferograma tem forma cossenoidal, com intensidade máxima em $\delta = 0$, quando os caminhos ópticos são iguais e os feixes estão perfeitamente em fase.

Quando a radiação passa pela amostra, parte dela é absorvida nas frequências correspondentes aos modos vibracionais moleculares. Assim, a luz emergente sofre alterações na intensidade, o que se reflete na forma do interferograma. O detector registra esse sinal modificado em tempo real. No processamento computacional, o interferograma da amostra é comparado com um interferograma de referência (sem amostra). Por meio da aplicação da transformada de Fourier, os sinais registrados no domínio do tempo são convertidos para o domínio das frequências.

O espectro final é normalmente apresentado em termos de transmitância, calculada a partir da razão entre a intensidade da radiação transmitida pela amostra (I) e a intensidade incidente (I_0) [71]:

$$T = \frac{I}{I_0}. \quad (3.1)$$

A partir dessa relação, pode-se também obter o espectro de absorção, por meio de manipulação matemática. Alternativamente, a técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR) permite a obtenção direta do espectro de absorção. Esse acessório pode ser acoplado ao compartimento da amostra de um espectrômetro FTIR convencional.

3.3.4 Reflectância Total Atenuada – ATR

O espectro de absorção pode ser obtido diretamente por meio de um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*) inserido no compartimento de amostra do FTIR. Nesse acessório, a radiação infravermelha incide sobre um cristal de alto índice de refração e penetra superficialmente na amostra em contato com sua superfície, permitindo a coleta do espectro sem a necessidade de preparos complexos. A técnica de Reflexão Total Atenuada revolucionou a forma de preparar e analisar amostras na espectroscopia no IR. No modo tradicional de transmissão, era necessário que a amostra fosse suficientemente fina (na ordem de poucos micrômetros, no caso de líquidos ou sólidos) para permitir a passagem da radiação infravermelha. Isso implicava procedimentos de preparo trabalhosos, como prensar pastilhas de KBr com a amostra pulverizada ou produzir filmes delgados, além de limitar a análise de materiais fortemente absorventes, como soluções aquosas concentradas [61].

O acessório ATR contorna essas limitações ao permitir a análise da amostra por meio de reflexão interna em um cristal de alto índice de refração. Nesse arranjo, um feixe colimado de luz infravermelha incide sobre um cristal óptico (tipicamente de diamante, ZnSe ou Ge, com índices de refração entre 2,4 e 4,0), sob um ângulo maior que o ângulo crítico da interface cristal-amostra, como mostrado na Figura 3.6. Nessa condição, ocorre *reflexão interna total* dentro do cristal: o feixe é totalmente refletido, sem atravessar diretamente a amostra [61, 65].

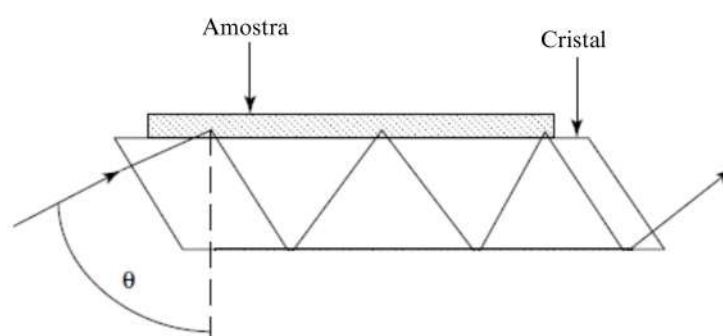


Figura 3.6: Esquema do acessório de Reflexão Total Atenuada (ATR).
Fonte: Adaptado de Skoog *et al.* (2017) [61].

Contudo, durante a reflexão, parte do campo eletromagnético penetra a amostra levemente, além da superfície do cristal — o chamado *campo evanescente*, cuja intensidade decai exponencialmente no interior da amostra. Essa penetração típica varia entre 0,5 e 5 μm , dependendo da frequência da radiação, do ângulo de incidência e dos índices de refração do cristal e da amostra [59].

Apesar de superficial, essa penetração é suficiente para que a radiação evanescente seja parcialmente absorvida pelos grupos funcionais presentes na região de contato da amostra, atenuando o feixe refletido. Após uma ou várias reflexões internas (dependendo do design do cristal do ATR), o feixe emerge do cristal e segue para o detector. O espectro resultante é semelhante ao obtido no modo de transmissão, mas reflete majoritariamente as propriedades da interface entre o cristal e a amostra.

Para que haja absorção efetiva, é crucial que exista bom contato entre a amostra e a face do cristal, já que a profundidade de penetração da onda evanescente é muito pequena — a presença de uma camada de ar inviabilizaria a interação. Por isso, em medições de amostras sólidas, aplica-se pressão sobre o material para assegurar um contato adequado com o cristal [61]. No caso de líquidos ou pastas, o simples depósito da amostra sobre o cristal costuma ser suficiente para garantir o acoplamento.

O modo ATR apresenta diversas vantagens práticas em relação à transmissão convencional. Em primeiro lugar, requer preparo mínimo da amostra: sólidos pulverizados, líquidos viscosos ou pastas podem ser aplicados diretamente sobre o cristal, eliminando etapas demoradas de preparo [67]. Além disso, permite a análise de amostras espessas ou altamente absorventes sem a necessidade de diluição. Outros benefícios incluem a facilidade de limpeza: cristais, especialmente os de diamante, são resistentes a solventes e abrasões leves, podendo ser reutilizados inúmeras vezes.

Capítulo 4

Método Quimiométrico

Este capítulo apresenta uma revisão dos fundamentos da quimiometria, abordando seu desenvolvimento histórico e sua relevância como ferramenta matemática e estatística aplicada à química. São discutidas as principais etapas de organização e pré-tratamento de dados, fundamentais para garantir a qualidade das análises. Por fim, é explorada a Análise de Componentes Principais (PCA), com ênfase em sua formulação matemática e na aplicação da Decomposição em Valores Singulares (SVD) como método de cálculo.

4.1 Introdução

A quimiometria pode ser definida como disciplina da química que se dedica à aplicação de métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para analisar dados químicos e extrair destes a máxima informação relevante [72, 73, 74]. Em outras palavras, é a área interdisciplinar que faz a ponte entre a química analítica, estatística multivariada, modelagem matemática e ciência da computação, visando tratar quantitativamente os dados obtidos em medições químicas. Seu objetivo central é otimizar a aquisição, o tratamento e a análise de dados, possibilitando uma compreensão mais profunda e objetiva dos sistemas estudados.

No contexto da química analítica, o papel da quimiometria é fundamentalmente otimizar e interpretar os dados gerados por métodos instrumentais modernos. Isso inclui uma variedade de tarefas que os químicos enfrentam, como a seleção de métodos de análise

mais adequados, a calibração de instrumentos para quantificação, a determinação de relações entre estrutura molecular e atividade e o reconhecimento de padrões em conjuntos de *dados multivariados* [73, 74]. Ao utilizar técnicas estatísticas avançadas, a quimiometria permite melhorar a qualidade das informações extraídas sem a necessidade de melhorias no aparato experimental, ou seja, os dados existentes são explorados de forma mais eficaz [75]. De fato, a quimiometria utiliza ferramentas estatísticas para planejar, analisar e interpretar dados, ajudando o analista a determinar a técnica mais apropriada para uma dada aplicação ou até aprimorar os resultados de técnicas analíticas sem investimentos adicionais em novos equipamentos. Em resumo, a quimiometria atua como uma caixa de ferramentas científicas que engloba métodos de estatística multivariada, otimização e inteligência computacional aplicados a problemas químicos, ampliando significativamente a capacidade de compreensão e decisão a partir de resultados experimentais.

O termo “quimiometria” (do inglês, *chemometrics*) foi introduzido em 1971–1972 pelo químico orgânico Svante Wold, que cunhou o neologismo com o intuito de denominar essa nova área de pesquisa [73, 74]. Em 1974, durante uma visita de Wold à Universidade de Washington, juntamente com o professor Bruce R. Kowalski – pioneiro americano no uso de computação e estatística em química – fundaram a International Chemometrics Society (ICS), marcando a criação oficial de uma comunidade científica dedicada à quimiometria [72, 74]. Nesse período inicial, os esforços se concentravam em mostrar como técnicas de reconhecimento de padrões e análise multivariada poderiam revolucionar a interpretação de dados químicos. Por exemplo, Kowalski relatou já em meados dos anos 1970 que os químicos estavam gerando “mais informações químicas do que sabiam gerenciar” com os métodos tradicionais, o que motivou o desenvolvimento de programas de computador e algoritmos para extrair padrões escondidos em grandes conjuntos de dados experimentais [76].

A consolidação da quimiometria ocorreu ao longo dos anos 1980, impulsionada pelo avanço dos computadores pessoais e pelo interesse crescente da comunidade analítica. Antes disso, técnicas quimiométricas estavam “dispersas na literatura” e careciam de um fórum unificado. Isso mudou com a criação de periódicos científicos dedicados exclusiva-

mente à área: em 1986 foi lançado o periódico *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* (Elsevier) e, em 1987, Kowalski tornou-se o editor fundador do *Journal of Chemometrics* (Wiley), proporcionando plataformas específicas para divulgação de inovações e aplicações quimiométricas [74].

Vale salientar que a quimiometria, embora tenha se originado e se consolidado no contexto da química analítica, não se restringe exclusivamente a essa área. Trata-se de uma disciplina interdisciplinar que encontra aplicações em diversos campos científicos, como física, biologia, farmacologia, ciências ambientais e engenharias. Técnicas quimiométricas são amplamente empregadas na análise de dados espectroscópicos e cromatográficos obtidos por métodos como espectroscopia no infravermelho, Raman, RMN e cromatografia líquida ou gasosa, permitindo a extração de informações relevantes em contextos tão distintos quanto o controle de qualidade de materiais, a caracterização de compostos físicos ou a análise de biomarcadores em sistemas biológicos.

4.2 Organização e pré-tratamento de dados

Antes de compreendermos as etapas envolvidas no pré-tratamento de dados espectroscópicos, é fundamental entender como esses dados são originalmente adquiridos e organizados. Em experimentos com técnicas como espectroscopia FTIR em modo ATR ou espectroscopia Raman, os espectros gerados são digitalizados por sistemas computacionais acoplados aos instrumentos. Esses sistemas registram as informações espectrais em forma de estruturas numéricas (por exemplo, tabelas). Os valores de intensidade – como transmitância, absorbância ou intensidade de espalhamento – são alocados no eixo das ordenadas (Y), enquanto as variáveis espectrais, normalmente expressas em número de onda (cm^{-1}), deslocamento Raman ou comprimento de onda (nm), são organizadas no eixo das abscissas (X). Dessa forma, os dados espectrais também podem ser visualizados na forma matricial, organizados em linhas e colunas, constituindo uma matriz $\mathbf{X}$, onde cada linha I corresponde a uma amostra (ou objeto) e cada coluna J se refere às variáveis (por exemplo, um número de onda). A Matriz $\mathbf{X}$ pode ser representada em três formas diferentes.

$$\mathbf{X} = \begin{bmatrix} \mathbf{x}_1^T \\ \mathbf{x}_2^T \\ \vdots \\ \mathbf{x}_I^T \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1J} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2J} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{I1} & x_{I2} & \cdots & x_{IJ} \end{bmatrix} = [\mathbf{x}_1 \quad \mathbf{x}_2 \quad \cdots \quad \mathbf{x}_J]. \quad (4.2)$$

Na primeira forma, temos uma matriz em que cada linha representa um vetor linha transposto, ou seja, o espectro da i -ésima amostra. Cada vetor contém J valores, que correspondem às intensidades registradas nos diferentes pontos espectrais,

$$\mathbf{x}_i^T = \begin{bmatrix} x_{i1} & x_{i2} & \cdots & x_{iJ} \end{bmatrix}. \quad (4.3)$$

A Equação (4.3) mostra como podemos escrever o vetor transposto $\mathbf{x}_i^T$, que representa o espectro completo da i -ésima amostra. Esse vetor pode ser associado a um ponto no espaço de dimensão J ($x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{iJ}$), cada um correspondente a uma resposta do equipamento em diferentes pontos espectrais. Na segunda matriz, sendo uma matriz de dimensão $(I \times J)$, contém todos os dados das i -ésimas amostras correspondentes às j -ésimas respostas da matriz de dados. E na terceira forma, a matriz é organizada por colunas de variáveis, representadas pelos vetores coluna $\mathbf{x}_j$, que reúnem as intensidades de uma mesma variável para todas as amostras, que também podem ser associadas a um vetor no espaço de I dimensão, dados por,

$$\mathbf{x}_j = \begin{bmatrix} x_{1j} \\ x_{2j} \\ \vdots \\ \vdots \\ x_{Ij} \end{bmatrix}. \quad (4.4)$$

É importante frisar que, embora os dados sejam originalmente adquiridos como vetores coluna (com as intensidades organizadas verticalmente), para montar a matriz $\mathbf{X}$ de forma tradicional — com as amostras nas linhas — é necessário realizar a transposição desses vetores. Por isso utilizamos $\mathbf{x}_i^T$, que é a versão transposta do vetor espectral da i -ésima

amostra. Essa organização matricial dos dados constitui um passo fundamental para a compreensão de como os métodos quimiométricos operam. Uma vez compreendida e definida a estrutura dos dados, partimos para a etapa de pré-tratamento, que antecede a aplicação das técnicas quimiométricas propriamente ditas. Vale ressaltar que o pré-tratamento é aplicado quando necessário, o que, na maioria dos casos, se verifica, pois representa uma forma eficaz de reduzir variações indesejadas que podem surgir durante a aquisição dos dados. Tais variações, caso não sejam tratadas adequadamente, podem influenciar de maneira significativa os resultados finais. Todavia, o pré-tratamento de dados deve ser conduzido com cuidado e critério. É imprescindível realizar uma análise prévia para selecionar o tratamento mais apropriado, de modo a não comprometer a qualidade e a confiabilidade da análise subsequente. De acordo com Ferreira [74], o pré-tratamento de dados pode ser dividido em duas partes: (i) quando aplicados às linhas da matriz $\mathbf{X}$, ou seja, aos dados de cada amostra, esse tratamento é conhecido como transformação; e (ii) quando aplicados às colunas da matriz $\mathbf{X}$, correspondendo ao que se denomina pré-processamento.

As técnicas de transformação, aplicadas às linhas da matriz de dados $\mathbf{X}$, têm por objetivo atenuar variações indesejadas associadas aos objetos (amostras) que não foram removidas durante a obtenção dos dados, bem como realçar informações relevantes. Entre os métodos mais utilizados destacam-se o alisamento, que reduz componentes de alta frequência associadas ao ruído experimental; a correção de linha de base, empregada para eliminar variações sistemáticas e desvios lentos que afetam a linha de base dos dados; o cálculo de derivadas, que permite evidenciar mudanças locais e suprimir tendências globais, sendo particularmente útil em casos de deslocamento ou inclinação da linha de base; e a normalização, que busca compensar diferenças de magnitude global entre os espectros ou amostras, favorecendo a comparação adequada dos dados [74].

As técnicas de pré-processamento, por sua vez, têm como objetivo preparar as variáveis (colunas da matriz $\mathbf{X}$) para a aplicação de métodos multivariados, assegurando que cada variável contribua de maneira equilibrada à análise. As técnicas mais frequentes incluem a centragem na média, que translada cada variável para ter média zero, preservando

integralmente a estrutura relativa dos dados; e o escalonamento, que iguala a variância das variáveis, proporcionando pesos comparáveis na análise.

Embora a literatura apresente um conjunto amplo de técnicas para ambas as classes, a escolha adequada deve considerar as características específicas dos dados e os objetivos da análise. Tanto as transformações quanto o pré-processamento devem ser aplicados de forma criteriosa, com base no conhecimento do sistema em estudo e nas exigências metodológicas da abordagem quimiométrica empregada [74].

4.3 Análise de Componentes Principais - PCA

A Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é uma técnica estatística multivariada amplamente empregada em quimiometria para análise exploratória de dados complexos. Trata-se de um método não supervisionado de reconhecimento de padrões que transforma um conjunto inicial de variáveis altamente correlacionadas em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, chamadas componentes principais. A técnica foi originalmente introduzida por Karl Pearson em 1901 [77], sendo posteriormente formalizada e desenvolvida de maneira mais rigorosa por Harold Hotelling em 1933 [78]. O objetivo principal da PCA é reduzir a dimensionalidade (compressão) dos dados mantendo o máximo de informação original, isto é, comprimir os dados com mínima perda informativa [72, 74].

A PCA permite construir um novo sistema de coordenadas formado pelas Componentes Principais (PCs), também denominadas variáveis latentes. Essas componentes são ortogonais entre si e cada uma explica uma parcela da variância total do conjunto de dados, de forma que as primeiras poucas componentes concentram os principais padrões de variação presentes. Dessa maneira, a PCA possibilita a identificação de tendências, grupos naturais de amostras (*clusters*) e comportamentos atípicos (*outliers*) de forma visual e intuitiva, por meio de gráficos de dispersão, sem exigir conhecimento prévio sobre as classes ou os rótulos das amostras [72, 74].

Para ilustrar o conceito empregado, consideremos um conjunto de espectros com $I = 5$, obtidos a partir de amostras de mel puro e de mel adulterado com diferentes concentrações

de solução de água e açúcar comercial, na região espectral de 1300 a 930 cm^{-1} . Nessa faixa, cada espectro contém $J = 193$ respostas de intensidade espectral, correspondentes a diferentes números de onda. Dessa forma, a estrutura dos dados pode ser representada por uma matriz $\mathbf{X}$ de dimensão 5×193 , em que as linhas correspondem às diferentes amostras analisadas e as colunas, às variáveis espectrais. A Figura 4.1 apresenta a representação gráfica dos espectros utilizados.

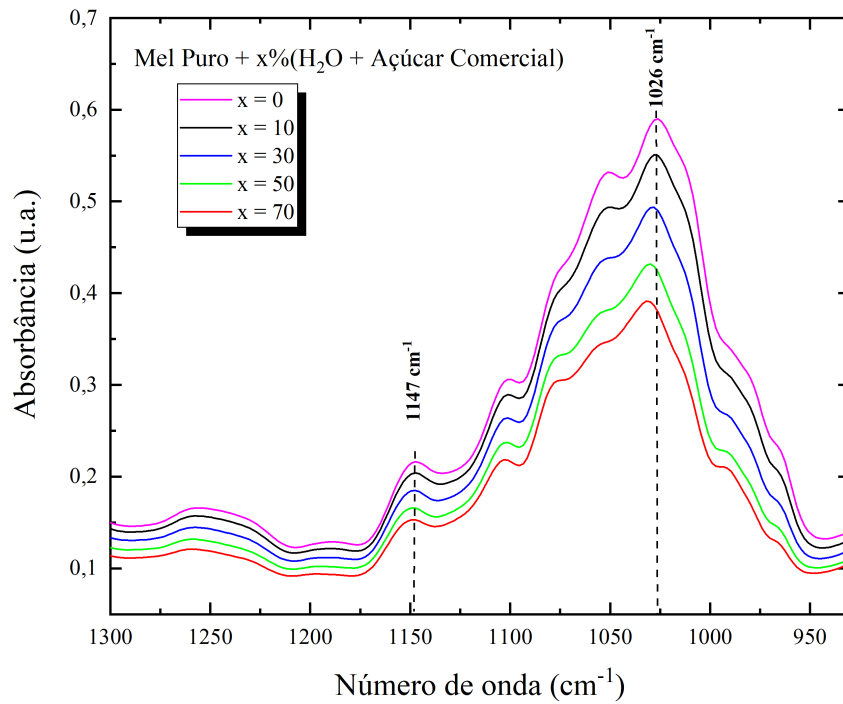


Figura 4.1: Espectros de absorção no infravermelho para amostras de mel puro e mel adulterado com diferentes concentrações ($x\%$) de solução de água e açúcar comercial, na região espectral de 1300 a 930 cm^{-1} .

Fonte: Elaborado pela autora.

Suponhamos agora que se tenham considerado apenas as intensidades dos dois picos destacados na Figura 4.1, situados em 1147 e 1026 cm^{-1} . Com isso, a matriz $\mathbf{X}$, anteriormente de dimensão 5×193 , passa a ter dimensão 5×2 , e a análise torna-se bivariada, como ilustrado na Figura 4.2.

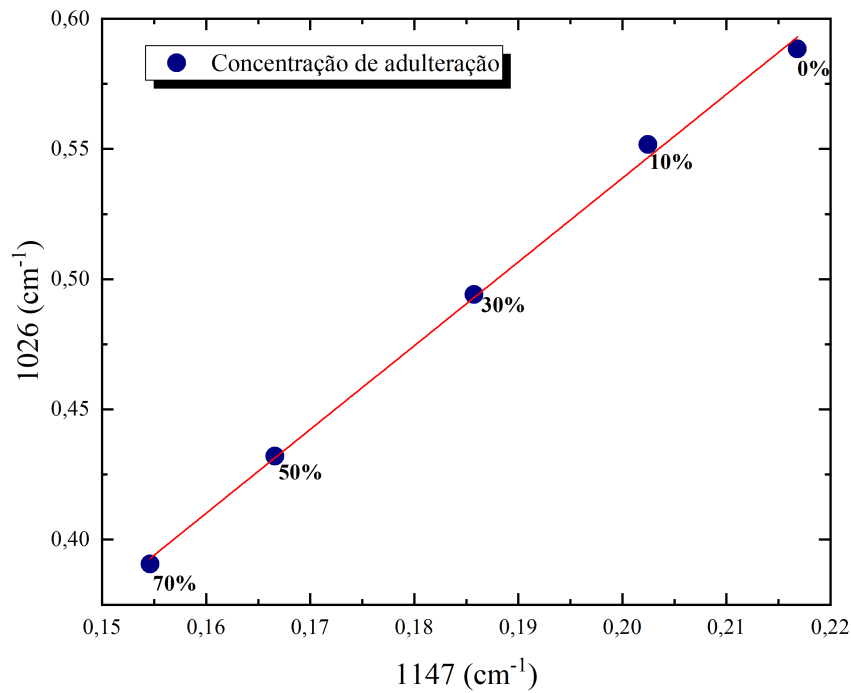


Figura 4.2: Gráfico das intensidades registradas em 1147 cm^{-1} e 1026 cm^{-1} .
Fonte: Elaborado pela autora.

Conforme se observa na Figura 4.2, quando consideramos apenas as intensidades correspondentes a esses dois números de onda, as amostras se distribuem praticamente ao longo de uma linha reta, evidenciando um comportamento linear. Isso indica que as intensidades nos dois picos estão fortemente correlacionadas. O coeficiente de correlação de Pearson, que quantifica o grau de associação linear entre duas variáveis x e y , é neste caso igual a $r = 0,999$. O coeficiente r é calculado pela relação [72, 74],

$$r = \frac{\sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^I (y_i - \bar{y})^2}}. \quad (4.5)$$

Vale ressaltar que, neste caso, x e y correspondem às intensidades dos picos em 1147 e 1026 cm^{-1} , respectivamente. Podemos, portanto, concluir que, embora a análise tenha considerado duas variáveis, ambas são governadas por um mesmo fator latente — a concentração de adulterante nas amostras de mel. Isso revela que a dimensionalidade intrínseca dos dados é reduzida e que a variação observada pode ser essencialmente explicada por um único fator subjacente. Assim, ao trabalhar com matrizes $J \gg I$, é comum que variáveis espectrais apresentem correlações elevadas, o que possibilita a identificação

de um subconjunto reduzido de variáveis capaz de preservar a maior parte da informação relevante contida nos dados originais.

As PCs possuem como uma de suas propriedades fundamentais o fato de serem não correlacionadas e ortogonais entre si. Em outras palavras, a informação contida em uma componente não está presente em nenhuma das demais. Outra propriedade essencial é que as PCs são construídas para descrever a maior variância possível dos dados originais. A primeira componente principal, denominada PC1, explica a maior parcela da variância total do conjunto de dados. A segunda componente principal, denominada PC2, explica a segunda maior parcela de variância, sendo ortogonal à PC1. As demais componentes seguem o mesmo princípio: cada uma explica uma parcela decrescente da variância, mantendo sempre a ortogonalidade em relação às componentes anteriores. A seguir, iremos definir a PCA na forma matemática.

4.3.1 Fundamentos Matemáticos

A análise de componentes principais (PCA) pode ser definida matematicamente como decomposição da matriz $\mathbf{X}$, de dimensão $(I \times J)$, conforme apresentada na Equação (4.6), em duas matrizes, uma de *scores* $\mathbf{T}$ e uma matriz ortonormal de *pesos* $\mathbf{L}$, de modo que,

$$\mathbf{X} = \mathbf{TL}^T. \quad (4.6)$$

A Equação (4.6) mostra que a matriz de dados original $\mathbf{X}$ pode ser reescrita como o produto entre os *scores* e os *loadings* transpostos. Tal reescrita oferece uma nova forma de visualizar os dados, na qual as direções de maior variabilidade são extraídas e utilizadas como nova base para a representação dos objetos.

Neste contexto:

- A matriz $\mathbf{T}$ contém os *scores*, que representam as amostras no novo sistema de eixos principais. Cada linha de $\mathbf{T}$ corresponde a uma amostra projetada nesse novo espaço, e cada coluna representa uma componente principal (PC);
- A matriz $\mathbf{L}$ é a matriz de *loadings* ou pesos. Cada coluna define uma nova direção

(componente principal), construída como combinação linear das variáveis originais.

Por definição, $\mathbf{L}$ é ortonormal, o que implica que:

$$\mathbf{L}^T \mathbf{L} = \mathbf{I}, \quad (4.7)$$

em que $\mathbf{I}$ é a matriz identidade de ordem $J \times J$.

Os escores expressam como as amostras se organizam nesse novo sistema de coordenadas. Já os pesos indicam a importância relativa de cada variável original na formação de cada componente principal, sendo essas direções escolhidas para maximizar a variância explicada em cada etapa.

Essa decomposição pode ser entendida como uma mudança de base: os dados são representados em um novo sistema ortogonal em que as variáveis originais são transformadas em componentes principais não correlacionados.

A matriz de escores pode ser definida por,

$$\mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{R}, \quad (4.8)$$

em que $\mathbf{R}$ é a matriz transformação. Ou seja, trata-se de uma mudança algébrica do espaço original para o espaço das componentes principais. Considerando a Equação (4.6), e o fato de que $\mathbf{L}$ é ortonormal, podemos reescrever a Equação (4.9) da seguinte forma,

$$\mathbf{T} = \mathbf{X}\mathbf{L}. \quad (4.9)$$

Em muitos casos práticos, não é necessário utilizar todas as J componentes principais. Quando há correlação entre as variáveis, é comum que apenas A componentes (com $A < J$) sejam suficientes para explicar a maior parte da variância dos dados. Assim, a decomposição geral assume a forma,

$$\mathbf{X} = \hat{\mathbf{X}} + \mathbf{E}, \quad (4.10)$$

em que $\hat{\mathbf{X}}$ representa a parte sistemática da matriz original, reconstruída a partir dos A

primeiros componentes principais, e $\mathbf{E}$ é a matriz de resíduos ou erros, de dimensão $I \times J$, contendo a parte da variabilidade não explicada pelo modelo.

A reconstrução de $\hat{\mathbf{X}}$ pode ser expressa da seguinte forma,

$$\hat{\mathbf{X}} = \mathbf{T}_A \mathbf{L}_A^T. \quad (4.11)$$

com,

$$\mathbf{T}_A = [\mathbf{t}_1 \ \mathbf{t}_2 \ \dots \ \mathbf{t}_A], \quad \mathbf{L}_A = [\mathbf{l}_1 \ \mathbf{l}_2 \ \dots \ \mathbf{l}_A]. \quad (4.12)$$

Substituindo essas expressões na Equação (4.11), a reconstrução da matriz de dados pode ser representada como uma soma dos produtos externos entre os vetores de escores e seus respectivos vetores de pesos. Assim, a matriz $\hat{\mathbf{X}}$ é dada por,

$$\hat{\mathbf{X}} = \mathbf{t}_1 \mathbf{l}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{l}_2^T + \dots + \mathbf{t}_A \mathbf{l}_A^T. \quad (4.13)$$

Com isso, a decomposição completa da matriz $\mathbf{X}$ assume a forma expandida,

$$\mathbf{X} = \mathbf{t}_1 \mathbf{l}_1^T + \mathbf{t}_2 \mathbf{l}_2^T + \dots + \mathbf{t}_A \mathbf{l}_A^T + \mathbf{E}. \quad (4.14)$$

em que,

$$\hat{\mathbf{X}} = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a \mathbf{l}_a^T = \mathbf{T}_A \mathbf{L}_A^T. \quad (4.15)$$

Cada termo $\mathbf{t}_a \mathbf{l}_a^T$ representa a contribuição da a -ésima componente principal na reconstrução da estrutura sistemática dos dados. O termo residual $\mathbf{E}$ compreende as variações não explicadas, frequentemente atribuídas ao ruído experimental ou a flutuações aleatórias. Essas contribuições são geralmente desconsideradas em análises exploratórias focadas nas principais tendências estruturais dos dados.

Há diferentes formas de calcular as matrizes de escores e de pesos a partir da matriz de dados $\mathbf{X}$. Entre os métodos mais utilizados estão: a Decomposição em Valores Singulares (SVD, do inglês *Singular Value Decomposition*), a diagonalização da matriz de covariância

ou correlação, e o algoritmo NIPALS (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*), este último particularmente útil quando há um grande número de variáveis ou dados ausentes. Neste trabalho, adota-se a SVD como abordagem padrão. Por essa razão, será o único método de cálculo definido matematicamente a seguir [74].

4.3.2 Decomposição por Valores Singulares – SVD

A decomposição por valores singulares (Singular Value Decomposition, SVD) é um dos métodos fundamentais da álgebra linear, amplamente aplicada à análise exploratória e modelagem quimiométrica de dados multivariados. Seja $\mathbf{X} \in \mathbb{R}^{I \times J}$ a matriz de dados, previamente centrada na média de cada coluna, de modo a garantir que todas as variáveis possuam média nula, conforme recomendado na literatura [60, 74]. Este procedimento de centragem é essencial para evitar que a média interfira na decomposição e na interpretação dos padrões de variabilidade e assegurar que a variância explicada por cada componente principal corresponda efetivamente à variância total residual das variáveis originais.

A centragem pode ser formalmente expressa como,

$$\tilde{\mathbf{X}} = \mathbf{X} - \mathbf{1}\bar{\mathbf{x}}^T, \quad (4.15)$$

em que $\bar{\mathbf{x}}$ é o vetor coluna com as médias de cada variável, e $\mathbf{1}$ é um vetor coluna de dimensão I com todas as entradas iguais a 1. A decomposição SVD é então aplicada sobre $\tilde{\mathbf{X}}$.

A decomposição SVD permite expressar a matriz centrada como o produto de três matrizes:

$$\tilde{\mathbf{X}} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T. \quad (4.16)$$

Nesta expressão:

- $\mathbf{U} \in \mathbb{R}^{I \times I}$ é uma matriz ortonormal quadrada cujas colunas são os autovetores da matriz simétrica $\tilde{\mathbf{X}}\tilde{\mathbf{X}}^T$;
- $\mathbf{V} \in \mathbb{R}^{J \times J}$ é uma matriz ortonormal quadrada cujas colunas são os autovetores de

$$\tilde{\mathbf{X}}^T \tilde{\mathbf{X}};$$

- $\mathbf{S} \in \mathbb{R}^{I \times J}$ é uma matriz diagonal retangular, contendo os valores singulares $s_1 \geq s_2 \geq \dots \geq s_K \geq 0$.

As propriedades de ortonormalidade podem ser expressas por,

$$\mathbf{U}^T \mathbf{U} = \mathbf{I}_I, \quad \mathbf{V}^T \mathbf{V} = \mathbf{I}_J, \quad (4.17)$$

em que $\mathbf{I}_I$ e $\mathbf{I}_J$ são matrizes identidade de ordem I e J , respectivamente.

Os valores singulares presentes na diagonal de $\mathbf{S}$ estão dispostos em ordem decrescente e correspondem às raízes quadradas dos autovalores das matrizes de correlação ou covariância dos dados [74]. Ao multiplicar ambos os lados por $\tilde{\mathbf{X}}^T$ e considerando as propriedades de ortonormalidade, obtém-se,

$$\tilde{\mathbf{X}}^T \tilde{\mathbf{X}} = \mathbf{V} \mathbf{S}^T \mathbf{S} \mathbf{V}^T, \quad (4.18)$$

bem como,

$$\tilde{\mathbf{X}} \tilde{\mathbf{X}}^T = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{S}^T \mathbf{U}^T. \quad (4.19)$$

Nessas expressões, a matriz $\mathbf{S}^T \mathbf{S}$ é diagonal e contém os quadrados dos valores singulares, s_k^2 . Assim, as colunas de $\mathbf{V}$ constituem os autovetores de $\tilde{\mathbf{X}}^T \tilde{\mathbf{X}}$, e as colunas de $\mathbf{U}$ são os autovetores de $\tilde{\mathbf{X}} \tilde{\mathbf{X}}^T$, associados aos mesmos K autovalores não nulos. Essa correspondência garante que a decomposição seja única, salvo pelo sinal de cada vetor [74].

O número de valores singulares não nulos K corresponde ao posto da matriz $\tilde{\mathbf{X}}$, obedecendo à relação,

$$K \leq \min(I, J).$$

Conforme descrito na literatura [74], quando $I > J$, a matriz $\mathbf{S}$ apresenta uma submatriz diagonal de dimensão $J \times J$ e linhas inferiores nulas. Se $I < J$, a submatriz diagonal relevante é $I \times I$, com colunas adicionais compostas por zeros. No caso em que $I = J$, $\mathbf{S}$ é quadrada.

Outro aspecto importante é que essa decomposição pode ser aplicada a qualquer matriz

real, independentemente de sua forma ou tamanho, desde que os dados sejam adequadamente centrados na média [60].

Na prática quimiométrica, a SVD constitui a base da Análise de Componentes Principais (PCA). Quando os dados encontram-se centrados, a decomposição fornece diretamente:

- Os loadings: $\mathbf{L} = \mathbf{V}$, que representam os pesos das variáveis originais nas novas componentes ortogonais;
- Os escores: $\mathbf{T} = \mathbf{US}$, que são as projeções das observações nos novos eixos principais.

Dessa forma, a matriz original pode ser reescrita como:

$$\tilde{\mathbf{X}} = \mathbf{TL}^T = \mathbf{USV}^T. \quad (4.20)$$

A ortogonalidade dos loadings e escores assegura que cada componente principal seja independente das demais, simplificando a interpretação e a visualização dos padrões latentes. Assim, torna-se possível reduzir a dimensionalidade do problema, retendo apenas os A maiores valores singulares, responsáveis por explicar a maior parte da variância total dos dados com mínima perda de informação [74].

Capítulo 5

Procedimentos Experimentais

Este capítulo descreve os procedimentos experimentais adotados neste estudo para a caracterização e análise de amostras de mel puro e adulterado. Inicialmente, são apresentados os métodos de preparo e armazenamento das amostras, incluindo as estratégias utilizadas para simular diferentes níveis de adulteração com açúcares. Em seguida, detalham-se os procedimentos de aquisição espectroscópica, contemplando as técnicas de espectroscopia fotoacústica (PAS), espectroscopia Raman e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier em modo ATR (FTIR-ATR).

5.1 Preparação de Amostras

As amostras de mel puro utilizadas neste estudo foram produzidas por colônias da abelha *Apis mellifera scutellata*, coletadas na Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencente à Universidade Estadual de Maringá (FEI/UEM), localizada no município de Maringá, estado do Paraná (23° 25' S, 51° 57' O), durante o ano de 2024. Uma das amostras foi destinada exclusivamente à preparação das amostras adulteradas utilizadas nos experimentos.

Com o objetivo de simular diferentes cenários de adulteração, foram preparadas soluções aquosas de quatro tipos de açúcares em pó, utilizados como adulterantes: açúcar comercial de uso alimentar (açúcar refinado adquirido em supermercado), sacarose, frutose e glicose (cada uma em pó; pureza $\geq 99\%$). A Figura 5.1 apresenta os açúcares

padrão utilizados, sendo (a) frutose, (b) sacarose e (c) glicose.

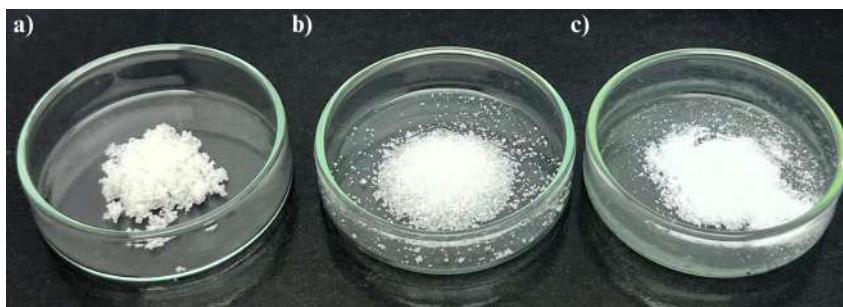


Figura 5.1: Amostras dos açúcares padrão utilizados nos experimentos, todos com grau de pureza de 99%: a) frutose, b) sacarose e c) glicose.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para cada tipo de açúcar, foram preparadas três soluções em concentrações de 15%, 30% e 45% m/m (sendo % m/m a concentração em termos percentuais de massa por massa). As soluções foram preparadas individualmente, utilizando água destilada, com massa total de 100 g: a massa correspondente ao percentual de açúcar desejado foi dissolvida em água destilada até completar 100 g de solução.

Com as soluções preparadas, procedeu-se à adulteração da amostra de mel puro selecionada. Para cada tipo de solução e para cada açúcar, foram realizadas adulterações em três níveis: 10%, 20% e 30% m/m, expressos como a proporção mássica da solução adicionada em relação à massa total da mistura final (mel + solução). As adições foram realizadas por pesagem direta em balança analítica, com subsequente homogeneização manual das misturas. O procedimento foi repetido para cada solução de cada adulterante, resultando em um conjunto completo de amostras adulteradas.

Para melhor organização dos dados experimentais e clareza na apresentação dos resultados, as amostras foram sistematicamente classificadas em quatro grupos experimentais, conforme a concentração mássica da solução adulterante utilizada no preparo: Grupo 1 (mel puro – controle), Grupo 2 (soluções a 15%), Grupo 3 (soluções a 30%) e Grupo 4 (soluções a 45%). Essa estrutura de agrupamento será adotada ao longo dos capítulos seguintes, servindo como base para a apresentação, análise e discussão dos resultados espectroscópicos e quimiométricos. As Tabelas a seguir apresentam a descrição detalhada de cada amostra analisada neste estudo, incluindo o tipo de adulterante e as proporções

mássicas entre mel e solução.

Tabela 5.1: Composição das amostras do Grupo 1 (controle).

ID	Adulterante	% de Mel	% de Adulteração
P1	–	100	0
P2	–	100	0

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5.2: Composição das amostras do Grupo 2 (solução adulterante a 15%).

ID	Adulterante	% de Mel	% de Adulteração
A1	Açúcar Comercial	90	10
A2	Açúcar Comercial	80	20
A3	Açúcar Comercial	70	30
A4	Sacarose	90	10
A5	Sacarose	80	20
A6	Sacarose	70	30
A7	Frutose	90	10
A8	Frutose	80	20
A9	Frutose	70	30
A10	Glicose	90	10
A11	Glicose	80	20
A12	Glicose	70	30

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5.3: Composição das amostras do Grupo 3 (solução adulterante a 30%).

ID	Adulterante	% de Mel	% de Adulteração
A13	Açúcar Comercial	90	10
A14	Açúcar Comercial	80	20
A15	Açúcar Comercial	70	30
A16	Sacarose	90	10
A17	Sacarose	80	20
A18	Sacarose	70	30
A19	Frutose	90	10
A20	Frutose	80	20
A21	Frutose	70	30
A22	Glicose	90	10
A23	Glicose	80	20
A24	Glicose	70	30

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 5.4: Composição das amostras do Grupo 4 (solução adulterante a 45%).

ID	Adulterante	% de Mel	% de Adulteração
A25	Açúcar Comercial	90	10
A26	Açúcar Comercial	80	20
A27	Açúcar Comercial	70	30
A28	Sacarose	90	10
A29	Sacarose	80	20
A30	Sacarose	70	30
A31	Frutose	90	10
A32	Frutose	80	20
A33	Frutose	70	30
A34	Glicose	90	10
A35	Glicose	80	20
A36	Glicose	70	30

Fonte: Elaborado pela autora.

Após o preparo, todas as amostras, puras e adulteradas, foram acondicionadas individualmente em microtubos de polipropileno com tampa de pressão, adequados para uso laboratorial. Em seguida, os microtubos foram organizados em uma caixa plástica própria para armazenamento, a qual foi inteiramente coberta com papel alumínio, visando proteger as amostras da exposição à luz durante o período de armazenamento. As amostras foram mantidas em um intervalo de temperatura controlada de 20 a 25 °C, em ambiente escuro. Este procedimento visou preservar as características físico-químicas das amostras até o momento das análises espectroscópicas. Ao todo, foram preparadas 36 amostras adulteradas e 2 amostras de mel puro, totalizando 38 amostras analisadas neste estudo.



Figura 5.2: Amostras de mel puras e adulteradas utilizadas na pesquisa experimental, acondicionadas em microtubos devidamente identificados.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Espectroscopia Fotoacústica

As análises de espectroscopia fotoacústica (PAS) foram realizadas em um arranjo experimental configurado com uma lâmpada de arco de xenônio de 1000 W (Newport Corporation) como fonte de radiação, cobrindo a faixa espectral do ultravioleta (UV) ao infravermelho próximo (NIR). Neste trabalho, as medidas foram conduzidas exclusivamente na região do UV-Vis, no intervalo espectral de 230 a 600 nm.

O controle do comprimento de onda da radiação incidente sobre a amostra foi feito com um monocromador CS130B 1/8 m, equipado com duas grades de difração. Foram empregadas duas fendas fixas, com aberturas de 3,56 mm (entrada) e 1,56 mm (saída), resultando em uma resolução espectral de 4,00 nm. Para eliminar harmônicos de segunda e terceira ordens gerados pela grade de difração, um trocador de filtros ópticos (Newport) foi inserido no feixe final.

O feixe de luz, após passar pelos filtros, foi guiado até o interior da célula fotoacústica por meio de um sistema óptico composto por espelhos de alumínio e lentes de quartzo. A célula fotoacústica, construída com janela de quartzo em sua entrada, possui um compartimento porta-amostra e uma saída para o detector de pressão. A detecção foi realizada por um microfone capacitivo da Bruel & Kjaer, com elevada sensibilidade para variações de pressão induzidas pelo efeito fotoacústico.

Durante as medições, a potência da lâmpada foi ajustada para 800 W. O feixe foi modulado a uma frequência fixa de 13 Hz utilizando um chopper mecânico (ThorLabs). O sinal fotoacústico foi amplificado e detectado com um amplificador *Lock-In* modelo DSP 7265 (Signal Recovery), operando com uma constante de tempo de 1 s, sensibilidade de 5,00 mV e com média de 10 leituras por ponto espectral. Todo o sistema, incluindo a varredura espectral e a aquisição dos sinais, foi controlado por meio de um programa desenvolvido especificamente para esse fim. A Figura 5.3 ilustra a montagem experimental.

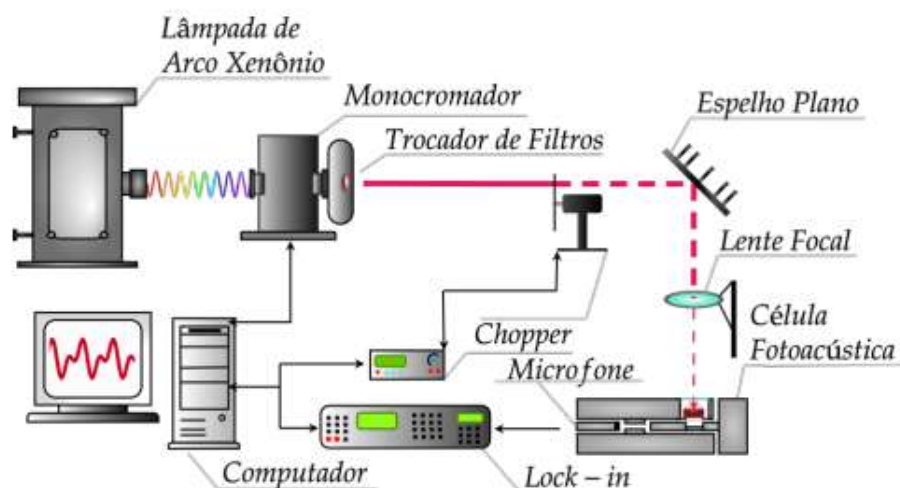


Figura 5.3: Ilustração da montagem experimental da Espectroscopia Fotoacústica.
Fonte: Reproduzido de Greatti (2023) [79].

Como a espectroscopia fotoacústica fornece um sinal relativo, um padrão de normalização foi utilizado. Neste estudo, foi empregado carvão ultrapuro como material de referência, permitindo a correção dos espectros das amostras em função das características espectrais da fonte, da resposta do sistema óptico e da célula.

Antes das medições, as amostras de mel foram submetidas a leve aquecimento em banho-maria, com temperatura controlada, não ultrapassando 50 °C, visando garantir a homogeneização adequada. Em todas as etapas em que as amostras foram aquecidas, os microtubos estavam vedados com filme de vedação Parafilm®, a fim de evitar a evaporação. Para cada amostra, foram depositadas gotas suficientes na célula fotoacústica até que o compartimento porta-amostra estivesse completamente preenchido, de modo a assegurar uniformidade na quantidade de amostra e consistência nas condições de aquisição espectral. Após a preparação e deposição na célula, todas as amostras foram submetidas à medição espectral, conforme descrito.

5.3 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram adquiridos em um microscópio Raman confocal (μ -Raman), da marca Bruker, modelo SENTERRA, pertencente ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa - COMCAP, da Universidade Estadual de Maringá - UEM. O equipamento

possui configuração confocal e permite análise em diferentes profundidades e detalhamento espacial, com três fontes de excitação laser, com comprimento de onda de 532 nm, 633 nm e 785 nm. Neste trabalho, as amostras foram excitadas com laser de comprimento de onda de 785 nm, com potência nominal de 50 mW, utilizando lente objetiva de 20× de amplificação. As medições foram realizadas com 100 varreduras (*coadditions*) e tempo de integração de 5 s por varredura. A região espectral registrada foi de 419 a 1778 cm^{-1} , com resolução espectral de 3 a 5 cm^{-1} .

Antes da aquisição espectral, as amostras foram submetidas a leve aquecimento em banho-maria, com temperatura controlada, não ultrapassando 50 °C, com o objetivo de garantir homogeneização adequada do mel e facilitar a aplicação da amostra. Pequenas quantidades da amostra (1 gota) foram depositadas em suportes metálicos apropriados (“panelinhas”) para análise.

Foram realizadas três medidas independentes por amostra. Para cada medida, a amostra utilizada era descartada, e uma nova gota da mesma amostra era aplicada no suporte, de modo a minimizar eventuais variações de composição entre diferentes regiões da amostra. Este procedimento visou garantir a representatividade e a reprodutibilidade dos espectros obtidos.

5.4 Espectroscopia FTIR modo ATR

As análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier em modo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR) foram realizadas em um espectrômetro Vertex 70v (Bruker), com o acoplamento do acessório de ATR com cristal de diamante. O equipamento também pertence ao COMCAP da UEM.

As medidas foram realizadas com a câmara do equipamento operando em vácuo, de modo a eliminar contribuições atmosféricas indesejadas, como absorções relacionadas ao vapor de água e dióxido de carbono. Para cada análise, uma gota da amostra foi depositada diretamente sobre o cristal do acessório ATR.

Antes da aquisição espectral, as amostras foram submetidas a leve aquecimento em banho-maria, com temperatura controlada, não ultrapassando 50 °C, com o objetivo de

garantir a homogeneização adequada do mel e facilitar a aplicação no cristal.

Os espectros foram adquiridos com 128 varreduras, no intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} . Foram realizadas medidas em triplicata por amostra, com reposição da amostra sobre o cristal a cada nova aquisição, de modo a garantir a representatividade e a reprodutibilidade dos espectros obtidos.

Capítulo 6

Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os principais resultados obtidos nas análises espectroscópicas de amostras de mel puro e adulterado, com foco em métodos não destrutivos, sensíveis e aplicáveis à caracterização de alimentos. Os dados estão organizados conforme as técnicas experimentais utilizadas: espectroscopia fotoacústica (PAS), com ênfase na região do UV-Vis; espectroscopia Raman; e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, na modalidade de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). As interpretações consideram a identificação de bandas características, a comparação entre amostras e a avaliação de possíveis efeitos experimentais. A técnica de FTIR-ATR foi complementada por análises quimiométricas, visando ampliar a capacidade discriminante e identificar padrões associados à adulteração. Por fim, discutem-se as limitações observadas e indicam-se direções para investigações futuras que assegurem maior confiabilidade nos métodos aplicados ao controle de qualidade do mel.

6.1 Espectroscopia Fotoacústica - PAS

A espectroscopia fotoacústica é uma técnica de absorção que se baseia na detecção da pressão gerada pela conversão da energia radiante absorvida em calor. Por sua sensibilidade tanto às propriedades ópticas quanto térmicas dos materiais, a técnica tem sido cada vez mais explorada em diferentes contextos analíticos, incluindo a caracterização de alimentos. Diante da complexidade composicional do mel e da necessidade de métodos

analíticos não destrutivos e com alta sensibilidade, este trabalho propôs investigar o uso da espectroscopia fotoacústica na detecção de adulterações em amostras de mel, na região do UV-Vis. A Figura 6.1 apresenta o espectro obtido para a amostra de mel puro (P1 do grupo 1) da abelha *Apis Mellifera Scutellata*, registrado na faixa de 230 a 600 nm, o qual servirá como referência para a comparação com amostras adulteradas. Para fins de interpretação visual e comparação, todas as curvas espectrais discutidas nesta seção foram submetidas a um procedimento de alisamento com o objetivo de reduzir ruídos sem comprometer as principais estruturas espectrais.

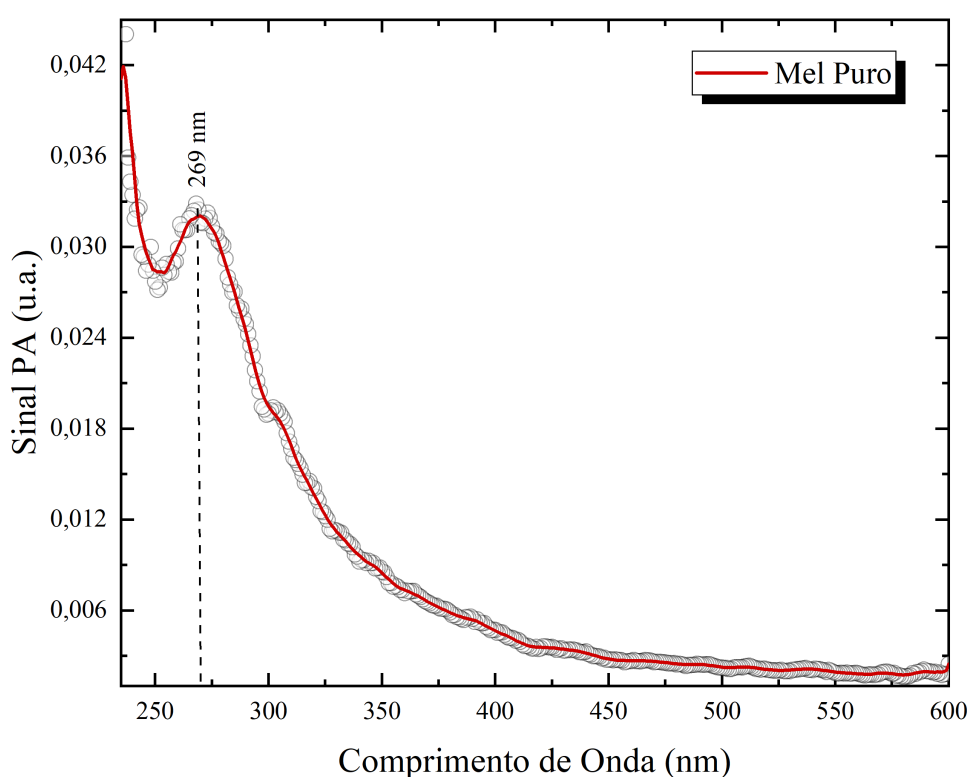


Figura 6.1: Espectro fotoacústico para amostra de mel puro de abelhas (*A. Mellifera Scutellata*). Círculos abertos são dados experimentais e linha vermelha é um guia para os olhos.

A Figura 6.1 apresenta o espectro fotoacústico obtido para a amostra de mel puro. Observa-se um comportamento espectral típico de substâncias que apresentam forte absorção na região do ultravioleta e baixa absorção no visível. Destaca-se uma banda mais intensa em torno de 270 nm, associada à absorção de compostos aromáticos conjugados, como ácidos fenólicos e flavonoides, constituintes naturais do mel [19, 80, 81, 82]. Esses compostos contêm cromóforos aromáticos capazes de sofrer transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, o que resulta em absorções intensas na faixa de 250 a 280 nm [83]. O perfil

observado por espectroscopia fotoacústica, portanto, mostra-se compatível com espectros de absorção registrados por outras técnicas na região do UV-Vis [80, 81].

Além da banda principal, observa-se outra elevação do sinal para comprimentos de onda menores que 250 nm, formando um ombro na curva espectral. Esse comportamento é coerente com registros anteriores de espectros de méis na região do ultravioleta, nos quais é comum a presença de absorções secundárias abaixo de 250 nm. Tal elevação pode estar relacionada à presença de compostos como glicose, frutose e fenóis de menor complexidade estrutural, também encontrados naturalmente no mel [80]. Não foi possível realizar uma análise dessa banda devido às limitações do experimento.

A partir de aproximadamente 290 nm, o sinal apresenta um decaimento contínuo, com redução acentuada da intensidade até cerca de 400 nm. Nessa faixa, podem ocorrer absorções mais fracas atribuídas a aminoácidos aromáticos, como tirosina e triptofano. Acima de 500 nm, o espectro se estabiliza em valores próximos de zero, o que reforça a ausência de cromóforos relevantes na região do visível [19, 80, 81, 82].

Com o intuito de investigar possíveis indícios de fotodegradação ou fotooxidação durante as medições espectroscópicas, foram realizados experimentos comparativos utilizando dois sentidos de varredura espectral: crescente, de 230 nm a 600 nm, e decrescente, de 600 nm a 230 nm. Para este estudo, foram selecionadas uma amostra de mel puro (grupo 1) e três amostras adulteradas com 30% de açúcares (grupo 4). Sempre que diferentes varreduras foram realizadas, as amostras foram substituídas, a fim de evitar efeitos de degradação ou fotooxidação acumulativa no sinal obtido por espectroscopia fotoacústica (PAS). Vale ressaltar que a escolha dessa concentração visou manter um nível padronizado de adulteração, previamente definido na metodologia experimental. A comparação entre os espectros obtidos nas duas direções de varredura permite avaliar se a exposição progressiva à radiação poderia provocar alterações no perfil espectral, como indícios de fotodegradação ou reações de fotooxidação, especialmente nas regiões de maior absorção no ultravioleta. Os resultados dessas medições estão apresentados na Figura 6.2, que reúne os espectros obtidos nas duas condições para as diferentes amostras analisadas.

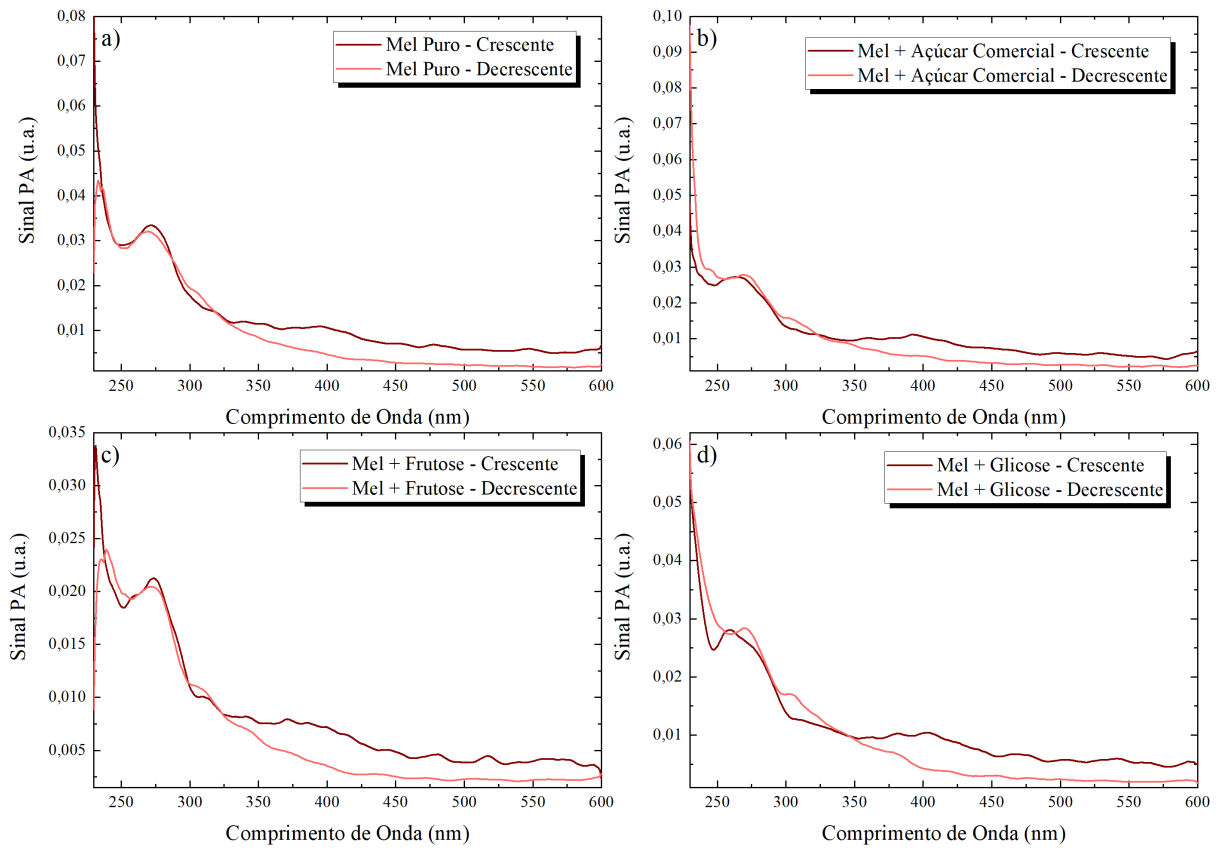


Figura 6.2: Espectros fotoacústicos obtidos para (a) mel puro, (b) mel + açúcar comercial, (c) mel + frutose, e (d) mel + glicose, todos com 30% de solução adulterante a 45%. Cada amostra foi medida em duas condições: varredura espectral crescente (230 a 600 nm) e decrescente (600 a 230 nm).

Durante a análise comparativa entre as varreduras espectrais realizadas nas direções crescente (230–600 nm) e decrescente (600–230 nm), foram observadas diferenças relevantes nos espectros obtidos. Cada amostra apresentou uma ligeira variação na análise quando foi comparada entre si. Mas, de uma maneira geral, todas as amostras apresentaram as mesmas diferenças relevantes nos espectros. Conforme mostrado na Figura 6.2, os espectros apresentaram variações entre as duas condições de medida, sugerindo instabilidade frente à exposição luminosa durante a aquisição. Quando a medida é iniciada no UV, há mudanças sutis na banda principal em torno de 270 nm. Sendo que, para todas as amostras, essa banda torna-se ligeiramente mais estreita, com um perfil mais agudo. Além disso, observa-se o surgimento de uma discreta alteração em torno de 400 nm, perceptível apenas na varredura crescente. Essa estrutura, que pode ser descrita como um ombro espectral, sugere uma possível modificação do comportamento óptico-térmico da

amostra ao longo do processo de medição. Como mencionado, esse ombro na região de 400 nm varia pouco de acordo com o adulterante, mas não há um centro de banda bem definido para que se possa fazer uma comparação entre os adulterantes. Por fim, no restante do espectro feito com comprimento de onda crescente, entre 450 a 600 nm, houve um aumento do sinal fotoacústico, que pode ser um aumento da absorção do material ou um aumento da pressão interna na célula fotoacústica.

Embora a análise acima aponte para padrões compatíveis com processos de fotodegradação ou variações térmicas durante a aquisição espectral, não foi realizada uma investigação específica sobre os mecanismos responsáveis por essas alterações. O fato de que os espectros diferem sistematicamente conforme a ordem da varredura compromete a confiabilidade total dos dados obtidos. A natureza e a extensão das interações entre a radiação ultravioleta e os constituintes das amostras adulteradas ainda não são plenamente compreendidas, o que levanta dúvidas quanto à reprodutibilidade dos resultados em outras concentrações ou com diferentes adulterantes.

No entanto, uma constatação importante pôde ser extraída: as bandas observadas abaixo de 350 nm, especialmente em torno de 270 nm, são reais e recorrentes em todas as amostras analisadas, independentemente da direção da varredura. Diante das instabilidades observadas, considerou-se que a abordagem mais confiável para este conjunto de amostras é iniciar a medição a partir do visível e seguir para o ultravioleta (varredura decrescente). Como os fenômenos observados não foram completamente esclarecidos, optou-se por não estender a análise para diferentes concentrações de adulteração neste trabalho. Ainda há questões fundamentais a serem respondidas para que os dados adquiridos sob diferentes condições possam ser interpretados com segurança e reprodutibilidade. Esse comportamento observado e suas possíveis implicações espectroscópicas e químicas serão objeto de investigações futuras, fora do escopo da presente dissertação.

6.2 Espectroscopia Raman

A Figura 6.3 apresenta os espectros Raman obtidos para duas amostras distintas de mel puro (P1 e P2), sendo possível observar, após correção de linha de base e aplicação de

suavização de ruído, um perfil espectral bem definido e característico de carboidratos. A análise das bandas vibracionais foi realizada com base em diversos estudos na literatura que abordam a espectroscopia Raman aplicada à caracterização do mel [84, 85, 86, 87, 88].

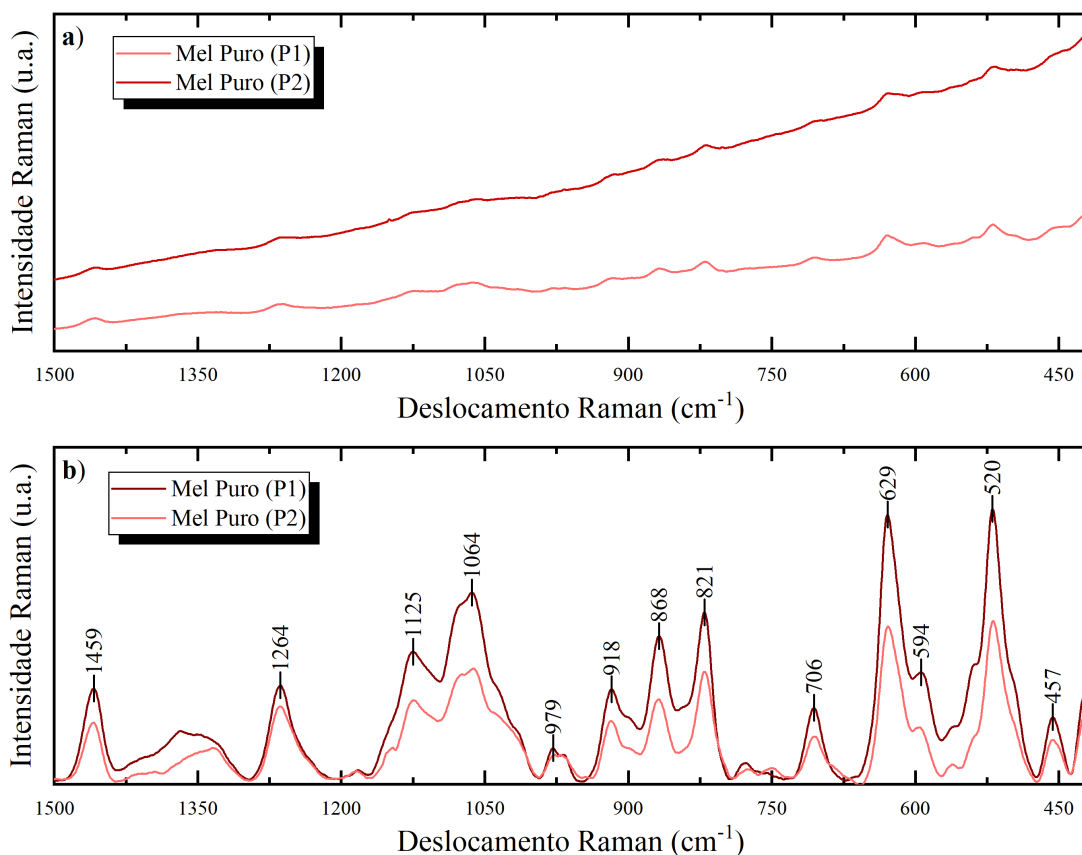


Figura 6.3: Espectros Raman das amostras de mel puro (P1 e P2). (a) Espectros brutos, sem aplicação de qualquer pré-processamento; (b) Espectros após correção de linha de base e aplicação de suavização de ruído (*smooth*). Os principais picos foram anotados com seus respectivos deslocamentos Raman (cm⁻¹).

A banda centrada em aproximadamente 1064 cm^{-1} é amplamente atribuída aos modos de estiramento C–O e C–C de frutose e glicose, sendo reconhecida como a principal assinatura espectral desses açúcares [85, 86, 89, 90]. A banda centrada em 1125 cm^{-1} é recorrente nos espectros Raman do mel e reflete vibrações estruturais comuns aos carboidratos, como ligações C–O e C–O–H. Estudos recentes apontam essa banda como característica da glicose [91], ou como vibração esquelética genérica dos açúcares, sem especificidade para um único monossacarídeo [92]. Enquanto a banda centrada em 1264 cm^{-1} é atribuída a modos de deformação angular do grupo CH_2 e deformação de C–O–H [85, 92].

Essa atribuição é amplamente corroborada na literatura, sendo relacionada a vibrações do tipo *scissoring*, *twisting* ou *wagging* do grupo metileno em carboidratos.

A banda observada em torno de 1459 cm^{-1} é atribuída a modos de deformação angular dos grupos C–H, incluindo $\delta(\text{CH})$, $\delta(\text{CH}_2)$ e $\delta(\text{C–O–H})$, presentes na estrutura da frutose. Essa região também é característica da glicose, sendo associada a deformações de ligações C–H típicas desses monossacarídeos [85, 86, 92], enquanto a banda centrada em 979 cm^{-1} é amplamente reconhecida como característica das vibrações esqueléticas dos carboidratos, sendo atribuída principalmente a modos de estiramento e deformação envolvendo as ligações C–C, C–O, C–C–O e, em alguns casos, C–C–C presentes nas moléculas de açúcares [92]. As bandas em 918 e 868 cm^{-1} , por sua vez, correspondem a vibrações de anel e deformações C–O–H e C–H em estruturas furanósicas [88, 92]. A banda observada em 821 cm^{-1} também é característica de vibrações fora do plano de C–H e (CH_2) , indicativas da presença de carboidratos estruturados [85, 88, 93].

Na região abaixo de 800 cm^{-1} , destacam-se as bandas em 706 , 629 , 594 , 520 e 457 cm^{-1} . Algumas dessas bandas são menos intensas, mas igualmente importantes do ponto de vista diagnóstico. A banda em 706 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da ligação de C–O e às vibrações de flexão O–C–O, enquanto a de 629 cm^{-1} é atribuída a deformações de anel em frutose [88, 93]. As bandas em 594 e 520 cm^{-1} refletem modos de deformação esquelética C–C e C–C–O, e a banda em 457 cm^{-1} é atribuída a modos de deformação coletiva envolvendo o esqueleto molecular e as distorções dos anéis de hexose, como $\delta(\text{CCC})$, $\delta(\text{CCO})$ e deformações do tipo *ring deformation*, típicas de açúcares cíclicos presentes no mel [88, 92, 94].

Observa-se uma coerência dos perfis obtidos para as duas amostras de mel puro, com todas as bandas principais bem definidas e compatíveis com as atribuídas na literatura. Além disso, os resultados obtidos corroboram a predominância de açúcares redutores na matriz do mel, com espectros dominados por modos vibracionais típicos da frutose e da glicose.

A Figura 6.4 apresenta os espectros Raman normalizados de amostras de mel puro e adulteradas na região de 1500 a 430 cm^{-1} . No caso, aqui são apresentadas as amostras

de mel adulterado com 30% de solução, sendo as soluções com 30% de açúcares.

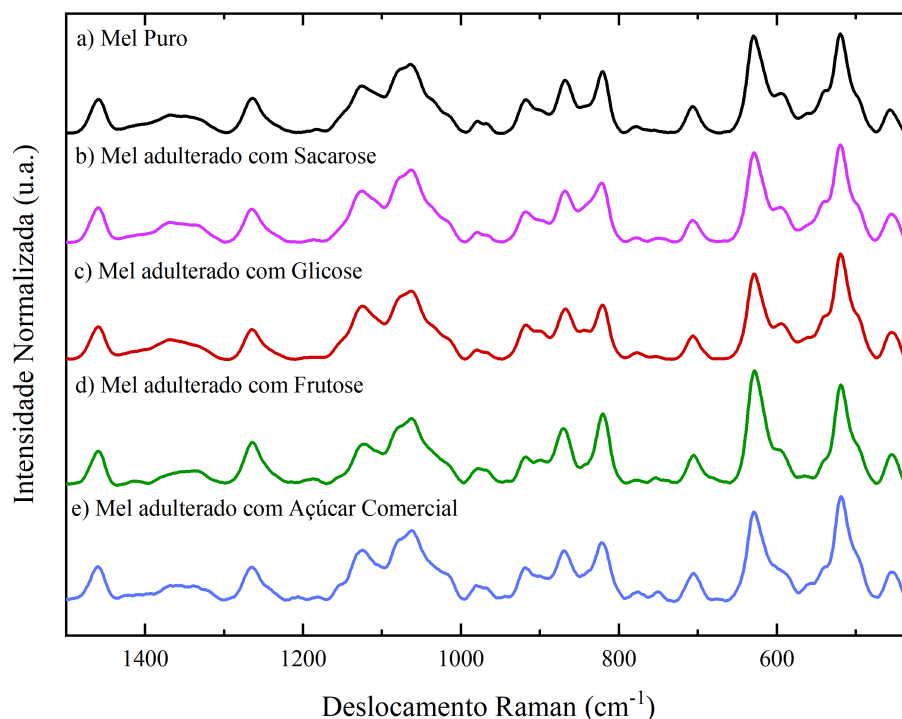


Figura 6.4: Espectros Raman normalizados de amostras de mel puro e mel adulterado com diferentes açúcares. Os espectros correspondem a: (a) mel puro, (b) mel adulterado com sacarose, (c) mel adulterado com glicose, (d) mel adulterado com frutose e (e) mel adulterado com açúcar comercial.

A análise dos espectros Raman das amostras de mel puro e adulterado revela um comportamento espectral bastante semelhante entre os grupos, independentemente do tipo de açúcar utilizado na adulteração. Esse resultado era esperado, uma vez que a matriz do mel é majoritariamente composta por carboidratos, principalmente monossacarídeos como frutose e glicose. A adulteração, por sua vez, foi realizada com soluções açucaradas que adicionam mais compostos da mesma natureza química. Assim, as bandas vibracionais observadas permanecem essencialmente associadas aos modos típicos desses açúcares, como estiramentos C–C, C–O e deformações CH, comuns em todos os espectros analisados.

Adicionalmente, não se pode atribuir diferenças significativas entre os espectros com base apenas em variações de intensidade, pois a espectroscopia Raman, especialmente em modo micro-Raman, é altamente sensível a fatores instrumentais e de amostragem, como: dimensão focal do laser, topografia da superfície, alinhamento óptico, concentração local

e condições de aquisição. Portanto, a intensidade absoluta dos picos não constitui um parâmetro confiável para distinção entre amostras nesse contexto.

Dada essa limitação, a análise direta dos espectros mostra-se insuficiente para discriminar amostras puras das adulteradas, especialmente quando a adulteração é sutil ou simulada de forma realista. Por essa razão, torna-se necessária a aplicação de métodos estatísticos multivariados, como a Análise de Componentes Principais (PCA), que permite investigar padrões latentes e relações entre múltiplas variáveis espectrais simultaneamente. Esses métodos são particularmente úteis quando se busca evidenciar variações sistemáticas não perceptíveis a olho nu, auxiliando na triagem e caracterização de amostras com diferentes níveis ou tipos de adulteração.

6.2.1 PCA aplicada aos espectros Raman

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi aplicada aos espectros Raman das amostras de mel puro e adulterado com diferentes tipos de açúcares, com o objetivo de investigar a presença de padrões latentes capazes de diferenciar os grupos de amostras. A análise foi realizada na faixa espectral de 430 a 1500 cm^{-1} , correspondente às principais bandas vibracionais dos carboidratos presentes no mel. Todos os espectros foram previamente normalizados pela norma (normalização vetor), suavizados por meio de um filtro de alisamento e centrados na média, a fim de reduzir ruídos e eliminar variações não estruturais sem comprometer a integridade dos sinais espectrais. A PCA foi implementada utilizando a linguagem de programação *Python*, amplamente empregada em análises estatísticas multivariadas e processamento de dados espectroscópicos. Os *score plots* resultantes das combinações $\text{PC1} \times \text{PC2}$ e $\text{PC1} \times \text{PC3}$ são apresentados nas Figuras 6.5.a e b, respectivamente.

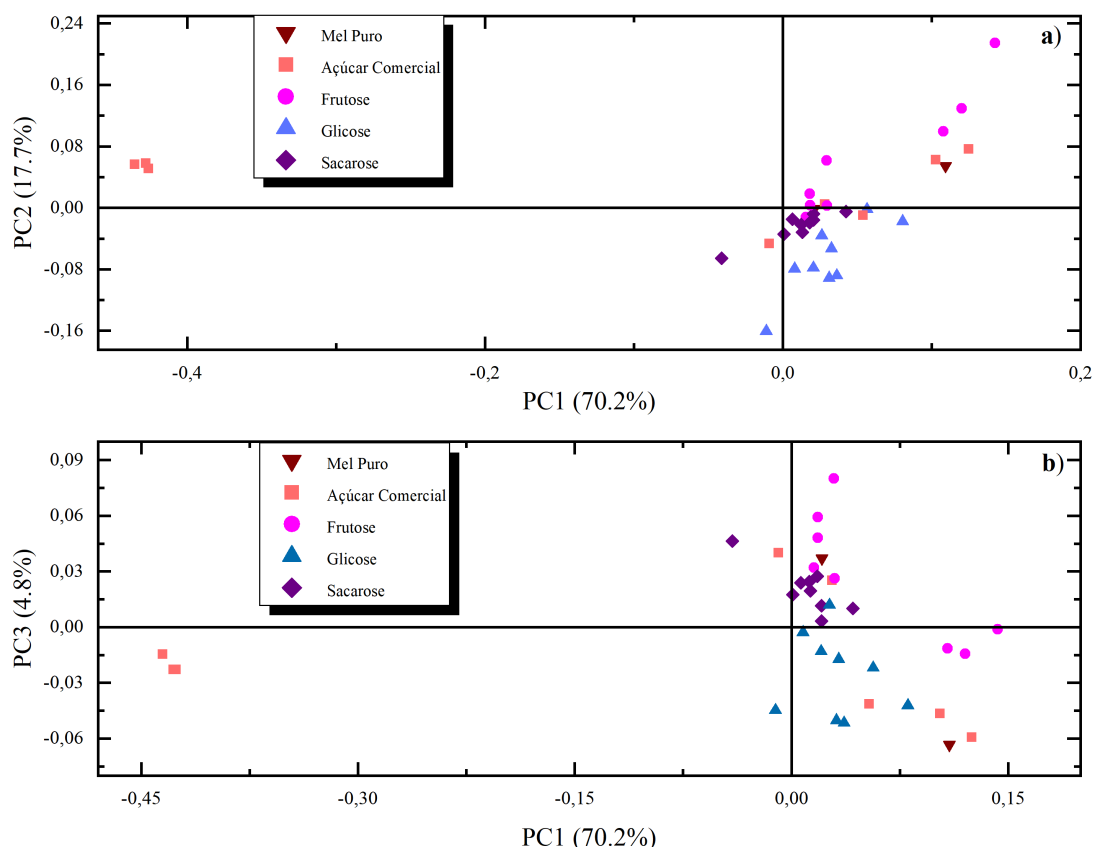


Figura 6.5: *Score plots* da PCA aplicados aos espectros Raman das amostras de mel puro e adulterado com diferentes tipos de açúcares. (a) Projeção das amostras nos componentes principais PC1 e PC2. (b) Projeção nos componentes PC1 e PC3.

O *score plot* da Figura 6.5.a mostra a projeção das amostras nas duas primeiras componentes principais, que juntas explicam aproximadamente 87,9% da variância total dos dados ($PC1 = 70,2\%$, $PC2 = 17,7\%$). Já o *score plot* da Figura 6.5.b apresenta a projeção nos componentes PC1 e PC3, os quais somam 75,0% da variância explicada ($PC3 = 4,8\%$).

Em ambas as projeções, observa-se uma distribuição bastante sobreposta das amostras de mel puro com aquelas adulteradas, independentemente do tipo de açúcar adicionado (sacarose, glicose, frutose ou açúcar comercial). As amostras de mel puro não formam um agrupamento isolado, mas aparecem dispersas entre amostras adulteradas. Tal comportamento sugere que os principais eixos de variância capturados pela PCA não estão diretamente associados ao fator de adulteração.

Entre os grupos adulterados, a frutose apresenta maior dispersão ao longo do eixo PC2, indicando uma leve tendência à diferenciação, embora sem formação de um agrupa-

mento claramente definido. No gráfico $PC1 \times PC3$, há uma redistribuição de parte das amostras, mas a sobreposição entre os grupos persiste, particularmente entre o mel puro e as amostras adulteradas com glicose, sacarose e açúcar comercial.

Diversas estratégias foram testadas na tentativa de melhorar a discriminação entre os grupos, incluindo a restrição da análise a diferentes faixas espectrais. A região de 430 a 1500 cm^{-1} foi escolhida como a mais informativa, por concentrar as bandas vibracionais mais características dos carboidratos. Ainda assim, outras regiões também foram avaliadas e descartadas por não contribuírem com variância significativa ou por introduzirem ruído. Além disso, foram testadas transformações matemáticas clássicas em pré-processamento, como a aplicação da 1ª e 2ª derivadas de Savitzky–Golay, mas tais abordagens tampouco resultaram em separações satisfatórias.

Este resultado pode ser compreendido a partir de diferentes fatores inter-relacionados:

- **Composição química semelhante entre amostras:** a matriz do mel é naturalmente rica em carboidratos, especialmente os monossacarídeos frutose e glicose. Os adulterantes utilizados são esses mesmos açúcares ou derivados (como a sacarose), apenas em maior concentração. Assim, os espectros Raman de amostras puras e adulteradas são dominados pelas mesmas bandas vibracionais, principalmente estiramientos C–C, C–O e deformações C–H, o que dificulta a diferenciação espectral;
- **Diluição do efeito da adulteração na variância global:** como a PCA é uma técnica não supervisionada, as direções de máxima variância não consideram as classes das amostras. Se a adulteração não introduz variações suficientemente distintas no perfil espectral, ou se essas variações forem sutis em relação à variabilidade natural das amostras, a PCA tende a organizar os dados segundo outras fontes de variação (ruído, variação instrumental, topografia da amostra etc.);
- **Sutileza e realismo da adulteração simulada:** as amostras adulteradas foram preparadas com o objetivo de simular cenários reais de fraude, com adição de soluções diluídas de açúcares em concentrações moderadas. Isso faz com que o impacto espectral da adulteração seja leve, reforçando componentes já presentes no mel e não

introduzindo novas assinaturas vibracionais características que possam ser captadas pelas componentes principais;

- **Variação espectral interna entre réplicas:** pequenas variações na topografia da amostra, alinhamento do laser, foco ou concentração local de sólidos podem interferir na intensidade dos espectros Raman em microescala. Esses fatores, mesmo com o uso de pré-processamentos (como normalização e alisamento suave), ainda contribuem para uma dispersão que se sobrepõe ao efeito da adulteração, tornando a separação mais difícil.

Diante desses fatores, conclui-se que a PCA, embora útil como ferramenta exploratória para avaliação da consistência e da estrutura geral dos dados espectrais, não se mostrou eficaz para fins discriminatórios neste conjunto de espectros Raman de amostras de mel adulterado. Nem o ajuste da faixa espectral nem a aplicação de pré-processamentos avançados foram suficientes para promover a separação clara entre os grupos.

É importante destacar, no entanto, que esse resultado negativo não invalida o uso da PCA em espectroscopia como um todo. Pelo contrário, este caso específico reforça a necessidade de considerar a natureza físico-química da amostra e as limitações da técnica espectral utilizada. A PCA pode ser inadequada para esse conjunto de dados Raman específico, mas poderá apresentar melhor desempenho com espectros obtidos por outras técnicas espectroscópicas — como FTIR, o qual será analisada na seção seguinte. Ainda, a eficácia da PCA pode variar dependendo da origem das amostras, do grau de adulteração e da complexidade da matriz. Portanto, não se deve generalizar a inadequação do método a todos os estudos de adulteração em mel, mas sim reconhecê-la como uma limitação contextualizada a este caso experimental.

6.3 Espectroscopia FTIR em modo ATR

Nesta seção, são apresentados e discutidos os resultados obtidos por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, utilizando o acessório de reflexão total atenuada (FTIR-ATR).

A Figura 6.6 apresenta espectros de FTIR-ATR obtidos para as amostras de méis puros da abelha *Apis mellifera scutellata*, registrados na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} . O perfil espectral obtido está de acordo com estudos anteriores sobre a composição do mel por espectroscopia no infravermelho, exibindo bandas de absorção características dos principais grupos funcionais presentes, especialmente associados aos carboidratos, água e pequenas frações de compostos orgânicos funcionais [17, 62, 95, 96, 97, 98].

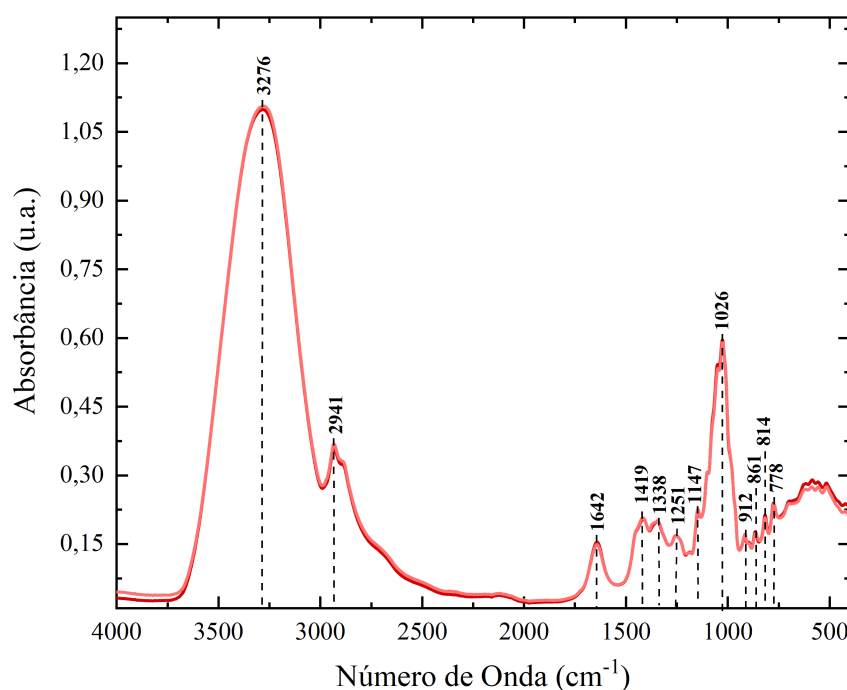


Figura 6.6: Espectros de FTIR-ATR de 02 amostras estudadas de mel de abelha (*A. Mellifera Scutellata*) na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

A banda mais intensa, centrada em 3276 cm^{-1} , corresponde ao estiramento (*stretching*) da ligação O–H, atribuída à presença de água na amostra [17, 95, 97]. A largura desta banda está associada à existência de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, o que é comum em amostras com alto teor de umidade, como o mel [62, 99, 100].

Em 2941 cm^{-1} , observa-se uma banda de intensidade moderada atribuída ao estiramento assimétrico das ligações C–H presentes nos grupos metílicos (–CH₃) e metilênicos (–CH₂–), comuns na estrutura de carboidratos como glicose e frutose. Embora essa região espectral seja menos intensa que a faixa de estiramento O–H, sua presença reforça a contribuição de cadeias alquila saturadas à composição orgânica do mel. Essas vibrações

C–H ocorrem tipicamente entre 2960 e 2850 cm^{-1} , com bandas características em torno de 2962 e 2926 cm^{-1} [17, 62, 96, 97].

A banda em 1642 cm^{-1} é atribuída predominantemente à vibração de flexão angular (modo δ) da molécula de água (H–O–H), e é amplamente reconhecida como um marcador indireto do teor de umidade em matrizes aquosas como o mel [101, 102, 103, 104]. Embora a região próxima possa, em algumas matrizes, apresentar sobreposição com estiramentos C=O de grupos carbonílicos conjugados ou amidas, no caso do mel, as bandas de carbonilas de carboidratos, como frutose e glicose, são observadas geralmente em faixas mais elevadas, próximas de 1740 cm^{-1} [62, 101]. A região espectral compreendida entre 1500 e 800 cm^{-1} é caracterizada por modos vibracionais complexos e intensos associados à estrutura dos carboidratos, incluindo monossacarídeos (glicose e frutose) e dissacarídeos (sacarose), os quais constituem a maior parte da composição química do mel [102, 103]. Especificamente, a faixa entre 1419 e 1338 cm^{-1} apresenta bandas atribuídas às vibrações de deformação angular (δ) das ligações C–H (modo *scissoring*) e às vibrações de flexão das ligações O–H em grupos hidroxila [17, 101, 103]. Essas absorções estão associadas às estruturas funcionais C–C–H e C–OH, características dos açúcares predominantes no mel. Além disso, faixas situadas entre 1340 e 1264 cm^{-1} também são atribuídas a modos de deformação de grupos O–CH e C–C–H, bem como à $\delta(\text{O–H})$ em grupos C–OH [101]. Por fim, os modos de estiramento das ligações C–O são mais pronunciados nas regiões de 1250 a 1000 cm^{-1} , e contribuem significativamente para a caracterização da fração sacarídica do mel [62, 101].

A banda em 1251 cm^{-1} , frequentemente observada nos espectros de mel, é atribuída a vibrações de deformação angular (*bending*) das ligações O–C–H e C–C–H, típicas das cadeias de carboidratos [17, 103]. Embora essa região seja, por vezes, associada ao estiramento de ligações C–O, estudos mais recentes indicam que a principal contribuição nessa faixa provém de modos de flexão envolvendo os esqueletos moleculares dos açúcares.

As bandas localizadas em 1147 e 1026 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento das ligações C–O, com forte influência das vibrações nas ligações C–O–C [101, 103]. Essas regiões são típicas dos monossacarídeos redutores, como a glicose e a frutose, os principais constituintes

tes do mel. A banda em 1026 cm^{-1} , em particular, destaca-se por sua elevada intensidade e definição, sendo amplamente reconhecida como uma das mais representativas da região de “impressão digital” (*fingerprint*) dos carboidratos [101].

Por fim, observa-se um conjunto de bandas entre 912 e 778 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de deformação fora do plano (*wagging* e *twisting*) das ligações C–H, associadas às estruturas dos monossacarídeos. Essa região, conhecida como região anomérica dos carboidratos, apresenta elevada sensibilidade estrutural, sendo particularmente útil em análises quimiométricas voltadas à diferenciação de amostras de mel com base em sua conformação molecular [17, 101, 103].

Após a identificação e atribuição das principais bandas vibracionais presentes no espectro do mel puro, procede-se à comparação com os espectros obtidos para amostras adulteradas. Essa etapa tem como objetivo avaliar as alterações espectrais provocadas pela adição de diferentes adulterantes, em distintas concentrações, e verificar se há mudanças detectáveis nos modos vibracionais característicos. Para garantir a comparabilidade entre os espectros, todos os dados foram previamente submetidos a uma correção sutil da linha de base e normalizados pela norma Euclidiana (l_2). Essa abordagem consiste em ajustar o vetor de intensidades de cada espectro para que sua magnitude total seja igual a 1, preservando as proporções relativas entre as bandas. A normalização pela norma é uma estratégia amplamente empregada em estudos de análise espectral e quimiometria para controle de escala e comparabilidade entre amostras [74]. Com isso, minimiza-se o efeito de variações experimentais, como diferenças na quantidade de amostra ou no contato com o cristal ATR, permitindo uma análise mais confiável das alterações espectrais induzidas pelos adulterantes. Para esta etapa, será utilizado o conjunto de amostras do grupo 4.

A Figura 6.8b apresenta espectros FTIR-ATR das amostras de mel puro e das adulteradas com diferentes tipos de açúcares (açúcar comercial, glicose, frutose e sacarose) revelou variações ao longo de toda a faixa espectral, com maior sensibilidade entre 1700 e 900 cm^{-1} . Na região de 3600 a 3000 cm^{-1} , a banda larga atribuída ao estiramento das ligações O–H apresentou um perfil semelhante entre todas as amostras, indicando que essa região não é eficaz para diferenciar amostras adulteradas. A faixa de 2941 a

2850 cm^{-1} , referente ao estiramento de C–H, mostrou alterações sutis na intensidade, mais perceptíveis com frutose.

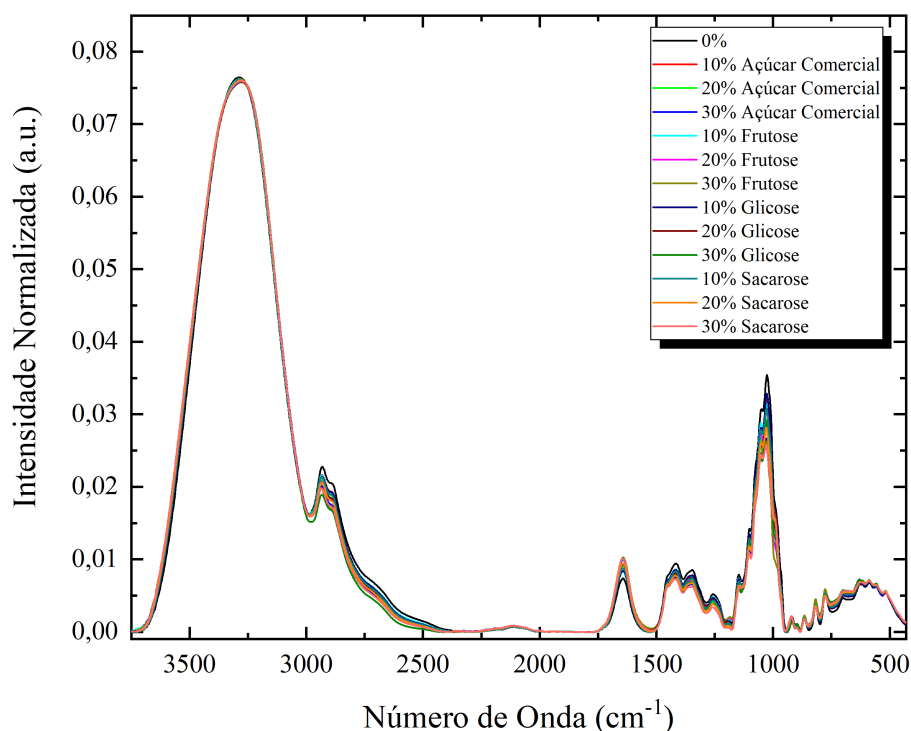


Figura 6.7: Espectros de FTIR-ATR de mel puro e amostras adulteradas na região de 3750 a 430 cm^{-1} .

A banda em 1642 cm^{-1} , normalmente atribuída à vibração angular da água (H–O–H), apresentou um aumento claro de intensidade com o aumento da porcentagem de adulate, podendo indicar maior presença de água livre proveniente das soluções adulterantes. A região de 1500 a 1200 cm^{-1} , associada a modos de deformação de C–H e estiramentos de C–O, mostrou variações discretas, mas consistentes, nas amostras com maior teor de sacarose.

A região entre 1200 e 900 cm^{-1} foi a mais sensível à presença de adulterantes. A banda em 1026 cm^{-1} , atribuída aos estiramentos das ligações C–O e C–O–C dos carboidratos, apresentou redução de intensidade, especialmente nas amostras adulteradas com 30% de solução, acompanhada por alterações nas bandas em 1147 e 1251 cm^{-1} . Essas mudanças indicam modificações na composição sacarídica da matriz. Abaixo de 900 cm^{-1} , observaram-se variações sutis nas vibrações fora do plano das ligações C–H. Apesar dessas diferenças, nenhuma nova banda surgiu, nem houve desaparecimento de picos, mantendo-

se o padrão espectral geral entre as amostras — o que era esperado, considerando que tanto o mel quanto os adulterantes são compostos predominantemente por carboidratos.

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração da solução adulterante sobre os espectros FTIR-ATR, bem como o comportamento espectral de cada tipo de açúcar, foram comparadas amostras de mel adulterado, todas contendo 30% de adulterante (soluções de açúcar comercial, frutose, glicose e sacarose). Esses adulterantes foram preparados a partir de soluções aquosas com 15% (Grupo 2) e 45% (Grupo 4) de concentração de açúcares. Essa abordagem permite isolar a variável “concentração da solução”, mantendo constante a proporção mássica final de adulteração.

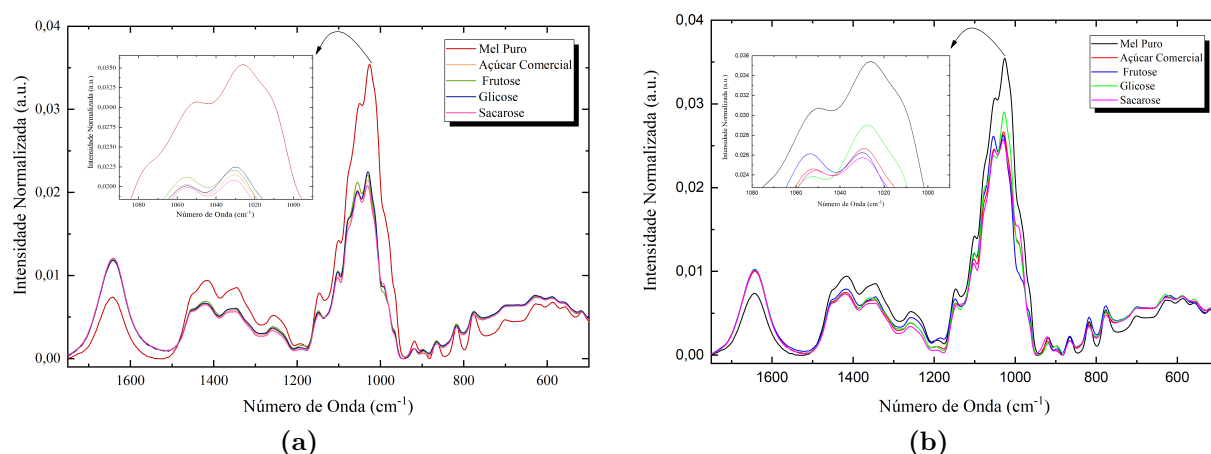


Figura 6.8: Espectros de absorção normalizados de amostras de mel adulterado com 30% de diferentes tipos de carboidratos, obtidos a partir de soluções aquosas com 15% (a) e 45% (b) de açúcar. A faixa espectral considerada vai de 1750 a 500 cm^{-1} .

As Figuras 6.8a e 6.8b apresentam os espectros de absorção normalizada obtidos para as amostras adulteradas com 30% de cada tipo de carboidrato, utilizando soluções aquosas a 15% (a) e 45% (b), na faixa espectral de 1750 a 500 cm^{-1} . A região acima de 3000 cm^{-1} foi excluída desta análise, uma vez que não apresentou variações significativas entre as amostras e não contribuiu de forma relevante para a diferenciação espectral.

Na banda em 1642 cm^{-1} , observa-se maior intensidade para as amostras adulteradas na Figura 6.8a, o que é coerente com a maior proporção de água presente nas soluções com 15% de açúcar. Na região de 1200 a 900 cm^{-1} , nota-se uma redução significativa na intensidade das bandas em relação ao mel puro, especialmente no gráfico 6.8a, onde a solução é menos concentrada em açúcar. Essa diferença também se estende à região

abaixo de 900 cm^{-1} , onde se observam alterações mais evidentes nas amostras do gráfico (a).

Em relação aos tipos de adulterantes, a maioria dos açúcares apresentou comportamento espectral semelhante. No entanto, a frutose demonstrou um padrão distinto na região de 1200 a 900 cm^{-1} . Especificamente, a banda em 1026 cm^{-1} , atribuída aos estiramentos C–O e C–O–C dos carboidratos, exibe um ombro lateral que se torna significativamente mais pronunciado nas amostras adulteradas com frutose, atingindo intensidade próxima ao pico principal. Esse comportamento não foi observado com os demais adulterantes, sugerindo uma contribuição estrutural específica da frutose sobre a matriz espectral do mel adulterado.

A banda centrada em aproximadamente 1642 cm^{-1} , comumente atribuída à vibração angular de flexão da molécula de água (modo ν_2 do H–O–H), tem sido objeto de discussão na literatura quanto à sua origem e especificidade em matrizes complexas como o mel. Em um estudo sobre a autenticação de méis por espectroscopia FTIR-ATR, a região entre 1600 e 1700 cm^{-1} foi atribuída não apenas à água, mas também ao estiramento da carbonila (C=O), supostamente relacionado a carboidratos, além de bandas Amida I associadas a proteínas [103]. Outros estudos reforçam a possível contribuição de proteínas para essa região, especialmente por meio da vibração Amida I em torno de 1650 cm^{-1} [105], bem como de ácidos fenólicos e flavonoides, cujas ligações C=O e C=C conjugadas podem apresentar absorção nessa faixa [100].

Apesar das interpretações alternativas, a literatura especializada reconhece que a absorção entre 1640 e 1650 cm^{-1} é dominada pela presença de água livre ou fracamente ligada. Estudos com filmes de metilcelulose demonstraram que a banda de flexão da água (1640 cm^{-1}) aumenta proporcionalmente com o teor de umidade da amostra (de 2,1% a 20,85%) e se desloca de 1644 para 1649 cm^{-1} , evidenciando diferentes estados de interação da água com a matriz sólida da amostra [106]. Assim, embora contribuições adicionais não possam ser descartadas em sistemas complexos, a atribuição da banda em 1642 cm^{-1} à água permanece a mais sólida e recorrente.

Com base nessas considerações e com o intuito de investigar de forma mais direta

a natureza espectral da banda em 1642 cm^{-1} , foi conduzido um experimento utilizando uma amostra composta por 50% de mel puro e 50% de água destilada. As medições foram realizadas por espectroscopia FTIR-ATR ao longo de 5 horas, com aquisições repetidas em intervalos regulares. O objetivo foi monitorar a evolução da intensidade dessa banda ao longo do tempo, considerando que a amostra, submetida a irradiações sucessivas no cristal ATR, estaria sujeita à evaporação gradual da água. A partir dos resultados obtidos, buscou-se avaliar de forma crítica a influência da água livre nessa região espectral e, com base nisso, fundamentar a decisão sobre a inclusão ou exclusão da banda de 1642 cm^{-1} nas etapas de análise quimiométrica subsequente.

A Figura 6.9 apresenta a evolução espectral da amostra composta por 50% de mel puro e 50% de água destilada ao longo de 5 horas. Como esperado, a banda em torno de 1642 cm^{-1} , associada à vibração angular da água (H–O–H), foi a mais sensível às alterações provocadas pela evaporação. Essa absorção apresentou intensidade máxima nas medições iniciais (0 e 1 hora) e sofreu uma redução acentuada a partir da segunda hora, igualando-se à intensidade observada no mel puro e, posteriormente, tornando-se ainda menos intensa na medição de 5 horas. Esse comportamento reforça que a banda está fortemente relacionada à presença de água livre, e não a açúcares dissolvidos.

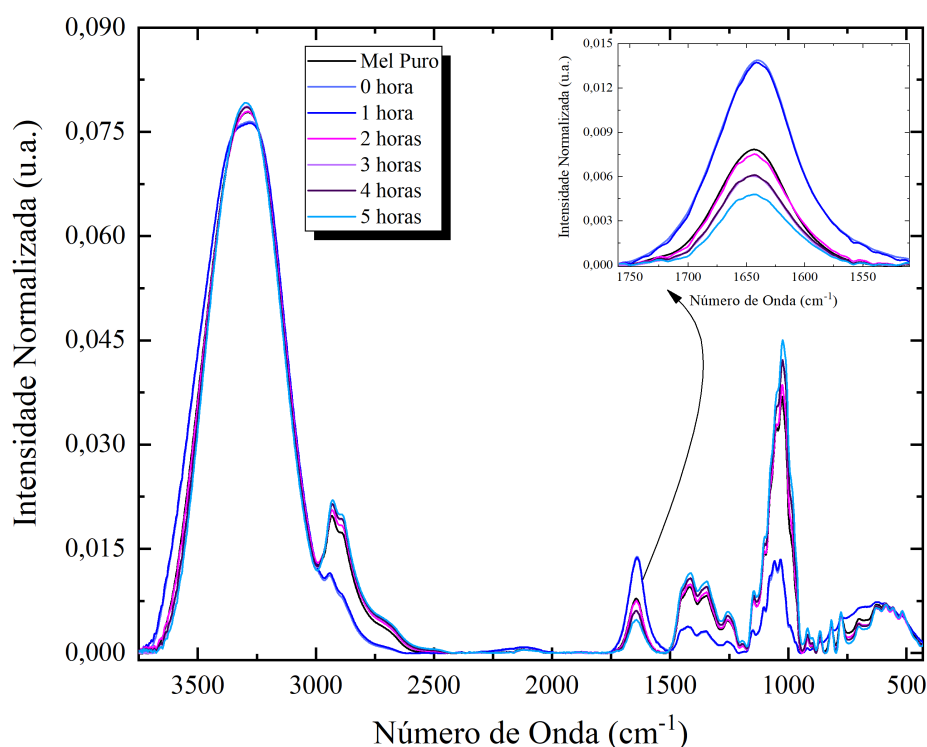


Figura 6.9: Evolução dos espectros FTIR-ATR de uma amostra composta por 50% de mel puro e 50% de água destilada ao longo de 5 horas.

Além disso, outras regiões espectrais também foram afetadas pelo teor hídrico. Na faixa de 1200 a 900 cm^{-1} , onde se localizam os estiramentos C–O e C–O–C dos carboidratos, as bandas estavam enfraquecidas nas primeiras medições e foram intensificando-se progressivamente com a secagem. Destaca-se a banda em 1026 cm^{-1} , típica dos açúcares, que não apenas se recuperou ao longo do tempo, mas atingiu uma intensidade superior à observada no mel puro após 5 horas de irradiação. Tal evidência sugere que a água interfere na resposta espectral desses grupos, possivelmente por mascaramento óptico e redistribuição superficial da amostra no cristal ATR.

Abaixo de 900 cm^{-1} , as vibrações fora do plano de C–H estavam praticamente suprimidas nas primeiras medições e tornaram-se visíveis com o passar das horas, seguindo o padrão de reaparecimento das bandas de carboidratos. Já na faixa de 3000 a 2800 cm^{-1} , associada aos estiramentos C–H alifáticos, observou-se um aumento progressivo da intensidade, coerente com o processo de evaporação da água.

O comportamento espectral global demonstra que o excesso de água afeta não apenas a intensidade da banda em 1642 cm^{-1} , mas também compromete a definição de outras re-

giões críticas para a caracterização dos açúcares. Tais observações reforçam a necessidade de uma avaliação criteriosa sobre a inclusão dessa faixa espectral em análises multivariadas.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a banda em 1642 cm^{-1} está diretamente relacionada ao conteúdo de água livre na amostra, apresentando variações que independem da concentração de carboidratos. Sua intensidade aumentou substancialmente com a adição de água e decaiu com a secagem, tornando-se inferior à do mel puro ao final do experimento. Tais evidências indicam que essa região reflete majoritariamente a umidade da amostra, e não a presença de adulterantes sacarídicos.

Adicionalmente, o experimento demonstrou a estabilidade espectral da técnica de FTIR-ATR frente à exposição prolongada da amostra à radiação infravermelha. Alterações significativas só foram observadas após aproximadamente duas horas de exposição, enquanto as aquisições rotineiras são realizadas em segundos. Isso confirma que, além de não destrutiva, a técnica é espectralmente estável no curto prazo, assegurando a reprodutibilidade dos dados obtidos.

Dessa forma, para evitar a introdução de variabilidade associada exclusivamente ao teor de água, optou-se por excluir a região em torno de 1642 cm^{-1} das análises químio-métricas subsequentes. Essa decisão visa garantir que os modelos estatísticos construídos estejam focados na detecção de adulterações por açúcares e não em flutuações de umidade, que poderiam mascarar ou distorcer os agrupamentos e as interpretações dos dados.

6.3.1 PCA aplicada aos espectros de FTIR-ATR

A PCA foi aplicada aos espectros FTIR-ATR das amostras de mel puro e adulterado, abrangendo todos os grupos experimentais considerados neste estudo. O objetivo da aplicação da PCA é verificar a possibilidade de discriminação entre as amostras com base nas alterações espectrais provocadas pelos diferentes tipos e concentrações de adulterantes, por meio da redução da dimensionalidade dos dados espectrais.

Antes da aplicação da PCA, os espectros foram submetidos a um conjunto de etapas de pré-processamento, visando à padronização e à eliminação de variações não estruturais.

Inicialmente, foi realizada uma correção sutil da linha de base, seguida da normalização dos dados pela norma Euclidiana (l_2), que permite ajustar os vetores espectrais para a mesma magnitude, preservando as proporções relativas entre as bandas. Em seguida, os dados foram centrados na média. Todas as etapas de pré-processamento e a aplicação da PCA foram realizadas utilizando a linguagem de programação *Python*, amplamente utilizada em análises estatísticas multivariadas e visualização de dados espectroscópicos.

A região espectral analisada corresponde ao intervalo de 1500 a 500 cm^{-1} , escolhida por concentrar as bandas vibracionais mais características dos carboidratos presentes no mel e nos adulterantes. Como o grupo de mel puro foi composto por apenas duas amostras distintas, optou-se por incluir duas medições de cada uma dessas amostras no conjunto de dados. Essa decisão visa equilibrar a base amostral e evitar a sub-representação do grupo de referência, sem introduzir replicações artificiais.

Com a matriz de dados espectrais pré-processada, a PCA foi aplicada para explorar a variância entre as amostras e investigar a possibilidade de agrupamentos relacionados ao tipo de adulterante. A seguir, são apresentados os *score plots* e as cargas principais, com suas respectivas interpretações.

A Figura 6.10 apresenta os *score plots* separados por concentração da solução adulate-
rante: (a) 15%, (b) 30% e (c) 45%. Em cada painel, as amostras são distribuídas no plano formado pelas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), que juntas explicam: 98,5% da variância total em (a), 95,8% em (b) e 89,3% em (c). Esses valores indicam que a maior parte da informação contida nos dados espectrais está representada nas duas primeiras componentes em todos os casos.

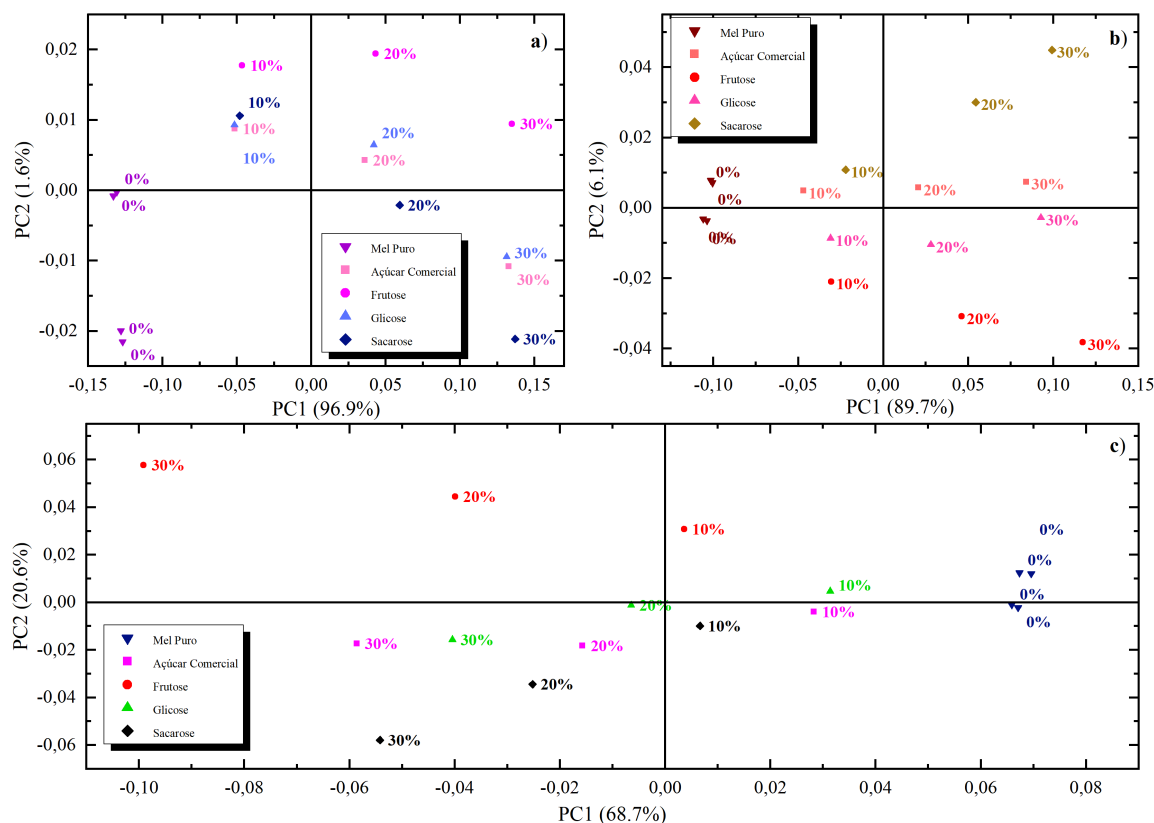


Figura 6.10: *Score plots* obtidos por PCA aplicada aos espectros FTIR-ATR, considerando a faixa espectral de 1500 a 500 cm^{-1} , com exclusão da banda em 1642 cm^{-1} . Os símbolos correspondem às amostras adulteradas com soluções aquosas contendo (a) 15%, (b) 30% e (c) 45% de açúcar.

Na Figura 6.10.a, referente às amostras adulteradas com solução a 15%, observa-se uma separação ainda sutil entre o mel puro e os grupos adulterados. Algumas sobreposições são visíveis, principalmente entre as amostras com 10% de açúcar comercial, glicose e sacarose. A frutose, no entanto, começa a se distanciar tanto do mel puro quanto das demais amostras adulteradas, indicando impacto espectral, mesmo em baixa concentração. A PC1 explica 96,9% da variância, enquanto a PC2 contribui com apenas 1,6%. A baixa representatividade da PC2 limita sua utilidade para uma segunda dimensão de separação, e pode indicar que há pouca variabilidade relevante capturada fora da PC1. Teoricamente, quando a PC2 contribui com um valor tão pequeno, a distribuição entre grupos no eixo vertical deve ser interpretada com cautela, pois pode refletir ruído ou pequenas flutuações não estruturais.

As amostras de mel puro (0%) se encontram fortemente agrupadas à esquerda da PC1, demonstrando alta reprodutibilidade e uniformidade espectral. A frutose apresen-

tou afastamento ao longo da PC1, com separação clara e progressiva à medida que a concentração aumentou de 10% para 30%, evidenciando sua forte influência nas alterações espectrais do mel adulterado. Açúcar comercial e glicose exibiram comportamento semelhante, com separações moderadas e posicionamento próximo entre si. Já a sacarose teve comportamento intermediário: embora próxima de glicose e açúcar comercial nas menores concentrações, seu ponto de 30% aparece mais afastado, sinalizando maior impacto espectral quando mais concentrada.

Comparando os grupos, o uso da solução a 15% permitiu certa diferenciação entre os tipos de adulteração, embora com sobreposição entre algumas amostras. Ainda assim, a clara distinção do mel puro e a boa explicação da variância pela PC1 indicam que o método já é sensível mesmo em concentrações mais diluídas.

Na Figura 6.10.b, correspondente às amostras adulteradas com solução a 30%, observa-se uma separação mais evidente entre os grupos. A PC1 explica 89,7% da variância, e a PC2 contribui com 6,1%, aumentando sua relevância analítica. O mel puro permanece bem agrupado no canto inferior esquerdo, com alta consistência interna, servindo como referência confiável.

A frutose continua sendo o adulterante com maior afastamento, com distribuição linear crescente ao longo da PC1 e variação também na PC2, sugerindo influência em diferentes aspectos espectrais. A glicose mostra comportamento regular, com progressão clara ao longo da PC1. Açúcar comercial exibe separação semelhante, mas com ligeira variação vertical. A sacarose apresenta maior dispersão, especialmente ao longo da PC2, com o ponto de 30% bastante afastado, indicando impacto espectral crescente em altas concentrações.

O *score plot* (b) demonstra uma maior capacidade discriminante do que o *score plot* (a), com separações bem definidas e ausência de sobreposição significativa. O aumento da contribuição da PC2 também reforça a confiabilidade na análise bidimensional, tornando este grupo ideal para a modelagem e interpretação espectral de adulterações sacarídicas.

Na Figura 6.10.c, referente às amostras adulteradas com solução a 45%, observa-se o cenário de separação mais nítido entre os grupos. A PC1 representa 68,7% da variância

e a PC2 contribui com 20,6%, indicando que ambas as componentes trazem informações complementares relevantes para a distinção entre as amostras.

O mel puro aparece agrupado à direita do gráfico, com excelente reprodutibilidade entre as réplicas. As amostras adulteradas se distribuem ao longo de todo o gráfico, com separações bem marcadas.

A frutose novamente apresenta o maior afastamento, concentrando-se na região superior esquerda, com separação clara e consistente ao longo das duas componentes principais. O padrão de distanciamento da frutose mostra forte impacto espectral e estabilidade interna, consolidando-a como o adulterante com maior potencial discriminante.

A sacarose, por sua vez, ocupa a porção inferior esquerda do gráfico, indicando um comportamento espectral bastante distinto, tanto em relação ao mel quanto aos demais açúcares. Essa característica pode estar associada à sua estrutura dissacarídica e à resposta diferencial na matriz do mel.

Glicose e açúcar comercial apresentam um posicionamento mais próximo entre si, mas ainda assim claramente separados do mel puro. As amostras de 30% para ambos os adulterantes se destacam com maior afastamento na PC1, reforçando que a concentração elevada intensifica os efeitos espectrais.

O *score plot* (c) evidencia que, com 45% de açúcar na solução adulterante, o PCA é altamente eficaz na separação dos grupos, sendo possível discriminar não apenas as amostras adulteradas das puras, mas também entre os diferentes tipos de açúcares. O aumento da contribuição da PC2 é um indicativo de que, neste caso, há maior complexidade nas variações espectrais entre os grupos, tornando a análise bidimensional ainda mais robusta e confiável.

Cabe destacar que a mudança na posição relativa do grupo de mel puro entre os *score plots* (a)–(c) é um comportamento esperado em análises exploratórias de PCA. Isso ocorre porque a orientação dos eixos principais (PC1 e PC2) depende diretamente da variância total do conjunto de dados utilizado em cada análise. Como os dados foram separados por grupo experimental (soluções a 15%, 30% e 45%), cada execução da PCA gerou uma nova base de autovetores, recalculada conforme a estrutura de variância local. Além disso,

o sinal dos autovalores e autovetores não é fixo, podendo ser invertido sem prejuízo à interpretação estatística, o que permite que uma mesma amostra apareça à esquerda em uma análise e à direita em outra. O mais importante, portanto, não é a posição absoluta das amostras no gráfico, mas sim a sua consistência interna e o padrão de separação relativo entre os grupos, especialmente entre o mel puro e os adulterados.

Para compreender os padrões de dispersão observados no *score plot* (c) (Figura 6.10.c), é necessário analisar os gráficos dos pesos (*loading plots*), que indicam a contribuição efetiva de cada variável espectral para a formação das componentes principais. Dessa forma, a Figura 6.11 apresenta os pesos correspondentes às componentes PC1 e PC2, permitindo identificar as regiões espectrais que mais influenciaram na separação entre as amostras de mel puro e adulterado observada na PCA. Optou-se por realizar a análise dos *loadings* exclusivamente para o Grupo 4 (amostras com 45% de concentração de açúcar na solução adulterante), uma vez que este grupo apresentou o melhor desempenho nos *score plots*, com clara distinção entre os diferentes tipos de adulteração e o mel puro.

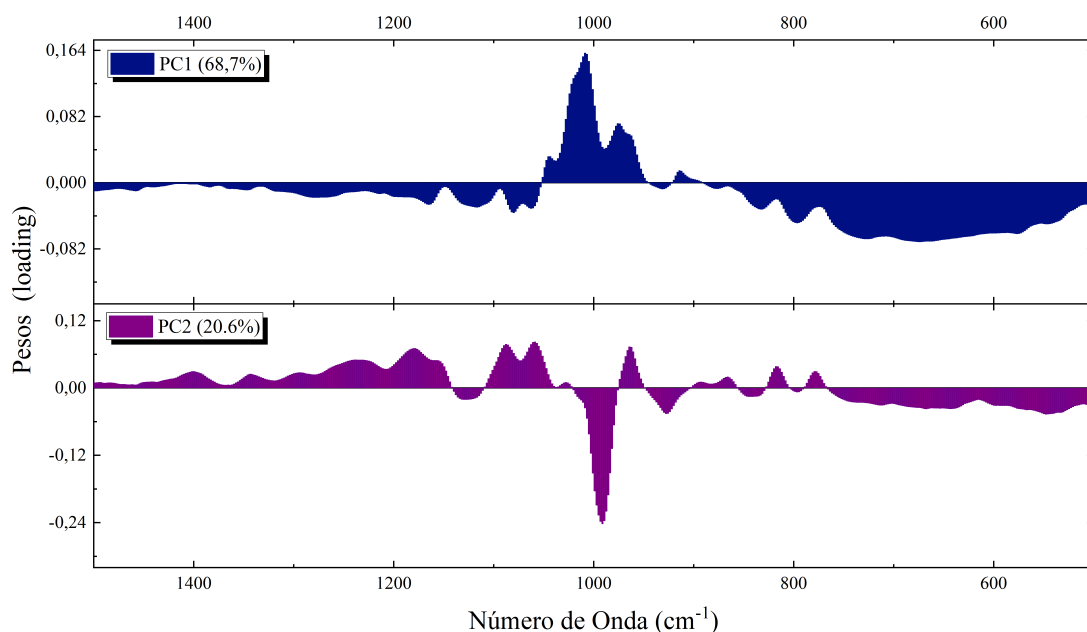


Figura 6.11: *Loading plots* das duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) para o Grupo 4.

A PC1, responsável por 68,7% da variância total dos dados, apresenta um perfil de contribuição altamente concentrado na região entre 1100 e 950 cm^{-1} , com um pico de carga positiva acentuado em torno de 1026 cm^{-1} . Essa banda é amplamente atribuída aos modos

de estiramento C–O e C–O–C dos carboidratos, constituindo uma assinatura espectral característica do mel e dos adulterantes açucarados. A forte carga positiva nessa região indica que o aumento da intensidade dessas bandas está positivamente correlacionado com o eixo da PC1, contribuindo de forma determinante para a separação observada entre amostras adulteradas e o mel puro nos *score plots*.

Além dessa região dominante, a PC1 também apresenta contribuições negativas significativas, especialmente entre 950 e 500 cm^{-1} . Essa faixa compreende bandas relacionadas a deformações fora do plano de C–H. As cargas negativas indicam que essas bandas variam de forma inversa às aquelas mais intensas da região de 1026 cm^{-1} . Ou seja, amostras com maiores intensidades entre 1100 e 950 cm^{-1} tendem a ter menor intensidade relativa entre 950 e 500 cm^{-1} , e vice-versa, sugerindo que há uma relação estatística de compensação entre essas regiões espectrais.

Já a PC2, que explica 20,6% da variância, apresenta perfil mais distribuído e menos concentrado em uma única banda. Observa-se alternância de cargas positivas e negativas ao longo do espectro, com destaques para regiões em torno de 1147 cm^{-1} , 1026 cm^{-1} (mas com sinal oposto ao da PC1), 870 cm^{-1} e abaixo de 700 cm^{-1} . A banda em 870 cm^{-1} pode ser atribuída a vibrações fora do plano de C–H em estruturas de anéis. A alternância entre sinais positivos e negativos indica que a PC2 descreve variações complementares às da PC1 — enquanto determinadas bandas aumentam em intensidade em certos grupos de amostras, outras diminuem, refletindo uma diferenciação mais refinada entre os tipos de adulterantes.

Na teoria da PCA, os *loadings* correspondem aos coeficientes de correlação entre cada variável original (número de onda) e as componentes principais. Um valor positivo implica que a variável aumenta em conjunto com a pontuação da componente, enquanto um valor negativo indica relação inversa. Isso permite interpretar os *loadings* como indicadores do peso estatístico de cada região espectral na construção da componente. Vale salientar que os sinais positivos ou negativos não se referem à natureza química das bandas, mas à direção de sua contribuição estatística no modelo.

A análise dos *loadings* é crucial para relacionar as estruturas espectrais com os agrupa-

mentos observados nos *score plots*. Ao revelar as regiões espectrais que mais contribuíram para a separação entre os grupos de amostras, essa análise fornece base para justificar a escolha de regiões específicas no desenvolvimento de modelos quimiométricos. No presente caso, a dominância da banda em 1026 cm^{-1} na PC1 confirma seu papel central na distinção entre mel puro e adulterado, consolidando-a como um marcador espectral confiável para detecção de adulteração por açúcares.

Para avaliar a separação global entre as amostras de mel puro e adulterado, foi elaborado um *score plot* considerando simultaneamente todos os grupos experimentais (Grupos 1, 2, 3 e 4), abrangendo soluções adulterantes com concentrações de 15%, 30% e 45% de açúcar, lembrando que o Grupo 1 são os méis puros. A Figura 6.12 apresenta os resultados da projeção das amostras no plano formado pelas duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2), que juntas explicam 91,7% da variância total dos dados (sendo 67,7% para a PC1 e 24,0% para a PC2).

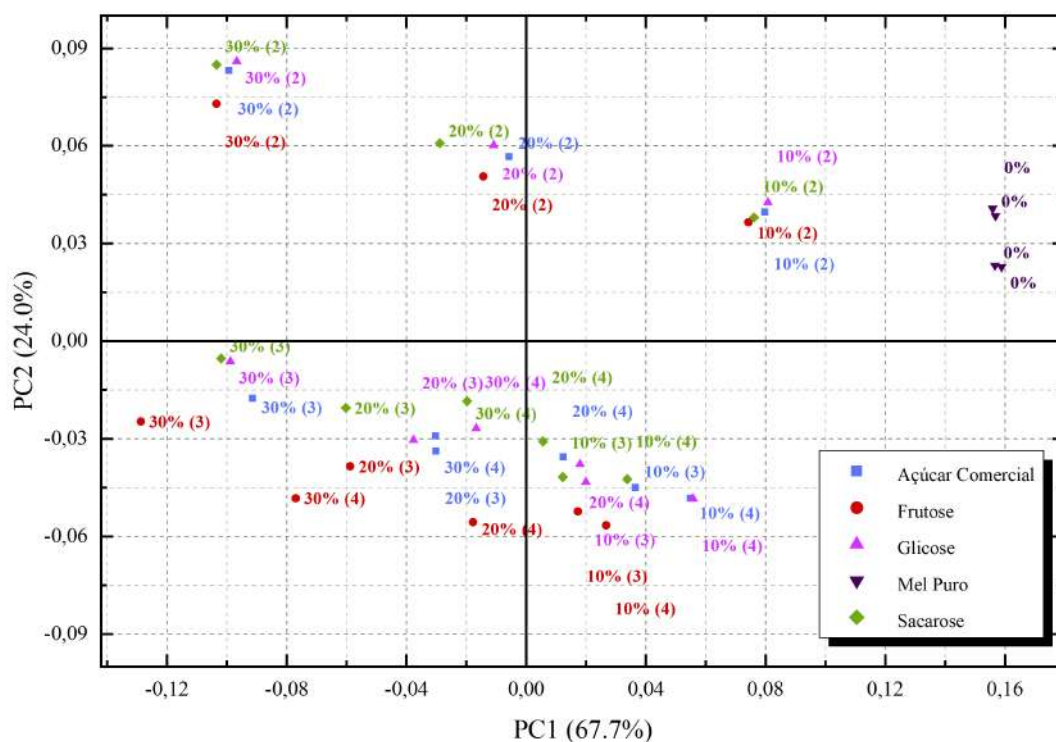


Figura 6.12: *Score plots*, PC2 versus PC1. As amostras foram agrupadas conforme o tipo de adulterante utilizado: açúcar comercial (quadrado azul), frutose (círculo vermelho), glicose (triângulo magenta), sacarose (losango verde) e mel puro (triângulo invertido roxo). Os rótulos associados aos pontos representam a porcentagem de adulteração da amostra (10%, 20% ou 30%) e o grupo da solução adulterante entre parênteses: (2) solução com 15% de açúcar, (3) com 30%, e (4) com 45%.

A distribuição dos escores evidencia uma tendência clara de separação entre o mel puro e as amostras adulteradas, com o mel puro situado na extremidade direita do gráfico (valores positivos de PC1), enquanto as amostras adulteradas concentram-se predominantemente na porção central e esquerda (valores negativos ou próximos de zero). Essa separação ao longo da PC1 indica que essa componente captura majoritariamente a variação relacionada à presença de adulterantes.

A PC2, por sua vez, contribui com uma variação adicional que permite diferenciar grupos de acordo com a concentração e tipo de adulterante. Observa-se que as amostras do Grupo 2 (15%) tendem a se posicionar em valores mais altos de PC2, enquanto as dos Grupos 3 (30%) e 4 (45%) distribuem-se ao longo do eixo com tendência descendente. Esse comportamento sugere que a PC2 é sensível à proporção da solução adulterante, especialmente nos casos com frutose e sacarose, cujas amostras se espalham verticalmente conforme a concentração aumenta.

Os rótulos incluídos nos pontos (indicando a porcentagem e o grupo entre parênteses) permitem observar que há uma sobreposição parcial entre amostras de diferentes grupos em algumas regiões, especialmente entre os grupos 3 e 4. Ainda assim, a tendência geral aponta para uma organização coerente: quanto maior a concentração da solução adulterante, maior o afastamento do *cluster* do mel puro ao longo da PC1.

A separação mais acentuada foi observada para as amostras de frutose, que apresentaram maior deslocamento da posição original do mel puro. Em contrapartida, os adulterantes como glicose e açúcar comercial apresentaram maior sobreposição entre os grupos, embora também sigam a tendência de separação conforme a concentração aumenta.

A Figura 6.13 apresenta os *loading plots* referentes à PCA aplicada ao conjunto completo de amostras, abrangendo as adulterações com soluções de 15%, 30% e 45% de açúcar. A PC1, que explica 67,7% da variância total, concentra as maiores contribuições positivas entre 1100 e 950 cm^{-1} , com destaque para a banda centrada em 1026 cm^{-1} , atribuída aos modos de estiramento C–O e C–O–C dos carboidratos, como já discutido.

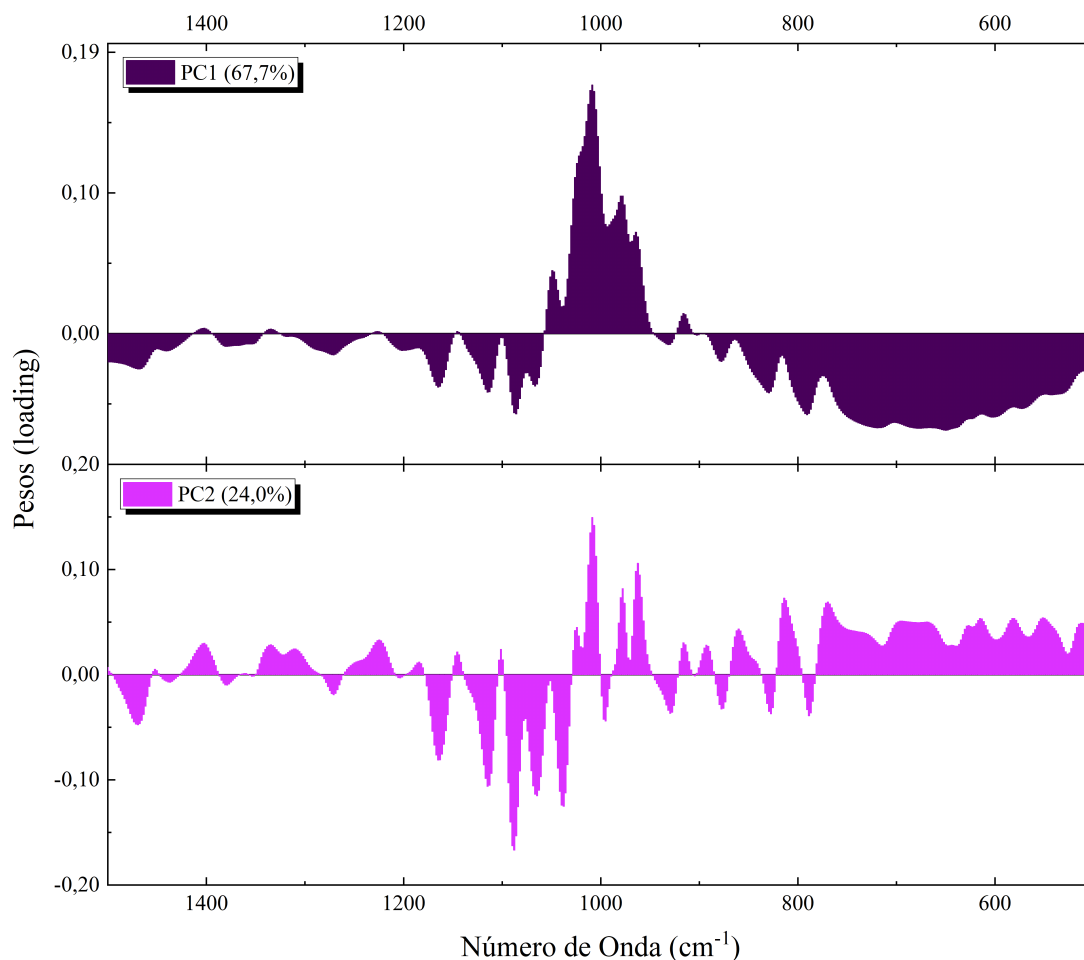


Figura 6.13: Pesos associados às duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2).

Além da contribuição positiva expressiva, a PC1 também apresenta valores negativos relevantes abaixo de 900 cm^{-1} , indicando que variações em bandas fora do plano de C–H também contribuíram, mas em sentido oposto para o *espalhamento* das amostras.

A PC2, responsável por 24,0% da variância, apresenta um padrão mais complexo, com alternância de sinais positivos e negativos distribuídos por toda a faixa espectral de 1500 a 500 cm^{-1} . Destacam-se contribuições negativas acentuadas entre 1150 e 950 cm^{-1} e picos positivos entre 1020 e 950 cm^{-1} , sugerindo que essa componente captura variações mais sutis na composição dos adulterantes e em suas proporções relativas. Essa alternância de sinal reflete correlações opostas entre determinadas bandas, indicando que o aumento da intensidade em uma região pode estar associado à diminuição em outra ao longo dos diferentes tipos e graus de adulteração.

A análise dos *loadings* permite, assim, compreender os mecanismos de separação obser-

vados nos *score plots*. A forte influência das regiões entre 1100 e 900 cm^{-1} , em ambas as componentes principais, confirma que essas faixas espectrais são as mais relevantes para discriminar adulterações por açúcares no mel. Tais evidências reforçam a viabilidade do uso da PCA como ferramenta quimiométrica para análise exploratória e triagem de autenticidade em amostras de mel, sendo realizadas medidas de absorção no infravermelho utilizando a técnica de FTIR-ATR.

Capítulo 7

Conclusões

Neste trabalho, investigamos a aplicação de diferentes técnicas espectroscópicas associadas à quimiometria para caracterizar e diferenciar amostras de mel puro e adulterado. Foram analisadas 38 amostras ao todo — duas amostras puras e trinta e seis adulteradas com soluções aquosas de açúcares em diferentes concentrações, simulando práticas de fraude alimentar realistas. As análises buscaram avaliar a sensibilidade, a robustez e a viabilidade operacional de métodos não destrutivos na identificação de adulterações sutis em méis produzidos por *Apis mellifera scutellata*.

Os resultados obtidos por espectroscopia fotoacústica (PAS) na região do UV-Vis demonstraram perfis de absorção compatíveis com a presença de compostos fenólicos e carboidratos naturalmente presentes no mel, com destaque para uma banda intensa em torno de 270 nm. Entretanto, observou-se uma instabilidade espectral relevante, com diferenças marcantes entre as varreduras espectrais crescente e decrescente. Esse comportamento sugere possíveis efeitos de fotodegradação ou redistribuição térmica durante a aquisição dos dados, comprometendo a confiança e a consistência dos resultados nas condições adotadas. Apesar dessas limitações, as bandas recorrentes indicam que a técnica possui um potencial promissor, desde que se desenvolvam protocolos de medição mais rigorosos que assegurem estabilidade ao longo do experimento.

Na sequência, a espectroscopia Raman foi aplicada às mesmas amostras. Observou-se elevada similaridade entre os espectros das amostras puras e adulteradas, com perfis dominados pelas bandas vibracionais características de carboidratos, sobretudo estiramentos

C–C e C–O e deformações C–H. A Análise de Componentes Principais (PCA) realizada sobre esses espectros não conseguiu distinguir de forma consistente os grupos de amostras, em função da composição química muito semelhante entre o mel e os adulterantes e da predominância dos mesmos modos vibracionais. Diferentes pré-processamentos e variações da faixa espectral analisada também não resultaram em separações satisfatórias. Esses achados indicam que, nas condições experimentais adotadas, a espectroscopia Raman associada à PCA não apresentou sensibilidade suficiente para discriminar adulterações sacarídicas em mel de maneira confiável.

Por fim, a espectroscopia FTIR-ATR apresentou um desempenho notavelmente superior na diferenciação das amostras. Foram observadas variações expressivas na faixa de $1200\text{--}900\text{ cm}^{-1}$, especialmente na intensidade da banda centrada em 1026 cm^{-1} , associada aos estiramentos C–O e C–O–C dos carboidratos. A aplicação da PCA aos espectros FTIR-ATR resultou em separações claras e consistentes entre as amostras puras e adulteradas, com capacidade discriminativa crescente à medida que se elevava a concentração das soluções adulterantes. As amostras adulteradas com frutose se destacaram por apresentar maior afastamento do *cluster* do mel puro, evidenciando sua forte influência espectral. A análise dos *score plots* e dos *loading plots* demonstrou que as principais regiões responsáveis pela separação foram justamente aquelas associadas às vibrações características da fração sacarídica da matriz.

De forma geral, os resultados confirmam que a combinação da espectroscopia FTIR-ATR com métodos quimiométricos representa uma estratégia eficiente, rápida e não destrutiva para a detecção de adulterações por açúcares em amostras de mel. Em contrapartida, a espectroscopia Raman mostrou limitações importantes, e a aplicação da PAS, embora promissora, requer aprimoramentos metodológicos que assegurem maior estabilidade e fidelidade dos dados.

Por fim, este estudo demonstrou que, embora nenhuma técnica espectroscópica isolada seja universalmente eficaz para todas as situações, a integração de métodos vibracionais sensíveis com análises estatísticas multivariadas permite ampliar significativamente a capacidade de rastrear e autenticar méis potencialmente adulterados. Como perspectivas

futuras, recomenda-se expandir o número de amostras puras, incluir adulterantes de maior complexidade composicional (como xaropes comerciais e mel artificial), testar modelos supervisionados de classificação e aprimorar os protocolos de aquisição na espectroscopia fotoacústica. Tais medidas podem contribuir para consolidar essas técnicas como ferramentas robustas no monitoramento da autenticidade do mel e no enfrentamento das fraudes alimentares.

Referências Bibliográficas

- [1] R. Aslam et al. A systematic account of food adulteration and recent trends in the non-destructive analysis of food fraud detection. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17, pp. 3094–3114, 2023.
- [2] J. Spink e D. C. Moyer. Defining the Public Health Threat of Food Fraud. *Journal of Food Science*, 76, 2011.
- [3] S. Bansal et al. Food adulteration: Sources, health risks, and detection methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, pp. 1174–1189, 2017.
- [4] M. D. Ehmke, A. Bonanno, K. Boys e T. G. Smith. Food fraud: Economic insights into the dark side of incentives. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, 63, pp. 685–700, 2019.
- [5] K. Everstine, J. Spink e S. Kennedy. Economically Motivated Adulteration (EMA) of Food: Common Characteristics of EMA Incidents. *Journal of Food Protection*, 76, pp. 723–735, 2013.
- [6] Y. He et al. Detection of adulteration in food based on nondestructive analysis techniques: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61, pp. 2351–2371, 2021.
- [7] F. N. Arslan et al. FT-IR spectroscopy with chemometrics for rapid detection of wheat flour adulteration with barley flour. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 15, pp. 245–261, 2020.

- [8] A. A. Machado De-Melo, L. B. Almeida-Muradian, M. T. Sancho e A. Pascual-Maté. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 57, pp. 5–37, 2018.
- [9] J. M. Alvarez-Suarez et al. The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey. *Foods*, 3, pp. 420–432, 2014.
- [10] D. Bose e M. Padmavati. Honey Authentication: A review of the issues and challenges associated with honey adulteration. *Food Bioscience*, 61, 2024.
- [11] R. Fakhlaei et al. The Toxic Impact of Honey Adulteration: A Review. *Foods*, 9, 2020.
- [12] Estadão. *Veja quais são os 10 alimentos mais adulterados no mundo e como se proteger*. Disponível em: <https://www.estadao.com.br/saude/veja-quais-sao-os-10-alimentos-mais-adulterados-no-mundo-e-como-se-proteger-nprm/>, 2024. Acesso em: 27/06/2025.
- [13] BBC News Brasil. *Os 10 alimentos com mais fraudes no mundo - e como identificá-los*. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/articles/ckkg69vrk9vo>, 2024. Acesso em: 27/06/2025.
- [14] Food Manufacture. *Food adulteration: are we missing the bigger picture?* Disponível em: <https://www.foodmanufacture.co.uk/Article/2025/03/13/what-are-five-most-adulterated-foods/>, 2025. Acesso em: 27/06/2025.
- [15] S. Hu et al. Raman spectroscopy combined with machine learning algorithms to detect adulterated Suichang native honey. *Scientific Reports*, 12, 2022.
- [16] R. El Hajj e N. Estephan. Advances in infrared spectroscopy and chemometrics for honey analysis: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024.
- [17] K. W. Se et al. A simple approach for rapid detection and quantification of adulterants in stingless bees (*Heterotrigona itama*) honey. *Food Research International*, 105, pp. 453–460, 2018.

- [18] L. Fiorani et al. Photoacoustic Laser System for Food Fraud Detection. *Sensors*, 21, 2021.
- [19] E.-I. Geană et al. Honey Adulteration Detection via Ultraviolet–Visible Spectral Investigation Coupled with Chemometric Analysis. *Foods*, 2024.
- [20] Codex Alimentarius Commission. *Revised Codex Standard for Honey (Codex STAN 12-1981, Rev. 2)*. Roma, 2001.
- [21] S. Samarghandian, T. Farkhondeh e F. Samini. Honey and Health: A Review of Recent Clinical Research. *Pharmacognosy Research*, 9, pp. 121–127, 2017.
- [22] A. K. Kuropatnicki, M. Klósek e M. Kucharzewski. Honey as medicine: historical perspectives. *Journal of Apicultural Research*, 57, pp. 113–118, 2018.
- [23] R. C. R. Camargo et al. *Mel: Características e composição*. Vol. 150. Documentos. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006, pp. 5.
- [24] C. D. Michener. *The Bees of the World*. 2^a ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007.
- [25] M. C. Arias e W. S. Sheppard. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, pp. 25–35, 2005.
- [26] N. Gallai, J.-M. Salles, J. Settele e B. E. Vaissière. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, pp. 810–821, 2009.
- [27] E. Crane. *Bees and Beekeeping: Science, Practice and World Resources*. Oxford: Heinemann Newnes, 1990.
- [28] F. Ruttner. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Berlin: Springer-Verlag, 1988.

- [29] J. D. Ellis e A. Ellis. *African Honey Bee, Africanized Honey Bee, Apis mellifera scutellata*. EENY-429 (IN790), University of Florida IFAS Extension. Disponível em: <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/IN790>, 2010. Acesso em: 10/06/2025.
- [30] M. L. d. Oliveira e J. A. Cunha. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? / Do Africanized honeybees explore resources in the Amazonian forest? *Zoologia (Curitiba)*, 2005.
- [31] P. M. d. Silva et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, pp. 309–323, 2016.
- [32] A. A. M. De-Melo, L. B. d. Almeida-Muradian, M. T. Sancho e A. Pascual-Maté. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 2017.
- [33] H. Wang et al. Composition, functional properties and safety of honey: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2023.
- [34] P. Saranraj e S. Sivasakthi. Comprehensive Review on Honey: Biochemical and Medicinal Properties. *Journal of Academia and Industrial Research*, 6, pp. 165–181, 2018.
- [35] F. C. Biluca et al. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016.
- [36] A. Evangelista-Rodrigues, E. M. S. d. Silva, E. M. F. Beserra e M. L. Rodrigues. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. *Ciência Rural*, 35, pp. 1166–1171, 2005.
- [37] X.-H. Zhang et al. A comprehensive review of the current trends and recent advancements on the authenticity of honey. *Food Chemistry: X*, 19, 2023.

- [38] N. Khorshidian et al. Fructose and high fructose corn syrup: are they a two-edged sword? *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 72, pp. 592–614, 2021.
- [39] J. J. White. *Honey*. Oxford: Heinemann Newnes, 1979, pp. 409.
- [40] A. E. R. Silva, E. M. S. d. Silva, E. M. F. Beserra e M. L. Rodrigues. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. *Ciência Rural*, 35, pp. 1166–1171, 2005.
- [41] E. Commission. *Report on the outcome of the Coordinated Control Plan on the authenticity of honey*. DG SANTE/2021/7068 Rev. 2, p. 3–4. 2021.
- [42] B. Záborská e L. Vorlová. Adulteration of honey and available methods for detection – a review. *Acta Veterinaria Brno*, 83, pp. 85–102, 2015.
- [43] V. Paiano et al. Detection of Honey Adulteration by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry: Results from an EU Coordinated Action. *Separations*, 12, 2025.
- [44] G. Zhang e W. Abdulla. On honey authentication and adulterant detection techniques. *Food Control*, 138, 2022.
- [45] E. Anklam. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 63, 1998.
- [46] A. G. Bell. On the Production and Reproduction of Sound by Light. *American Journal of Science*, 20, pp. 305–324, 1880.
- [47] S. Manohar e D. Razansky. Photoacoustics: a historical review. *Advances in Optics and Photonics*, 8, pp. 586–617, 2016.
- [48] L. B. Kreuzer. Ultralow gas concentration infrared absorption spectroscopy. *Journal of Applied Physics*, 42, pp. 2934–2943, 1971.
- [49] A. Rosencwaig. Photoacoustic spectroscopy of solids. *Optics Communications*, 1973.
- [50] A. Rosencwaig e A. Gersho. Theory of the photoacoustic effect with solids. *Journal of Applied Physics*, 47, pp. 64–69, 1976.

- [51] S. N. Thakur. “Photoacoustic Spectroscopy of Gaseous and Condensed Matter”. *Photoacoustic Imaging: Principles, Advances and Applications*. Ed. por R. Gharieb. IntechOpen, 2020, pp. 19–54.
- [52] A. Rosencwaig. *Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons, 1980.
- [53] S. Malkin e D. Cahen. Dependence of photoacoustic signal on optical absorption coefficient in optically dense liquids. *Analytical Chemistry*, 1981.
- [54] L. V. de Castro. “Estudo de Lesão de Cárie Experimental via Espectroscopia Fotoacústica e Raman”. Dissertação de Mestrado. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2015.
- [55] B. Schrader. *Infrared and Raman Spectroscopy: Methods and Applications*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1995, pp. 788.
- [56] H. A. Szymanski. *Raman Spectroscopy: Theory and Practice*. Vol. 1. New York: Plenum Press, 1967.
- [57] O. Sala. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. 2ª ed. São Paulo: Editora Unesp, 2011.
- [58] J. M. Chalmers e P. R. Griffiths. *Handbook of Vibrational Spectroscopy: Volume 1 – Theory and Instrumentation*. Chichester: John Wiley & Sons, 2002, pp. 923.
- [59] E. Smith e G. Dent. *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd, 2005.
- [60] T. P. Rodrigues. “Espectroscopia vibracional, técnicas fototérmicas e quimiométricas para caracterização físico-química de diesel e combustíveis alternativos”. Tese de Doutorado. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2017.
- [61] D. A. Skoog, F. J. Holler e S. R. Crouch. *Principles of Instrumental Analysis*. 7ª ed. Boston, MA: Cengage Learning, 2017.
- [62] G. Socrates. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts*. 3ª ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2001.

- [63] D. A. Skoog, F. J. Holler e S. R. Crouch. *Principles of Instrumental Analysis*. 7^a ed. Boston, MA: Cengage Learning, 2017.
- [64] J. R. Ferraro, K. Nakamoto e C. W. Brown. *Introductory Raman Spectroscopy*. 2^a ed. Boston: Academic Press, 2003.
- [65] B. H. Stuart. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons, 2004.
- [66] H. W. Siesler. “Basic Principles of Near-Infrared Spectroscopy”. *Handbook of Near-Infrared Analysis*. Ed. por D. A. Burns e E. W. Ciurczak. 3^a ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007, pp. 13–38.
- [67] S. G. Kazarian e K. L. A. Chan. ATR-FTIR Spectroscopic Imaging: Recent Advances and Applications to Biological Systems. *Analyst*, pp. 1940–1951, 2013.
- [68] K. Nakamoto. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 6^a ed. John Wiley & Sons, 2009.
- [69] G. Herzberg. *Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules*. New York: D. Van Nostrand Company, 1945.
- [70] P. R. Griffiths e J. A. D. Haseth. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. 2^a ed. Wiley, 2007.
- [71] B. C. Smith. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. 2^a ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011.
- [72] M. Otto. *Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry*. 3^a ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2017, pp. 12–16.
- [73] D. L. Massart et al. *Chemometrics: a Textbook*. Amsterdam: Elsevier, 1988, pp. 1–5.
- [74] M. M. C. Ferreira. *Quimiometria: Conceitos, Métodos e Aplicações*. 1^a ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.
- [75] K. R. Beebe, R. J. Pell e M. B. Seasholtz. *Chemometrics: A Practical Guide*. New York: Wiley-Interscience, 1998.

- [76] B. R. Kowalski. Chemometrics: Views and Propositions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 1975.
- [77] K. Pearson. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 2, 1901.
- [78] H. Hotelling. Analysis of a Complex of Statistical Variables Into Principal Components. *Journal of Educational Psychology*, 24, pp. 417–441, 498–520, 1933.
- [79] B. G. Silva. *Espectroscopia Fotoacústica Resolvida na Frequência: Investigação de Espessuras em Materiais Multicamadas*. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Física). Maringá, 2023.
- [80] D. Dimakopoulou-Papazoglou et al. Application of UV–Vis spectroscopy for the detection of adulteration in Mediterranean honeys. *European Food Research and Technology*, 249, pp. 3043–3053, 2023.
- [81] D. Dimakopoulou-Papazoglou, N. Ploskas, K. Koutsoumanis e E. Katsanidis. Identification of geographical and botanical origin of Mediterranean honeys using UV-vis spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18, pp. 3923–3934, 2024.
- [82] V. Andrade de Oliveira et al. Photoacoustic spectroscopy and multivariate techniques: New applications to simplify the analysis of raw propolis. *Microchemical Journal*, 2023.
- [83] M. Lourenço Neto, K. L. Agra, J. Suassuna Filho e F. E. Jorge. TDDFT calculations and photoacoustic spectroscopy experiments used to identify phenolic acid functional biomolecules in Brazilian tropical fruits in natura. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 193, pp. 249–257, 2018.
- [84] M. Oroian, S. Ropciuc e S. Paduret. Honey adulteration detection using Raman spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 11, pp. 959–968, 2018.
- [85] L. F. C. de Oliveira, R. Colombara e H. G. M. Edwards. Fourier Transform Raman Spectroscopy of Honey. *Applied Spectroscopy*, 56, pp. 306–311, 2002.

- [86] X. Wu et al. Identification and quantification of adulterated honey by Raman spectroscopy combined with convolutional neural network and chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 274, 2022.
- [87] S. Li et al. Detection of honey adulteration by high fructose corn syrup and maltose syrup using Raman spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, 28, pp. 69–74, 2012.
- [88] N. S. Sotiropoulou et al. The Use of SPME-GC-MS, IR and Raman Techniques for Botanical and Geographical Authentication and Detection of Adulteration of Honey. *Foods*, 10, 2021.
- [89] J. A. Fernández Pierna, O. Abbas, P. Dardenne e V. Baeten. Discrimination of Corsican honey by FT-Raman spectroscopy and chemometrics. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 15, pp. 75–84, 2011.
- [90] M. Sahlan et al. Identification and Authentication of Honey Using Chemometric Analysis Based on ATR-FTIR and Raman Spectroscopy. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 14, pp. 36–44, 2022.
- [91] M. David, C. Berghian-Grosan e D. A. Magdas. Honey Differentiation Using Infrared and Raman Spectroscopy Analysis and the Employment of Machine-Learning-Based Authentication Models. *Foods*, 14, pp. 1032, 2025.
- [92] M. David e D. A. Magdas. Authentication of honey origin and harvesting year based on Raman spectroscopy and chemometrics. *Talanta Open*, 10, 2024.
- [93] A. N. Batsoulis et al. FT-Raman spectroscopic simultaneous determination of fructose and glucose in honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2005.
- [94] S. Narakaew et al. The finished polyester fabric with hot NH_4OH pretreatment and mixed ZnO-Zn(OH)_2 nanoparticles for hydrophobic property. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 32, pp. 109–117, 2022.
- [95] O. Anjos, M. G. Campos, P. Contreras Ruiz e P. Antunes. Application of FTIR-ATR spectroscopy to the quantification of sugar in honey. *Food Chemistry*, 169, pp. 218–223, 2015.

- [96] H. E. Tahir et al. Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 226, pp. 202–211, 2017.
- [97] J. Cárdenas-Escudero, D. Galán-Madruga e J. O. Cáceres. FTIR–ATR detection method for emerging C₃-plants-derived adulterants in honey: Beet, dates, and carob syrups. *Talanta*, 265, 2023.
- [98] R. Fakhlaei, A. A. Babadi, N. Mat Ariffin e X. Zou. Development of FTIR–ATR spectra and PLS regression combination model for discrimination of pure and adulterated acacia honey. *Food Control*, 169, 2025.
- [99] A. Barth. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1767, pp. 1073–1101, 2007.
- [100] H. E. Tahir et al. Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Chemistry*, 226, pp. 202–211, 2017.
- [101] A. Matwiczuk et al. Classification of Honey Powder Composition by FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometric Analysis. *Molecules*, 27, 2022.
- [102] J. C. Prata e P. M. da Costa. Fourier Transform Infrared Spectroscopy Use in Honey Characterization and Authentication: A Systematic Review. *ACS Food Science & Technology*, 4, pp. 1817–1828, 2024.
- [103] M. Sahlan et al. Identification and classification of honey’s authenticity by attenuated total reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometric method. *Veterinary World*, 12, pp. 1304–1310, 2019.
- [104] E. A. Tsapou, V. J. Sinanoglou, G. Ntourtoglou e E. Koussissi. Emphasizing the Potential of Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy Combined with Chemometrics, for Classification of Greek Grape Marc Spirits. *Beverages*, 10, pp. 42, 2024.

-
- [105] S. Gok et al. Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis. *Food Chemistry*, 170, pp. 234–240, 2015.
- [106] G. Velazquez, A. Herrera-Gómez e M. O. Martín-Polo. Identification of bound water through infrared spectroscopy in methylcellulose. *Journal of Food Engineering*, 59, pp. 79–84, 2003.