



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Desenvolvimento de métodos para detecção de informações, a partir de substâncias endógenas e exógenas, em impressões digitais latentes utilizando espectroscopia vibracional e nanossensores

MARCO ANTONIO DE SOUZA

2022

Desenvolvimento de métodos para detecção de informações, a partir de substâncias endógenas e exógenas, em impressões digitais latentes utilizando espectroscopia vibracional e nanossensores

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Marco Antonio de Souza

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
Coorientador: Prof. Dr. Jez Willian Batista Braga

Brasília, DF
2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Márcio de Souza e Ana Lúcia de Souza por depositarem em mim a confiança de viver uma boa vida e me ensinarem a dar valor ao conhecimento e ao trabalho. Sempre carregarei vocês no coração.

À minha querida esposa Flavia pela parceria nas discussões dos resultados obtidos, apoio, paciência e carinho durante essa caminhada.

Aos meus cães Nemo e Dory, queridos e fiéis companheiros.

Aos colegas de bancada e novos amigos que fiz ao longo dessa trajetória, em especial: Karol (IQ/UnB), Alexandre (IF/UnB) e Manoel (IF/UnB), pelo espírito de grupo e suporte aos experimentos necessários ao projeto.

Aos Professores e amigos Leonardo Paterno (IQ/UnB), Sebastião William da Silva (IF/UnB) e Joel Rubim pelo conhecimento transmitido.

Aos Professores Marcelo Henrique Sousa (IQ/UnB) e Jez Braga (IQ/UnB) pela oportunidade dada para o desenvolvimento desse projeto, confiança, apoio e conhecimento transmitido.

À Universidade de Brasília - UnB, em especial ao Instituto de Química (IQ/UnB) e ao Instituto de Física (IF/UnB), por disponibilizarem a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Polícia Federal-PF pelo apoio e fomento a projetos que impliquem no aprimoramento institucional, sobretudo à Academia Nacional de Polícia - ANP/PF e Corregedoria Geral de Polícia - COGER/PF, em especial ao Delegado de Polícia Federal e amigo Raphael Baggio pela confiança, incentivo e apoio ao longo desse processo.

Aos meus amigos e familiares pelo incentivo e apoio.

Aos meus amigos e colegas do grupo de pesquisa Papiloscopia Forense pelo incentivo e apoio.

Ao mundo por mudar as coisas, por nunca fazê-las serem da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar, o que descobrir e o que fazer.

"Impossível não é um fato. É uma opinião."

(Muhammad Ali)

“Na vida, não existe nada a se temer,
apenas a ser compreendido.”

(Marie Curie)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos para análise de informações de impressões digitais latentes (IDL), a partir de substâncias exógenas e endógenas, utilizando espectroscopia vibracional. Acerca dos métodos de análise de substâncias exógenas foi possível realizar a detecção qualitativa de cocaína (COC) das IDLs, utilizando Espalhamento Raman Intensificado por Superfície – SERS. Para isso, foram preparados e realizados testes com diferentes substratos SERS de nanopartículas de ouro. A estratégia adotada envolveu o gotejamento desses substratos SERS em lâminas de alumínio. Foi estudada a adsorção de R6G e COC em soluções aquosas de diferentes concentrações, e a metodologia foi aplicada na detecção de COC em impressões digitais. A COC utilizada para preparar as soluções de trabalho para os estudos SERS foi o sal de cloridrato correspondente. Ela foi analisada por RMN- H^1 e a sua pureza foi determinada como 88,27%. O substrato selecionado a partir dos testes com R6G foi caracterizado. Os resultados de UV-Vis mostraram que a absorção máxima das ressonâncias de plasmon de superfície localizadas transversal (LSPR_T) em 545 nm e longitudinal (LSPR_L) em 599 nm para as AuNPs, confirmando a presença de AuNBs. Além disso, também por meio da análise de medidas de UV-Vis, foi observada estabilidade desses nanobateriais por um período de 28 dias. Os dados experimentais foram ajustados às isothermas de Langmuir, Frumkin e Freundlich, sendo a de Langmuir a que melhor se ajustou aos dados experimentais para COC e, de acordo com seu ΔG_{ads} de -84,12 kJ/mol, pôde-se constatar que a adsorção física e espontânea. Na impressão digital contaminada, foi possível detectar uma concentração da ordem de 10^{-4} mol/L, o que corresponde a uma massa de 273 ng. Além disso, buscou-se determinar o sexo de um indivíduo, a partir de substâncias endógenas das impressões digitais, por meio das espectroscopias Raman e Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR, com auxílio de ferramentas quimiométricas (Análise de Componentes Principais (PCA), Análises discriminantes por método dos mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e suporte de vetor de máquina (SVM-DA)). Para a espectroscopia Raman, as taxas de discriminação variaram entre 80 e 93%, considerando um período até 7 dias da data da coleta. Para as medidas Raman, o método supervisionado SVM-DA demonstrou ser mais eficiente. Para o FTIR, os resultados PLS-DA mostraram uma taxa de discriminação superior a 80%.

ABSTRACT

This work aimed to develop methods to acquire forensic information from latent fingerprints (LF), from exogenous and endogenous substances, using vibrational spectroscopy. Regarding the methods of analysis of exogenous substances, it was possible to perform the qualitative detection of cocaine (COC) from LFs, using Surface Enhanced Raman Scattering (SERS). For this, SERS substrates of gold nanoparticles were prepared and performed tests. The strategy adopted involved dripping these SERS substrates onto aluminum blades. The adsorption of R6G and COC in aqueous solutions of different concentrations was studied, and the methodology was applied in the detection of COC in fingerprints. The COC used to prepare the solutions used for SERS studies was the corresponding hydrochloride salt. It was analyzed by $^1\text{H-NMR}$ and its purity was determined as 88.27%. The substrate selected from the R6G tests was characterized. The UV-Vis results showed that the maximum absorption of cross-sectional surface plasmon resonances (LSPR_T) took place at 545 nm and longitudinal (LSPR_L) at 599 nm for AuNPs, confirming the presence of nanorods. In addition, nanorods stability was also observed through the analysis of UV-Vis measurements for a period of 28 days. The experimental data were adjusted to Langmuir, Frumkin and Freundlich isotherms, and Langmuir's model were best adjusted to the experimental data for COC and, according to ΔG_{ads} of -84.12 kJ/mol, the physical and spontaneous adsorption was confirmed. In the contaminated fingerprint, a concentration of the order of 10^{-4} mol/L, which corresponds to a mass of 273 ng was detected. In addition we sought to determine the sex of an individual, from endogenous substances of fingerprints, by means of Raman Spectroscopy and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), with the aid of chemometric tools (Principal Component Analysis (PCA), Discriminant analyses by partial least squares (PLS-DA) and machine vector support (SVM-DA)). For Raman spectroscopy, discrimination rates varied between 80 and 93%, considering a period up to 7 days from the date of collection. For Raman measurements, the Supervised SVM-DA method proved to be more efficient. For FTIR, the PLS-DA results showed a discrimination rate of more than 80%.

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Vestígios Papiloscópicos | 4 |
| 1.2. Obtenção de evidências associadas às IDLs | 6 |
| 1.3. A espectroscopia vibracional e outras possíveis aplicações forenses..... | 11 |
| 2. Justificativa..... | 13 |
| 2.1. Determinação de substâncias ilícitas em impressões digitais..... | 13 |
| 2.2. Classificação de sexo por meio das impressões digitais..... | 16 |
| 3. Objetivos | 17 |
| 3.1. Objetivos Gerais | 17 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 17 |
| 4. Fundamentação Teórica | 19 |
| 4.1. Métodos de Caracterização..... | 19 |
| 4.1.1. Espectroscopia de Absorção Molecular no Ultravioleta/Visível - UV-Vis | 19 |
| 4.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)..... | 20 |
| 4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) | 22 |
| 4.1.4. Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS) | 23 |
| 4.1.5. Espalhamento Raman | 24 |
| 4.1.6. Efeito Raman Ressonante..... | 28 |
| 4.1.7. <i>Surface Enhancement Raman Scattering</i> - SERS | 29 |
| 4.1.8. Espectroscopia de absorção no Infravermelho | 33 |
| 4.3. Quimiometria..... | 45 |
| 4.3.1. Análise de Componentes Principais (PCA)..... | 45 |
| 4.3.2. Discriminação por Mínimos Quadrados Parcial (PLS-DA)..... | 46 |
| 4.3.3. Máquinas de vetores de suporte (SVM) | 49 |
| 4.4. Síntese de Nanopartículas Metálicas | 52 |
| 4.4.1. Síntese Fotoquímica de Nanopartículas de Ouro | 52 |
| 4.4.2. Poli(etileno imina) (PEI) | 53 |
| 4.4.3. Oxido de Grafeno | 54 |
| 4.4.4. Nanobastões de Ouro (AuNBs)..... | 56 |
| 5. Materiais e Métodos | 60 |
| 5.1. Comitê de ética | 60 |
| 5.2. Materiais e Reagentes utilizados..... | 61 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.3. | Procedimento de limpeza..... | 62 |
| 5.4. | Substratos SERS ativos..... | 62 |
| 5.4.1. | Síntese fotoquímica de nanopartículas de ouro estabilizadas com PEI (AuNPs/PEI)..... | 62 |
| 5.4.2. | Síntese fotoquímica de nanopartículas de ouro estabilizadas com óxido de grafeno funcionalizado com poli(etileno imina) - (AuNPs/GO-PEI) | 63 |
| 5.4.3. | Síntese fotoquímica de nanobastões de ouro estabilizados com brometo de hexadeciltrimetilamônio (AuNBs) | 63 |
| 5.4.4. | Preparação das amostras para SERS | 64 |
| 5.4.5. | Coleta das impressões digitais e contaminação com COC..... | 64 |
| 5.4.6. | Instrumentação..... | 65 |
| 5.5. | Determinação do sexo..... | 66 |
| 5.5.1. | Coleta das impressões digitais e aquisição de dados para classificação do sexo | 66 |
| 5.5.2. | Obtenção dos Espectros Raman | 68 |
| 5.5.3. | Obtenção dos Espectros FTIR | 68 |
| 5.5.4. | Análises quimiométricas | 68 |
| 6. | Resultados e discussão | 72 |
| 6.1. | Detecção de substâncias exógenas em impressões digitais | 72 |
| 6.1.1. | Caracterização da cocaína | 72 |
| 6.1.2. | Caracterização dos substratos SERS ativos..... | 74 |
| 7. | Determinação do sexo a partir das impressões digitais utilizando espectroscopia vibracional e modelos quimiométricos..... | 97 |
| 7.1. | Modelos quimiométricos baseados em Microespectroscopia Raman | 97 |
| 7.1.1. | Avaliação da influência do tempo e armazenamento nos modelos quimiométricos | 97 |
| 7.2. | Modelo Raman com as médias das amostras..... | 107 |
| 7.3. | Modelos quimiométricos baseados em FTIR | 107 |
| 8. | Conclusões | 113 |
| 9. | Referências Bibliográficas | 115 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura da molécula de cocaína. Adaptada de [8]. | 3 |
| Figura 2 Representação esquemática do espectro na região do visível. Retirado de [59]. | 19 |
| Figura 3 Representação esquemática das transições eletrônicas envolvidas na UV-Vis. Adaptada de [59]. | 20 |
| Figura 4 Representação esquemática dos principais constituintes de um microscópio eletrônico de transmissão. Adaptada de [62]. | 21 |
| Figura 5 Representação esquemática dos componentes do Microscópio Eletrônico de Varredura. Adaptado de [62]. | 23 |
| Figura 6 Representação esquemática do experimento realizado por Raman, no início do século XX, onde foi possível a observar a coloração distinta entre a luz incidente no líquido e a luz espalhada. Retirado de [69]. | 24 |
| Figura 7 Representação do fenômeno de espalhamento de luz com os três tipos de radiações resultantes possíveis: espalhamento rayleigh espalhamento Stokes e espalhamento Anti-Stokes. Adaptado do de [74] | 26 |
| Figura 8 Esquemas dos mecanismos de espalhamento. Adaptada de [68]. | 27 |
| Figura 9 Representação esquemática dos espalhamentos Raman, Rayleigh e Raman ressonante, mostrando que para este último a perturbação pelo fóton incidente envolve o estado eletrônico excitado. Retirado de [77] | 29 |
| Figura 10. Representação esquemática do modelo do complexo de transferência de carga formado pela interação entre a Piridina (Py) e clusters de nanopartículas de prata (Ag). a) complexo de clusters de prata e piridina dispersos em gás inerte; b) complexo cluster de prata e piridina em eletrodo de prata. E_F , LDS, ρ , representam respectivamente o nível de Fermi da prata, a densidade local de estados, doadores e receptores de cargas. Retirada de [86] | 31 |
| Figura 11. Representação esquemática da oscilação da nuvem eletrônica (plasmon de superfície) de nanopartículas ao serem submetidas a um campo eletromagnético. Adaptada de [87]. | 32 |
| Figura 12. Representação esquemática da formação de dímeros com analito adsorvido e da região com maior intensidade do sinal Raman (cor vermelha da escala). Adaptado de [91] | 33 |
| Figura 13. Representação esquemática do mecanismo de absorção no Infravermelho. Adaptado de [59]. | 34 |
| Figura 14. Representação esquemática do interferômetro de Michelson de um FTIR, onde S é a fonte, A é abertura, F1 o espelho parabólico focal, BS o <i>beam splitter</i> , M1 o espelho fixo, M2 o espelho móvel, P o local da amostra, F2 espelho parabólico focal, D o detector e FFT o algoritmo de transformada de Fourier, x a distância do caminho óptico e $L = x_{\text{máximo}} = d_{\text{DMCO}} / 2$. DMCO = diferença máxima de caminho óptico. Adaptada de [92]. | 37 |
| Figura 15. Representação gráfica de uma isoterma de adsorção. Retirada de [93]. | 40 |
| Figura 16. Tendências das isotermas de adsorção. Retirada de [93]. | 40 |
| Figura 17. Indução de classificador em aprendizado supervisionado. Retirado de [101]. | 50 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Representação do algoritmo SVM que encontra o hiperplano que maximiza a maior distância mínima entre os vetores de apoio. Retirada de [104]..... | 51 |
| Figura 19. Representação esquemática da síntese fotoquímica de nanopartículas..... | 53 |
| Figura 20. Representação da fotólise do ácido tetracloroárico por radiação UV que leva à formação de núcleos metálicos e ao crescimento adicional das partículas. Retirado de [114]. | 53 |
| Figura 21. Estrutura do PEI. Retirado de [115]..... | 54 |
| Figura 22. Representação da estrutura de GO proposta por Lerf e Knowski. Na imagem acima, em duas dimensões, observa-se a presença de grupos de carboxila nas extremidades da estrutura, enquanto que, na imagem inferior, em três dimensões, é observada a presença de grupos oxigenados ao longo da estrutura [118]. | 56 |
| Figura 23– Espectros de absorção UV-Vis-NIR de suspensões de AuNPs e AuNRs com as bandas de absorção relacionadas ao plasmon de superfície transversal e ao plasmon de superfície longitudinal. Retirado de [124]. | 58 |
| Figura 24. Variação do comprimento de onda de absorção de acordo com a AR dos AuNBs. Retirado de [126]. | 59 |
| Figura 25. Imagem TEM de um AuNB orientado ao longo da direção [001], exibindo os planos cristalinos {100}, {111} e {110} do bastão (a) (retirado de [127]) e uma representação esquemática da do crescimento de um AuNB na direção axial [001] (b). | 59 |
| Figura 26. Representação esquemática da formação de AuNBs. Adaptado de [120]. ... | 60 |
| Figura 27. Imagem da câmara de reação com fonte de radiação UV com comprimento de onda em 254 nm e 16W..... | 62 |
| Figura 28. Espectro Raman da amostra de cristais de cloridrato de COC obtido com uma fonte de excitação em 785 nm e também utilizando a função de modo estendido do equipamento. | 72 |
| Figura 29. Espectro de absorção no UVvis para amostra de COC 1×10^{-7} M..... | 73 |
| Figura 30. Espectros SERS da R6G 1×10^{-6} mol/L pura e em diferentes condições no substrato AuNPs/PEI. | 74 |
| Figura 31. Espectro UV/Vis do AuNPs/GO-PEI, com máximo de absorção em 538,5 nm correspondente à banda LSPR da fase Au..... | 75 |
| Figura 32. Espectros SERS da R6G 1×10^{-6} mol/L pura e em diferentes condições no substrato AuNPs/GO-PEI. Foi utilizada uma objetiva de 50x. | 76 |
| Figura 33. Espectros SERS da COC 1×10^{-2} mol/L pura e em diferentes condições no substrato AuNPs/GO-PEI. Foi utilizada uma objetiva de 50x. | 77 |
| Figura 34. Representação fotográfica dos substratos SERS NB1, NB2, NB3 e NB4.... | 78 |
| Figura 35. Espectros SERS da R6G 5×10^{-8} mol/L adsorvida nos substratos SERS NB1, NB2, NB3 e NB4..... | 79 |
| Figura 36. Espectro de absorção experimental UV-Vis de uma amostra de NB3. A banda em 545 nm corresponde a LSPR _T , enquanto a centrada em 599 nm está relacionada a LSPR _L dos NBs presentes na amostra. | 80 |
| Figura 37. Espectro de absorção experimental UV-Vis de uma amostra de NB4. A banda em 526 nm corresponde a LSPR _T , enquanto a centrada em 617/581nm está relacionada a LSPR _L | 81 |

| | |
|--|----|
| Figura 38: Micrografias MET obtidas para os substratos NB3(a) e NB4(b)..... | 81 |
| Figura 39: Histogramas de distribuição do tamanho dos AuNBs pelo comprimento (a) e largura (b). | 82 |
| Figura 40. Micrografia do substrato SERS ativo de NB3(a) e NB4(b) por microscopia eletrônica de varredura. | 83 |
| Figura 41. Espectro EDS do substrato NB4. | 83 |
| Figura 42. Espectros SERS da R6G com substrato NB3 em diferentes concentrações (1×10^{-8} a 3×10^{-12} mol/L)..... | 84 |
| Figura 43. Isotermas de Langmuir para adsorção de R6G sobre o substrato NB3: (a) forma assintótica, (b) forma linear. | 85 |
| Figura 44. Isoterma de Frumkin para R6G adsorvida em NB3. | 86 |
| Figura 45. Representação linear da isoterma de Freundlich para a R6G adsorvida em NB3. | 87 |
| Figura 46. Espectros SERS da COC em pó e com substrato NB3 em diferentes concentrações (5×10^{-2} a 1×10^{-9} mol/L). | 89 |
| Figura 47. Isotermas de Langmuir para adsorção da COC em NB3: (a) representação assintótica, (b) representação linear..... | 90 |
| Figura 48. Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de COC adsorvida em NB3..... | 91 |
| Figura 49. Ajustes realizados pela isoterma de Freundlich para a adsorção da molécula de COC pelo sistema NB3. | 92 |
| Figura 50. Imagem de impressão digital dopada com solução de MA $5,0 \times 10^{-2}$ mol/L depositada sobre uma lâmina de Alumínio de 25×25 mm. | 93 |
| Figura 51. Espectros Raman, medido em 633 nm, da IDL masculina medido sem contaminação; contaminada com COC 1×10^{-2} mol/L; e com o substrato NB3 aplicado (a); Espectros SERS, medido em 633 nm, da IDL masculina contaminada com COC 5×10^{-2} mol/L, COC 8×10^{-3} mol/L e COC 6×10^{-4} mol/L e com o substrato NB3 aplicado; (b); Espectros Raman, medido em 633 nm, da IDL feminina sem contaminação; contaminada com COC 1×10^{-2} mol/L; e com o substrato NB3 aplicado (c); Espectros SERS, medido em 633 nm, da IDL feminina contaminada com COC 5×10^{-2} mol/L, COC 8×10^{-3} mol/L e COC 6×10^{-4} mol/L e com o substrato NB3 aplicado (d)..... | 94 |
| Figura 52. Espectros Raman, medido em 785 nm, da IDL masculina medido sem contaminação; contaminada com COC 1×10^{-2} mol/L; e com o substrato NB3 aplicado (a); Espectros SERS, medido em 785 nm, da IDL masculina contaminada com COC 5×10^{-2} mol/L, COC 8×10^{-3} mol/L e COC 6×10^{-4} mol/L e com o substrato NB3 aplicado(b); Espectros Raman, medido em 785 nm, da IDL feminina sem contaminação; contaminada com COC 1×10^{-2} mol/L; e com o substrato NB3 aplicado (c); Espectros SERS, medido em 785 nm, da IDL feminina contaminada com COC 5×10^{-2} mol/L, COC 8×10^{-3} mol/L e COC 6×10^{-4} mol/L e com o substrato NB3 aplicado (d)..... | 95 |
| Figura 53. Micrografia ótica de uma gota de óleo de impressão digital depositado em lâmina de vidro revestida de alumínio medida com sistema de microscópio Raman com ampliação de 50x. | 97 |

| | |
|---|-----|
| Figura 54. Espectros Raman obtidos de cada amostra de impressão digital, nas mesmas condições e sem nenhum tipo de pre-processamento do grupo feminino (a) e do grupo masculino (b)..... | 98 |
| Figura 55. (a) Comparação das médias dos espectro Raman feminino (vermelho) e o masculino (verde), com destaque para a região com maior variação das intensidades Raman entre o grupo feminino e o masculino; (b) Ampliação da região com maior variação de intensidades; (c) Vetor de projeções de maior importância (VIP) do modelo PLS-DA desenvolvido com o conjunto de dados D0 de treinamento. | 98 |
| Figura 56 Espectros Raman de impressões digitais armazenadas em ausência de luz e presença de luz. (a) e (c) para mulheres e (b) e (d) para homens. D0, D7 e D30 correspondem a amostras recém coletadas, após 7 dias e após 30 dias, respectivamente. | 101 |
| Figura 57. PCA de espectros femininos (vermelhos) e masculinos (verdes) obtido com três componentes principais. Cada ponto representa um espectro raman individual... | 102 |
| Figura 58. (a) <i>Hotelling</i> $T^2 \times$ Resíduos Q (b) valores de classe estimados para o grupo de treinamento D0 e para todos os grupos de teste do modelo 2 de PLS-DA (região de 1494-1768 cm^{-1}). (---) limite de confiança 99%, (\blacklozenge) grupo de treinamento feminino, (\blacksquare) grupo de treinamento masculino, (\blacktriangle) grupo de teste feminino (\blacktriangledown) grupo de teste masculino. | 103 |
| Figura 59. Espectros de FTIR pré-processados de amostras de IDL usadas no conjunto de treinamento (a); espectro médio de marcas de IDL das classes feminina (vermelha) e masculina (azul) (b); recorte dos espectros médios feminino e masculino de 1150 a 1800 cm^{-1} , onde a principal diferença espectral entre eles (1711 e 1743 cm^{-1}) é destacada (c). | 108 |
| Figura 60. Escores de projeção de importância vetorial (VIP) para o modelo PLS-DA desenvolvido com 14 variáveis latentes e os espectros FTIR completos. A área delimitada corresponde à região do espectro utilizada para o modelo PLS-DA..... | 110 |
| Figura 61. FTIR <i>Hotelling</i> $T^2 \times$ Resíduos Q (a); valores de classe para conjunto de treinamento D0 e todos os conjuntos de teste com o modelo PLS-DA desenvolvido com a região de 1494-1768 cm^{-1} . (---) 99% de limite de confiança, (\blacklozenge) grupo de treinamento feminino (TR feminino), (\square) grupo de treinamento masculino (TR masculino), (\blacklozenge) grupo de teste feminino (VAL feminino), (\blacksquare) grupo de teste masculino (VAL masculino) (b). | 111 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Testes colorimétricos para as principais drogas de abuso. Adaptado de [2]. | 2 |
| Tabela 2. Substâncias orgânicas e inorgânicas encontradas na mistura de secreções que formam o vestígio papiloscópico latente. Adaptado de [16]. | 5 |
| Tabela 3. Distribuição de testes definitivos em categorias. Adaptada de [46]. | 14 |
| Tabela 4. Representação da relação da quantidade de massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente e tendências das isotermas (adaptado de [95]). | 41 |
| Tabela 5. Perfil dos voluntários | 67 |
| Tabela 6. Número de homens e mulheres por dia nos grupos de teste D0, D7 e D30. ... | 69 |
| Tabela 7. Principais atribuições vibracionais para a molécula de COC [134]. | 73 |
| Tabela 9. Constantes de adsorção e demais parâmetros das isotermas para o sistema R6G/NB3. | 88 |
| Tabela 10. Constantes de adsorção e demais parâmetros das isotermas para o sistema COC/NB3. | 92 |
| Tabela 11. Atribuições vibracionais das bandas Raman observadas nas impressões digitais. | 99 |
| Tabela 12. Resultados obtidos pelos dois melhores modelos PLS-DA na separação das amostras femininas ($y=1$, positivo) das amostras masculinas ($y=0$, negativo) para o grupo de treino e grupos de teste. O número de variáveis latentes é indicado entre parênteses. | 105 |
| Tabela 13. Resultados obtidos pelos modelos SVM-DA para a separação das amostras femininas (positivo) e amostras masculinas (negativo) no grupo de treino e em todos os grupos de teste. | 106 |
| Tabela 14. Figuras de mérito para o modelo Raman PLS-DA. | 107 |
| Tabela 15. Principais bandas vibracionais obtidas de uma partícula no depósito de impressão digital [21], [150], [151] | 109 |
| Tabela 16. Figuras de mérito para o modelo FTIR PLS-DA. | 111 |

Lista de abreviaturas e siglas

- μ - IR – Microespectroscopia de Infravermelho
- μ - Raman - Microespectroscopia Raman
- AgNPs – Nanopartículas de prata
- ANN – Redes neurais artificiais
- AR – Razão de aspecto
- ASR - Sítios de rugosidade de escala atômica
- AuNB – Nanobastões de ouro
- AuNP/GO-PEI – Nanopartículas de ouro estabilizadas com óxido de grafeno funcionalizado com PEI
- AuNP/PEI – Nanopartículas de ouro estabilizadas com PEI
- AuNPs – Nanopartículas de ouro
- BPL - Boas práticas de laboratório
- BTEM – Rotação de minimização de entropia de alvo de banda
- CG-MS – Cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa
- CL-MS - Cromatografia líquida e espectrometria de massa
- COC – Cocaína
- CVCE – *Cross Validation Classification Error*
- DA – Análise discriminante
- DLS – Espalhamento dinâmico de luz
- DRX – Difração de Raio-X
- EDS - Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X
- EDS – Espectroscopia de energia dispersiva de Raios-X
- EFR – Resultado da taxa de eficiência
- EM - Mecanismo eletromagnético
- EMSC – *Extended Multiplicative Signal Correction*
- FN – Falso negativo
- FNR – Taxa de falso negativo
- FP – Falso positivo
- FPR – Taxa de falso positivo
- FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
- FTIR-ATR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada

FT-Raman - Espectroscopia Raman por transformada de Fourier
GA – Algoritmos genéricos
GDS – *Global Drug Survey*
GO – Óxido de grafeno
I – Indefinido
IDL - Impressões digitais latentes
IR – Infravermelho
LOD – Limite de detecção
LSD - Dietilamida do ácido lisérgico
LSPR - Efeito plasmônico ou efeito de ressonância de plasmons de superfície localizado
LSPR_L – Plasmon de superfície longitudinal
LSPR_T – Plasmon de superfície transversal
MDMA – 3,4 - metilenodioximetanfetamina (ecstasy)
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
NB - Nanobastão
NP – Nanopartícula
ONU – Organizações das Nações Unidas
PCA – Análise de componentes principais
PEI – Poli(etileno imina)
PLS-DA – Método dos mínimos quadrados parciais por análise discriminante
QM - Mecanismo molecular ou químico
R6G – Rodamina 6G.
RBF – Função de base radial
RDX - Hexahidro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazina
RMNH¹ – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMSECV – *Root Mean Square Error of Cross Validation*
ROC - *Receiver Operating Characteristic*
ROC / AUC - *Receiver Operating Characteristic / Area under the curve*
SAM - *Spectral Angle Mapper*
SEN/TPR - Sensibilidade/Taxa de verdadeiro positivo
SERS – *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*
SMD – Detecção de uma única molécula
SMD - *Single Molecule Detection*

SPEC/TN – Especificidade/Taxa de verdadeiro negativo

SVD – Método de decomposição de valores singulares

SVM – Máquina de vetor de suporte

SVM-DA – Máquina de vetor de suporte por análise discriminante

SWGDRUG – Grupo de trabalho científico para análise de drogas apreendidas

TN – Verdadeiro negativo

TP – Verdadeira positivo

UNODC – Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime

UV-Vis – Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível

VIP - Escores de projeção de importância vetorial

1. Introdução

O início do controle internacional sobre narcóticos e substâncias psicotrópicas se deu em 1909, com a realização da Comissão de Ópio de Xangai, motivada pelo elevado consumo de ópio, na época. Estudo publicado pelo Escritório das Nações Unidas sobre Drogas e Crime - UNODC, em 2016, indicou que o combate ao uso indevido do ópio possibilitou que a produção dessa substância fosse reduzida em 70 % e o seu consumo em 13 vezes. Essa conclusão foi baseada na projeção do crescimento do consumo acompanhando o aumento populacional do planeta [1].

A identificação de drogas ilícitas tem se tornado um grande desafio para as forças de segurança. Dentre as razões para isso, destaca-se a variedade de novas substâncias que são produzidas a cada dia, o que fragiliza as metodologias tradicionais de testes preliminares, sujeitas a falsos positivos [2].

A Tabela 1 demonstra as principais substâncias ilícitas apreendidas durante a rotina policial, os testes de rotina e os problemas apontados quanto à obtenção de resultados falsos positivos nestes testes preliminares.

Tabela 1. Testes colorimétricos para as principais drogas de abuso. Adaptado de [2].

| Droga ou grupo de drogas | Teste | Resultado | Interferente(s) | Falso(s) positivo(s) |
|------------------------------------|-----------------------|--|---|-------------------------------------|
| Cocaína | Scott modificado | Cor azul indica presença de cocaína | Compostos metálicos, como sais de ferro | Heroína, metadona, lidocaína |
| Maconha e derivados | Fast blue | Cor avermelhada indica canabíoides | Idade da amostra | Patchouli e alguns óleos essenciais |
| | Duquenois Levine (DL) | Violeta na camada inferior (clorofórmica) indica presença de canabíoides | Idade da amostra | Patchouli e alguns óleos essenciais |
| MDMA | Simon | Cor azul escuro intenso indica MDMA | Substâncias usadas como adulterantes | Certos medicamentos |
| | Marquis | Cor negra ou púrpura indica MDMA ou MDA | Não identificados | Não identificados |
| Afetaminas / Metanfetaminas | Simon | Cor azul escuro | Não identificados | Não identificados |
| | Marquis | Cor laranja que tende para marrom e indica a presença de Anfetamina ou metanfetamina | Não identificados | Não identificados |
| Opio / Morfina / Codeína / Heroína | Marquis | Cor violeta a púrpura avermelhada indica a presença de opiáceos | Não identificados | Não identificados |
| LSD | Ehrlich | Cor violeta que aparece após alguns minutos indica a presença de LSD | Não identificados | Diidro-LSD |
| Benzoazepínicos | Zimmerman | Cor púrpura avermelhada ou rosa indica a presença de benzodiazepínicos | Não identificados | Não identificados |
| Barbitúricos | Dille-Koppanyi | Cor púrpura avermelhada ou rosa indica a presença de barbitúricos | Não identificados | Não identificados |
| Cloreto de etila (lança perfume) | Teste de chama | Ao queimar produz uma chama verde | Não identificados | Alguns organoclorados |
| | Teste para cloretos | Resíduo das chamas produz sólido branco floculento, indicativo para cloretos | Não identificados | Alguns organoclorados |

Estudos apontam uma estabilização do consumo de drogas ilícitas tradicionais, como a maconha e a cocaína e um aumento do consumo de drogas sintéticas, que foram incluídas na lista de preocupações das autoridades públicas que lidam com o problema [1][3]. Uma vez que os métodos de rastreio e de controle dessas substâncias possuem limitações, dentro do sistema internacional de combate às drogas, há um aumento na dificuldade para as conclusões técnicas acerca da identificação dessas substâncias [4][5].

Dentre as drogas ilícitas mais usadas no mundo, durante o ano de 2018, destacam-se: a maconha, o ecstasy (MDMA), a cocaína, as anfetaminas, os cogumelos e o ácido lisérgico (LSD), conforme relatório apresentado pela companhia de pesquisa independente *Global Drug Survey* (GDS) [6].

Além da produção e consumo de drogas, outro problema preocupante é a relação existente entre a prática criminosa e o uso dessas substâncias, uma vez que, alguns usuários de drogas utilizam-se de delitos como roubo, furto e o tráfico de drogas, visando ganhos financeiros imediatos para sustentar o vício [7].

Como parte deste estudo foi selecionada, como representante das substâncias de maior consumo no mundo, a cocaína (Figura 1).

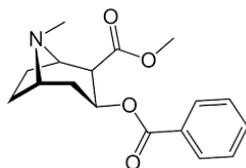


Figura 1. Estrutura da molécula de cocaína. Adaptada de [8].

A cocaína pertence ao grupo dos alcaloides, que são compostos orgânicos que contêm um nitrogênio ligado ao anel heterocíclico, que confere a estas substâncias um caráter básico. Este psicotrópico possui efeitos analgésicos. Seu consumo entre a população de 15 a 64 anos tem se concentrado nas Américas, Oceania e Europa, sendo a América do Sul considerada como principal ponto de distribuição para América do Norte, Europa Central e Ocidental [1].

Assim, não obstante a identificação da substância, a ligação entre o delinquente, o delito e o uso ou manipulação de alguma droga pode ser relevante para uma investigação, seja para a compreensão inequívoca da motivação do crime, seja pela

correta dosimetria ou isenção da pena ao final do processo da persecução penal [9] [10] [11].

Os produtos da transformação da COC, que ocorre no organismo humano após o seu consumo e podem ser identificados no suor humano em pequenas quantidades, que possuem relação com a dose de consumo, uma vez que não se difundem tão bem quanto a COC. Dentre os metabólitos, destacam-se a ecgonina metilester, a benzoilecgnina e cocaetileno. Esta última gerada se há consumo simultâneo de bebida alcoólica [12].

O principal mecanismo de aparecimento da droga no suor se dá através da difusão passiva do sangue e sua eliminação é prioritariamente pela urina, sendo portanto o suor considerado uma via secundária de excreção, com proporção de menos de 10% dos produtos da biotransformação [12].

Na urina, consumos de 50 mg de cocaína, resultam em cerca de 300 ng/mL de benzoilecgnina, já no suor os estudos apontam a dificuldade no estabelecimento de uma relação dose-concentração, devido a grande variabilidade intra e inter-indivíduos [12].

1.1. Vestígios Papiloscópicos

Um dos principais métodos de identificação de um indivíduo é baseado na análise das impressões digitais, que são os desenhos formados nas polpas digitais pelas papilas dérmicas. Esses desenhos possuem configuração aleatória, ou seja, são únicos para cada indivíduo, de acordo com as condições encontradas no processo de desenvolvimento embrionário [13]. Assim, as impressões digitais são eficazes para a individualização de alguém e tem sido usadas na área forense para essa finalidade, há mais de 100 anos, quando foi possível estabelecer a autoria de um crime de assassinato, pela primeira vez, utilizando os desenhos digitais, por Juan Vucetich, na Argentina, em 1892 [14][15].

O vestígio papiloscópico é composto por uma mistura de secreções (suor e sebo – substâncias endógenas) com substâncias advindas do meio externo (substâncias exógenas). Os lipídeos encontrados com frequência nas impressões digitais são oriundos das glândulas sebáceas, espalhadas ao longo do corpo, com exceção das palmas das mãos e dos pés. O suor é expelido pelas glândulas apócrinas e écrinas e realiza importante função de resfriamento do corpo. As glândulas écrinas são as únicas encontradas no tecido tegumentar das impressões digitais. Substâncias inorgânicas e orgânicas (como metabólitos de drogas) estão contidos em concentrações variadas no suor conforme apresentado na Tabela 2 [16] [17].

Tabela 2. Substâncias orgânicas e inorgânicas encontradas na mistura de secreções que formam o vestígio papiloscópico latente. Adaptado de [16].

| Fonte | Constituintes inorgânicos | Constituintes Orgânicos |
|---------------------|---|-------------------------------|
| Glândulas Écrinas | Cloretos | Aminoácidos |
| | Íons metálicos (Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺) | Proteínas |
| | | Ureia |
| | Sulfatos | Ácido Úrico |
| | Fosfatos | Ácido Lático |
| | Amônia | Açúcares |
| | Água (>98%) | Creatina |
| Glândulas Apócrinas | Ferro | Proteínas |
| | Água (>98%) | Carboidratos |
| Glândulas Sebáceas | | Glicerídeos (30-40%) |
| | | Ácidos Graxos Livres (15-25%) |
| | | Ésteres (20-25%) |
| | | Óleos (10-12%) |
| | | Ésteres de esteróis (2-3%) |
| | Esteróis (1-3%) | |

Assim, alguns trabalhos relacionados a este campo de atuação forense avançaram no sentido de coletar, das impressões digitais latentes (IDLs), informações químicas ou biológicas, como resíduos de drogas, explosivos, material genético ou outro tipo de substância conexa com a prática criminosa, o que pode orientar substancialmente a condução de uma investigação, estabelecendo outros elos de ligação entre o criminoso e o crime, que podem ser muito importantes para uma investigação policial [18][19].

Desta forma, a utilização de métodos instrumentais de análise surge como uma abordagem com grande potencial para aplicação na identificação de resíduos de substâncias em IDL ou outros objetos encontrados em cenas de crime, uma vez que essas técnicas apresentam elevada sensibilidade e, em geral, requerem uma pequena quantidade de amostra, preservando, em algumas situações, sua integridade.

1.2. Obtenção de evidências associadas às IDLs

Nas últimas décadas alguns métodos foram desenvolvidos com o objetivo de coletar evidências associadas às impressões digitais, como sexo, idade e substâncias manipuladas ou consumidas. A Interpol, em artigo recente, faz uma revisão dos artigos relacionados a impressões digitais, publicados no período de 2016 a 2019 [20].

Equipe do Quântico do FBI, utilizou a Microespectroscopia de Infravermelho (μ - IR) para compreender a composição química das impressões digitais de adultos e de crianças, motivados pela necessidade de esclarecer casos de rapto. Métodos cromatográficos foram usados por outros grupos para estudar a composição química das secreções cutâneas de crianças e adultos, mas implicam na destruição da amostra. Por outro lado a μ - IR analisa componentes químicos específicos em resíduos de IDLs, sem qualquer preparação adicional após a coleta, é não destrutível e possibilita a formação de imagens químicas. Nestes estudos, mesmo com uma pequena quantidade de material nas impressões digitais, foi possível analisar o material écrino e sebáceo e realizar um estudo em função do tempo e temperatura. Foi observada diferença na proporção relativa de compostos nas cristas de IDLs entre adultos e crianças. O principal componente encontrado nas IDLs das crianças foi um sal ácido, confirmado por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa - CG-MS como sal de sódio do ácido láctico. Embora os estudos das diferenças em função do sexo e da origem étnica não fossem o foco deste estudo, observou-se que o sexo e a etnia desempenham papel na quantidade de resíduos depositados. Os autores afirmam ser um método promissor para a distinguir impressões digitais de adultos e de crianças [21] [22].

Chen e colaboradores utilizaram imagens espectroscópicas no infravermelho e ferramentas estatísticas para distinguir IDLs sobrepostas de digitais contaminadas com o explosivo hexahidro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazina (RDX). A análise foi realizada através da reconstrução de imagens químicas baseadas no modo vibracional de deformação do NO_2 . Métodos de decomposição de valores singulares (SVD), Rotação de Minimização de Entropia de Alvo de Banda BTEM e/ou análise de componentes principais (PCA) foram as ferramentas quimiométricas utilizadas. O limite de detecção foi 0,1 ng / pixel. Mesmo após a lavagem das mãos foi possível observar resíduos do explosivo [23].

Figuroa e colaboradores utilizaram o espalhamento Raman estimulado para determinar KNO_3 e ácido benzoico em cristas papilares. Estes autores também fizeram uso das bandas vibracionais de lipídeos e proteínas (em 2850 e 2930 cm^{-1} , respectivamente) como referência para a realização do imageamento químico da

impressão digital revelada com pó comum em diferentes superfícies, como lâminas de vidro e de aço. Neste trabalho os autores utilizaram as substâncias em pó para contaminar as impressões digitais [24].

Ng e colaboradores desenvolveram um estudo no qual uma IDL foi contaminada com poucos miligramas de aspirina, cafeína e dizeepam e foi utilizada a espectroscopia Raman para obter o imageamento químico, utilizando como referência os lipídeos e proteínas (banda em 2930 cm^{-1}) e algumas bandas vibracionais de referência de cada uma destas substâncias. Foi possível diferenciar as substâncias exógenas nas cristas papilares a partir do uso do algoritmo Spectral Angle Mapper (SAM) como método automático de comparação direta de imagens espectrais por meio de pré-processamentos específicos [25].

Um método combinando cromatografia líquida e espectrometria de massa (CL-MS) para determinação de metanfetamina e seu principal metabólito em IDL foi desenvolvido por Zhang e colaboradores. O limite de detecção foi de 1,5 ng e o limite de quantificação de 5,0 ng por cotonete utilizado para coleta. Os valores médios de recuperação foram superiores a 70,1%. Também foram detalhados os fatores de influência para a detecção da droga em IDLs, como tipos de substratos, métodos de desenvolvimento e métodos de extração. Os resultados mostraram a obtenção de boas relações de recuperação em superfícies de madeira pintada e substratos lisos. Os resultados também indicaram que o método mencionado poderia ser aplicado na análise de evidências coletadas em vestígios forenses [19].

Apesar da técnica descrita acima demonstrar potencial de aplicação na identificação de drogas e seus metabólitos em IDL, a evidência probatória é destruída. Entretanto, a prática forense recomenda que as evidências sejam preservadas o tanto quanto possível. Portanto, métodos de análise não destrutivos, que podem ser aplicados diretamente ao vestígio, preservando sua integridade, são os mais adequados. A adoção de uma abordagem não destrutiva significa permitir que outros tipos de exames sejam realizados sobre um mesmo vestígio. Neste sentido, a espectroscopia Raman, por ser uma técnica não destrutiva, despontou com uma ferramenta poderosa para a ciência forense [26].

Uma metodologia qualitativa para a detecção de drogas de abuso em impressões digitais foi desenvolvida por Day e colaboradores. Foram utilizadas 5 (cinco) drogas: fosfato de codeína, hidrocloreto de cocaína, sulfato de anfetamina, barbital e nitrazepam, além de 5 (cinco) substâncias não controladas cujas aparências são similares

às das drogas escolhidas: cafeína, aspirina, paracetamol, amido e talco. Após um processo de dopagem dos dedos com uma quantidade não especificada de pó de cada substância depositado em uma lâmina de aço, as impressões digitais ricas em suor e oleosas (processos diferentes de preparação) foram depositadas também em lâminas de aço e avaliadas por microespectroscopia Raman (μ - Raman), utilizando um laser com emissão em 632,8 nm. Como resultado obtido, todos os analitos foram detectados nas impressões ricas em suor e oleosas [27].

West e Went (2008) identificaram ecstasy, cocaína, ketamina e anfetamina em impressões digitais por meio da μ - Raman. Eles estudaram 70 impressões digitais dopadas com estes entorpecentes, obtidas pressionando os dedos polegares em lâminas de vidro preparadas com cada uma das substâncias (3 a 8 μ g da droga). Em seguida, os dedos polegar e indicador foram esfregados e a impressão digital foi coletada em uma lâmina de vidro limpa. A impressão digital foi revelada e removida com fita adesiva e obtido o espectro Raman. Cabe destacar que, neste trabalho, os sinais Raman obtidos foram de microcristais das drogas com dimensões de 10 a 40 μ m, perfeitamente visíveis pelo microscópio ao se usar uma objetiva de 50 \times [28].

Apesar de ser uma técnica considerada não destrutiva, a seção de choque para o espalhamento Raman é significativamente menor do que a da espectroscopia de absorção no IV, limitando sua aplicação na detecção de analitos em baixas concentrações. Com o surgimento do espalhamento Raman intensificado por superfícies (conhecido como efeito SERS – *surface-enhanced Raman scattering*), a aplicação da espectroscopia Raman como ferramenta analítica ganhou novo impulso, chegando ao ponto de se conseguir sensibilidade para detecção de uma única molécula (SMD) [29].

A imensa maioria dos trabalhos sobre o efeito SERS envolve moléculas adsorvidas em superfícies nanoestruturadas de metais como Ag, Au e Cu [26][29]. Partículas desses metais com dimensões nanométricas apresentam *plasmons* de superfície que podem ser excitados por radiação eletromagnética na região do visível ao infravermelho próximo e que dão origem a intensificações da ordem de 10^5 a 10^{12} para sinal Raman de moléculas adsorvidas nesses metais [29]. Essas características do efeito SERS têm despertado o interesse dos pesquisadores da área forense.

Utilizando um equipamento Raman portátil, Yang e colaboradores estudaram uma metodologia de otimização do efeito SERS empregando nanopartículas de ouro (AuNPs) com propriedades magnéticas para detectar traços de droga em saliva e em impressões digitais. A substância objeto de estudo foi a cotinina, principal metabolito da nicotina.

Foi utilizado laser de He-Ne como fonte de excitação (632,8 nm). As AuNPs adquiriram propriedades magnéticas na presença de inositol hexakisfosfato. O método demonstrou um LOD de 8,8 ppb para a cotinina em saliva e $1,0 \times 10^{-7}$ mol/L (1,76 mol/mL) em impressão digital [30].

Gong e colaboradores desenvolveram método que envolve a utilização de swabs recobertos com nanopartículas de prata para a detecção de traços de explosivos (2,4 - DNT) recolhidos de impressões digitais. A técnica pode ser empregada na triagem de passageiros em aeroportos. O LOD *in vitro* foi de 5 ng/cm^2 ($\pm 1,2 \text{ ng/cm}^2$), 2 ordens de magnitude mais sensíveis do que o relatado na literatura por espectroscopia Raman. Foi utilizado laser de He-Ne como fonte de excitação (632,8 nm) O limite de detecção na impressão digital não foi informado [31].

Leonard e colaboradores utilizaram espectroscopia Raman e SERS para identificação de fentanil e carfentanil. Foram utilizadas nanopartículas de prata para intensificação do sinal. O fator de identificação obtido foi de $1,6 \times 10^5$. Os autores compararam os espectro teórico obtido pela teoria de densidade funcional (DFT) com os obtidos experimentalmente [32].

Em estudo recente, o autor desta tese e colaboradores, utilizaram o efeito SERS para detectar metanfetamina em impressões digitais, antes e depois da revelação com pó preto. A metodologia foi baseada no uso de um substrato SERS ativo, formado por um filme de nanopartículas de prata dispersas em gel de agarose, depositado em lâmina de alumínio. Após registro da impressão digital contaminada com a droga, foi possível detectar metanfetamina em quantidades abaixo de 200 μg , antes e depois da revelação da digital. Os espectros SERS em diferentes locais da impressão mostraram sinais relativamente significativos da metanfetamina adsorvida, apesar de ocorrer uma atenuação do sinal da metanfetamina após revelação da impressão digital. A metodologia desenvolvida é promissora para ser aplicada na detecção de outras drogas ou outras substâncias de interesse forense [33].

A identificação do gênero a partir de resíduos de impressões digitais foi proposta por Huynh e colaboradores. Os autores destacam a possibilidade do uso de compostos endógenos da impressão digital para a determinação de diversos atributos pessoais. Destacam ainda que a maior parte dos métodos foca na presença ou na ausência de algum composto químico. Uma vez que a impressão digital contém componentes análogos aos fluidos corporais, também podem ser utilizadas para a obtenção das informações retiradas deste tipo de vestígio. Neste estudo foi proposta uma metodologia baseada na afinidade

entre uma enzima e seu ligante que proporcione uma coloração visível a olho nu, ou espectroscopicamente quantificável por métodos de absorção associados a ferramentas estatísticas. As análises *Receiver Operating Characteristic* (ROC) foram realizadas utilizando 50 impressões digitais simuladas com a obtenção de 99% de probabilidade da determinação do sexo correto. Foi estabelecido um protocolo para coleta de amostras reais de voluntários caucasianos, homens e mulheres. As IDLs foram depositadas em um filme de polietileno e acidificadas. Para a separação do grupo amina dos componentes lipídicos foi feito o aquecimento do substrato, sendo, portanto, necessário um pré-tratamento da amostra que inutiliza o vestígio [34].

Em outro artigo, Brunelle e colaboradores utilizam a ninidrina para a determinação colorimétrica do gênero por meio de impressões digitais. O estudo é baseado no conceito de que é possível diferenciar o gênero utilizando as concentrações dos aminoácidos presentes nas impressões digitais, uma vez que as mulheres apresentam quase o dobro destas substâncias, comparado à concentração observada nas impressões digitais dos homens. Foram criados, randomicamente, padrões de aminoácidos, sendo 25 representando mulheres e 25 para homens. O ensaio químico emprega a ninidrina, composto tradicionalmente utilizado para revelação de IDLs. A ninidrina reage com o aminoácido formando um composto de cor púrpura denominado de púrpura de Ruhemann. Os resultados obtidos a partir dos modelos estatísticos *Receiver Operating Characteristic / Area under the curve* (ROC / AUC) demonstraram que é possível a determinação do gênero correto em 94% das impressões digitais simuladas. Nas impressões digitais autênticas foi observado 91% de acurácia na identificação do gênero. Contudo, o método requer uma etapa de revelação da impressão digital com a ninidrina. [35].

Carvalho e colaboradores utilizam a densidade de linhas distal e proximal das impressões digitais de brasileiros para a determinação do sexo de 200 voluntários, considerando uma área de 25mm^2 para a contagem de linhas. Segundo o autor, os resultados para a área distal se destacam na distinção do sexo. O estudo indica que uma impressão digital com 14 linhas/ 25mm^2 tem cerca de 92% de probabilidade de pertencer a um homem e, se possuir mais de 20 linhas/ 25mm^2 tem 100% de probabilidade do indivíduo ser mulher. Observou-se um limiar de separação dos sexos entre 16 a 17 linhas, com cerca de 60% de classificação correta [36].

1.3. A espectroscopia vibracional e outras possíveis aplicações forenses

Apesar do DNA e da impressão digital serem evidências que podem fornecer a identificação de uma pessoa, para tanto, é necessário recorrer a informações de referência contidas em bancos de dados. Assim, na impossibilidade de uma identificação, podem ser extremamente relevantes para a investigação outras informações que sejam obtidas a partir das evidências, tais como características fenotípicas do indivíduo, como a cor dos olhos, raça ou gênero, que ajudariam a restringir a busca por suspeitos ou vítimas. Tradicionalmente, o DNA e técnicas cromossômicas foram relatadas para a classificação do gênero [37][38].

Alguns estudos apontam para a utilização de espectroscopia Raman na obtenção de informações sobre o gênero do indivíduo, a partir de vestígios forenses como pedaços de unha, saliva e sangue [37][38][39].

Neste sentido, foi proposta por Widjaja e colaboradores a utilização desta técnica para detectar diferenças na estrutura molecular de unhas de homens e de mulheres. Essas diferenças são extremamente discretas e para serem encontradas foram necessárias a combinação do algoritmo PCA e Máquina de Vetor de Suporte (SVM). Os autores destacam este método como uma alternativa rápida de classificação de gênero em análises forenses. A região espectral de aquisição concentrou-se na faixa entre 400 e 1800 cm^{-1} . Foram usadas 80 amostras fornecidas por 40 doadores, sendo metade homens e a outra metade mulheres. A idade dos doadores variou entre 24 e 50 anos. Um protocolo preliminar, antes das unhas serem cortadas, de aplicação de acetona foi realizado visando retirar contaminantes. Os espectros Raman foram excitados com uma fonte de radiação em 785 nm. O estudo mostrou que a associação da espectroscopia Raman com calibração multivariada pode ser extremamente promissora para o desenvolvimento de métodos de classificação de gêneros. O método proposto é relativamente rápido e simples e demonstrou acurácia maior do que 90% [37].

Muro e colaboradores citam diversos estudos com a extração de DNA para determinar o sexo a partir de sangue, suor e saliva. O autor afirma que, embora os resultados desses estudos sejam promissores, seus métodos requerem o consumo de amostra e, em análises forenses, a destruição de amostras deve ser evitada sempre que possível. Assim, os autores propõem uma nova metodologia baseada em espectroscopia Raman para a determinação de gênero a partir de amostras de saliva de uma população de 60 doadores selecionada baseada no sexo, raça e idade. Homens e mulheres foram equitativamente representados, bem como os indivíduos caucasianos, negros e

hispânicos. A faixa de idade variou entre 19 e 73 anos. Foi utilizada radiação de excitação em 785 nm. Os espectros foram coletados na faixa entre 400 a 1700 cm^{-1} . A análise dos dados foi feita utilizando, aleatoriamente, 20% dos doadores para validação e 80% para calibração. Nos espectros obtidos não foi possível observar diferenças entre os hormônios sexo-dependentes como estrogênio, progesterona, testosterona e deidroepiandrosterona, que, conhecidamente, variam em concentração. Os autores afirmam que, provavelmente, isso se deve à pequena contribuição para o espectro Raman da saliva, que é dominado por aminoácidos e hormônios peptídeos. Assim, foi obtido um modelo para diferenciação do sexo a partir do espectro Raman de amostras de saliva, baseado em máquina de vetor de suporte por análise discriminante (SVM-DA). Os resultados demonstraram que o sexo de 45 dos 48 doadores usados na calibração foi identificado corretamente (94%). Na validação externa, foi determinado corretamente 11 dos 12 doadores (92%) [38].

Outro estudo aborda a determinação de gênero pela espectroscopia Raman a partir de gotas de sangue. Sikirzhyskaya e colaboradores desenvolveram um trabalho que compara a utilização de SVM e redes neurais artificiais (ANN) associados aos dados espectroscópicos para essa determinação. Foram utilizadas gotas de sangue de 60 doadores, 30 homens e 30 mulheres. A fonte de radiação utilizada neste trabalho foi a de 785 nm e região espectral de 300 a 3200 cm^{-1} . A região utilizada para as análises centrava-se em 625 a 1730 cm^{-1} . Ao utilizarem algoritmos genéricos (GA) associados à classificação ANN foi obtido 98% de acurácia na diferenciação de gênero no grupo de calibração e 60% no grupo de teste, o que demonstrou o grande potencial da técnica para fins forenses [39].

Recentemente Sharma e colaboradores utilizaram espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR), juntamente com métodos de PCA e mínimos quadrados parciais por análise discriminante (PLS-DA) para classificar e prever o sexo de indivíduos a partir de amostras de unhas. A taxa de classificação foi de 100% e 90% para mulheres e homens, respectivamente [40].

Outro estudo realizado por Bel'skaya e colaboradores demonstrou que é possível estabelecer diferenças estatisticamente significativas entre os grupos masculino e feminino, ao analisar as bandas de absorção de proteínas e lipídios em amostras de saliva por espectrometria de infravermelho (IR). Os autores demonstraram que a absorbância das bandas atribuídas a proteínas e ácidos nucleicos é maior para os homens, enquanto a absorbância das bandas atribuídas aos lipídios é maior para as mulheres [41].

2. Justificativa

2.1. Determinação de substâncias ilícitas em impressões digitais.

No âmbito internacional, existem três convenções vigentes promovidas pelas Organizações das Nações Unidas (ONU), que balizam as legislações dos países signatários, incluindo o Brasil, acerca do combate às substâncias ilícitas, quais sejam [42]:

- i. Convenção Única sobre Entorpecentes, 1961 (emendada em 1972);
- ii. Convenção sobre Substâncias Psicotrópicas, 1971; e
- iii. Convenção Contra o Tráfico Ilícito de Entorpecentes e Substâncias

Psicotrópicas, 1988.

A Lei nº 11.343, de 23 de agosto de 2006, que institui o Sistema Nacional de Políticas Públicas sobre Drogas traz em seu Art. 48, relativo ao procedimento penal, os exames de corpo de delito, como competência da polícia judiciária, quando a conduta criminosa se enquadrar às práticas descritas nos Arts. 33 a 37. [43]

Nos Estados Unidos, o Escritório de Ciência e Tecnologia do Instituto Nacional de Justiça, órgão pertencente ao Departamento de Justiça daquele país, criou o Programa de Padrões e Testes de Cumprimento da Lei e Correções, visando auxiliar as agências pertencentes ao sistema de justiça norte americanas, no que se refere à padronização de procedimentos e resultados acerca da investigação criminal. Assim, foi elaborado o documento nº 0604.01, que estabelece os protocolos de utilização de reagentes de teste de cor para a identificação preliminar de drogas de abuso (kits de identificação). Neste documento são encontradas informações sobre a positivação, falsos positivos, limites de detecção e a relação de substâncias que promovem resultados com cores próximas ou iguais, após a aplicação dos testes [44].

Contudo, tornou-se necessário o aprimoramento das metodologias existentes para processar as amostras mais rapidamente e com maior precisão, em virtude do crescimento da diversidade de substâncias ilícitas produzidas e utilizadas.

Nesse sentido e, observado o caráter internacional do tráfico de drogas, existe ainda a necessidade da troca de informações entre autoridades em nível regional, nacional e internacional. Assim, o UNODC elaborou um programa de harmonização recomendando os métodos mais apropriados a serem usados em testes de identificação de drogas para laboratórios nacionais, e ainda, um Exercício Colaborativo Internacional – ICE, onde amostras são fornecidas para análise e, após a obtenção dos resultados, estes podem ser comparados [45]. Os manuais elaborados a partir deste programa apresentam uma certa flexibilização. Logo, as metodologias selecionadas podem sofrer adaptações a

dependem do tipo de droga, da disponibilidade de instrumentação e materiais adequados e, até mesmo a obediência à legislação local. Apesar da possibilidade de adaptação das metodologias propostas, as boas práticas de laboratórios (BPL) preconizam que o reconhecimento de substâncias ilícitas deve ser realizado mediante testes preliminares e, posteriormente, exames confirmatórios, ou seja, após a indicação de uma determinada substância ilícita, faz-se necessário a confirmação do resultado por meio de métodos analíticos mais acurados.

O Grupo de Trabalho Científico para Análise de Drogas Apreendidas-SWGDRUG é um organismo que trabalha para aprimorar a qualidade de testes de drogas, estabelecendo padrões mínimos aceitos internacionalmente e separa as metodologias conforme sua capacidade de determinação como mostrado na Tabela 3 [46].

Tabela 3. Distribuição de testes definitivos em categorias. Adaptada de [46].

| Categoria A | Categoria B | Categoria C |
|-------------------------------|---|--|
| Infravermelho | Eletroforese Capilar | Testes de cor e precipitação |
| Espectrometria de Massa | Cromatografia Gasosa | Espectroscopia de Fluorescência |
| Ressonância Magnética Nuclear | Espectrometria de Mobilidade de Íons | Imunoensaios |
| Espectroscopia Raman | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência | Propriedades Físicas e Físico Químicas |
| Difratometria de Raio X | Microcristalização | Espectroscopia Ultravioleta Visível |
| | Marcadores Farmacológicos | |
| | Cromatografia de Camada Delgada | |
| | Exame botânico morfológico (apenas para Cannabis) | |

Desta forma, um teste realizado por qualquer método da categoria A deve ser confirmado por meio de teste por outro método em qualquer categoria (A, B ou C). Para testes realizados por métodos das categorias B ou C, devem ser feitos 3 (três) testes, sendo dois deles por métodos contidos na categoria B [2].

Entretanto, como os entorpecentes são misturas de substâncias químicas, na fase de testes preliminares, a identidade de uma determinada droga pode não ser confirmada, ou ainda, uma substância que não seja ilícita pode ser apontada como tal.

Uma alternativa para suprir essa deficiência dos testes preliminares pode ser o investimento em estudos de técnicas analíticas, com foco nas metodologias que permitem portabilização, visando a identificação de drogas ou de alguma outra substância de

interesse em uma investigação *in loco* [47][48][49][50]. Incentivos nesse sentido têm sido dado para o desenvolvimento de práticas forenses da polícia norte americana, desde 1999, quando o Departamento de Justiça norte americano, baseado em casos sem respostas pela polícia, instituiu a política de desenvolvimento de novas metodologias forenses, visando o aprimoramento das investigações [51]. Seguindo essa mesma linha, o Ministério da Justiça e Segurança Pública em parceria com o Ministério da Educação do Brasil lançaram, no dia 8 de janeiro de 2020, o Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (Procad) em Segurança Pública e Ciências Forenses onde serão investidos R\$ 10,1 milhões para estudos de mestrado, doutorado e pós-doutorado na área [52].

Um exemplo de como incentivos em pesquisas acadêmicas podem contribuir nas inovações forenses é um equipamento portátil, que funciona sob fundamentos de fluorescência, idealizado pelo Professor Doutor David Russell, da Escola de Química da Universidade East Anglia, no Reino Unido, vinculado a empresa *Intelligent Fingerprinting Ltd.*, que produz esse equipamento capaz de identificar 8 tipos de drogas (anfetaminas, benzodiazepinas, maconha, cocaína, metanfetaminas, opiáceos, metadona e cetamina) a concentrações muito baixas em impressões digitais [53]. O Departamento de Trânsito da cidade de Brasília-DF tem realizado testes com esse aparelho em impressões digitais de condutores submetidos à averiguação [54].

Apesar dos avanços já observados, no que se refere à identificação de substâncias ilícitas e seus metabólitos em impressões digitais, o desenvolvimento de novas metodologias que permitam uma análise com maior acurácia e precisão, assim como sua determinação quantitativa e a possibilidade de recuperação de impressões digitais por imageamento químico continuam sendo um desafio [55].

Os recentes avanços obtidos por meio do emprego da espectroscopia Raman têm impactado várias áreas científicas. Sua versatilidade pode ser observada diante do seu emprego na indústria farmacêutica, auxiliando na descoberta de medicamentos, na nanomedicina, nas aplicações teranósticas em câncer, na mineralogia, e, de forma geral, nas áreas de biologia, medicina e ciência dos materiais [55].

Segundo a Academia Nacional de Ciências, é preciso fazer uso de técnicas não destrutivas e imparciais, eficientes e confiáveis nas ciências forenses [56].

A espectroscopia Raman é uma técnica já bem conhecida no campo da criminalística. Nos tribunais norte-americanos ela goza de muito respeito e admissibilidade, sendo aceita como meio probatório em processos judiciais, uma vez que atende ao padrão de Daubert, ou seja, possui padrão pré-estabelecido, elevado número de

publicações, taxas de erros bem estabelecidas e ampla aceitação pela comunidade científica [55].

Ocorre ainda que, essa técnica pode ser aprimorada e se tornar ainda mais sensível com a aplicação de nanomateriais para o SERS. Dentre as áreas onde o SERS atua, podem ser destacadas a detecção e estudos envolvendo DNA, RNA, etc [55].

Outra característica relevante do efeito SERS, observada em estudos de aminoácidos contidos em resíduos de impressões digitais sobrepostas em substratos de prata, é a sua capacidade de supressão da Fluorescência [57].

Assim, este estudo se justifica por propor uma nova metodologia não destrutiva e reprodutível de análise de cocaína, baseada na preparação de substratos SERS ativos de AuNPs. Cabe destacar que a maior parte dos trabalhos aqui citados, remove a droga da IDL antes da análise, com o uso de fitas ou cotonetes ou ainda utilizam grandes quantidades de droga para contaminar a impressão digital. Por outro lado, o método proposto neste estudo busca a detecção da droga, em baixíssimas concentrações na própria IDL, o que permite maior preservação da evidência, que pode ser utilizada em contraprovas.

2.2. Classificação de sexo por meio das impressões digitais.

As impressões digitais são vestígios importantes para o estabelecimento de autoria de um crime há mais de 100 anos. Contudo, nem sempre é possível realizar a revelação e análise da mesma pois, muitas vezes, ela não possui condições técnicas de confronto (número suficiente de minúcias para comparação com impressões digitais padrão) [58].

Conforme observado na sessão 1.3 deste trabalho, é possível, por meio da identificação de outras características de um indivíduo, reduzir o rol de suspeitos. E essas informações podem ser úteis numa investigação policial. Neste sentido, justifica-se a proposta de uma metodologia não destrutiva apresentada neste trabalho que utiliza a espectroscopia vibracional combinada com métodos quimiométricos (PCA, SVM-DA e PLS-DA) para a determinação de gênero a partir da análise de substâncias endógenas de IDLs.

3. Objetivos

3.1. Objetivos Gerais

Desenvolver métodos para detecção qualitativa de cocaína em resíduos de IDLs, utilizando Espalhamento Raman Intensificado por Superfície – SERS. Além disso, busca-se classificar o sexo de um indivíduo, a partir de substâncias endógenas das impressões digitais, por meio das espectroscopias Raman e Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR, com auxílio de ferramentas quimiométricas (PCA, PLS-DA e SVM-DA).

3.2. Objetivos Específicos

Considerando o primeiro objetivo geral, métodos para detecção de cocaína das impressões digitais por SERS, tem-se como objetivos específicos:

- a) Preparar diferentes substratos SERS ativos baseados em nanopartículas de ouro;
- b) Selecionar os substratos SERS ativos para serem utilizados na identificação de cocaína em impressões digitais, a partir de testes com Rodamina 6G (R6G);
- c) Caracterizar os substratos selecionados por técnicas como microscopia eletrônica de Transmissão (MET) e de Varredura (MEV), Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS), Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e visível (UV-Vis) e Espectroscopia Raman;
- d) Obter os espectros SERS das amostras de R6G e cocaína em diferentes concentrações;
- e) Investigar o efeito da adsorção no substrato SERS selecionado, da R6G e da cocaína, por meio de isotermas de adsorção;
- f) Obter espectros SERS de impressões digitais de voluntários depositadas nos substratos SERS ativos após contaminação do dedo polegar com amostra de concentração conhecida de cocaína; e
- g) Verificar a eficácia na detecção de cocaína em impressões digitais.

Por fim, para cumprir o segundo objetivo geral da tese, determinar o sexo de um indivíduo a partir de substâncias endógenas das impressões digitais e espectroscopias FTIR e Raman, tem-se como objetivos específicos:

- h) Investigar as substâncias endógenas das impressões digitais para a determinação do gênero de um indivíduo por meio das espectroscopias Raman e FTIR, em função do tempo de coleta e diferentes condições de armazenamento;
- i) Preparar e implementar os modelos quimiométricos (PLS-DA e SVM-DA) para a separação dos grupos feminino e masculino; e
- j) Verificar se as condições de tempo e luminosidade afetam a decomposição das substâncias endógenas das impressões digitais, bem como na determinação do gênero do indivíduo pelas espectroscopias Raman e FT-IR.

4. Fundamentação Teórica

4.1. Métodos de Caracterização

4.1.1. Espectroscopia de Absorção Molecular no Ultravioleta/Visível - UV-Vis

A técnica de UV-Vis é uma das mais difundidas e importantes técnicas de caracterização utilizadas, baseada nos fenômenos de absorvância ou transmitância que ocorrem durante o caminho ótico da radiação eletromagnética e interpretados por meio da lei de Beer-Lambert [59].

A radiação é compreendida na faixa de comprimento de onda entre 200 e 390 nm para o Ultravioleta e entre 390 a 780 nm para a faixa do visível, conforme demonstrado na Figura 2. O UV-Vis possui diversas aplicações como: determinação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos, compreensão sobre a estrutura eletrônica de íons complexos, determinação de parâmetros termodinâmicos, estudos cinéticos, entre outras [60].

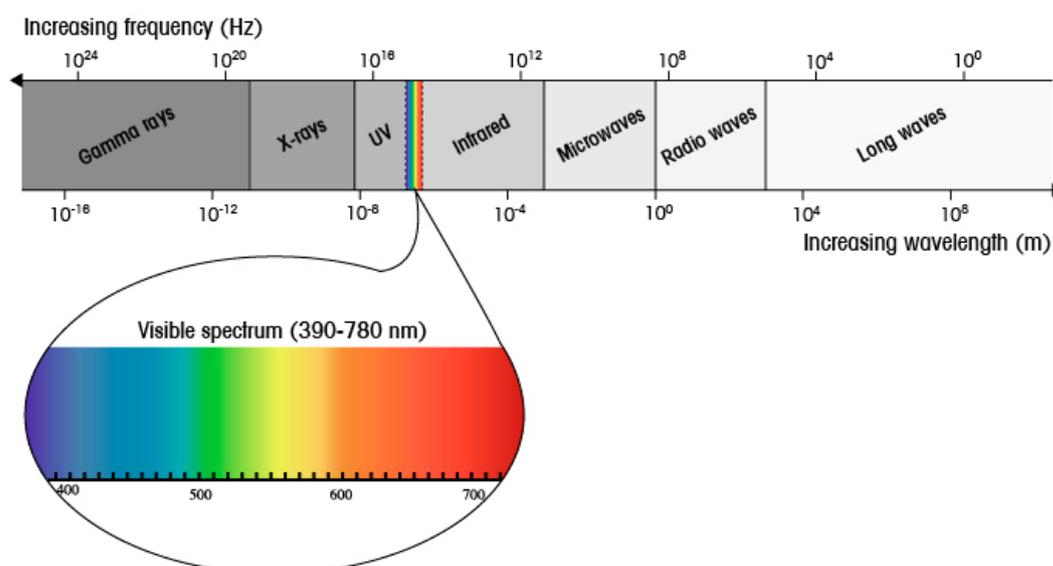


Figura 2 Representação esquemática do espectro na região do visível. Retirado de [59].

A estrutura do composto investigado e os tipos de simetrias dos orbitais moleculares do estado fundamental e excitado (σ , σ^* , n , π , π^*) que absorvem a radiação eletromagnética são características consideradas para a realização das medidas de UV-Vis [59].

Orbitais σ e σ^* ($\sigma^* \leftarrow \sigma$) participantes de transições eletrônicas, de uma forma geral, são altamente energéticos e envolvem ligações σ , capazes de absorver radiação abaixo de 150 nm. Consideram-se também os elétrons ocupantes de orbitais não ligantes (n), que podem originar transições do tipo $\sigma^* \leftarrow n$ e $\pi^* \leftarrow n$. As transições $\sigma^* \leftarrow n$, em geral,

absorvem na faixa de 150 a 200 nm. Já as transições do tipo $\pi^* \leftarrow n$ e $\pi^* \leftarrow \pi$, presentes em compostos orgânicos com insaturações e/ou heteroátomos, são observadas na faixa de 200 a 700 nm. Cabe mencionar que a descrição de transições eletrônicas como transições entre orbitais é uma maneira simplificada, utilizada para fins didáticos, pois a transição ocorre entre estados eletrônicos [59]. A Figura 3 representa as transições eletrônicas envolvidas no UV-Vis.

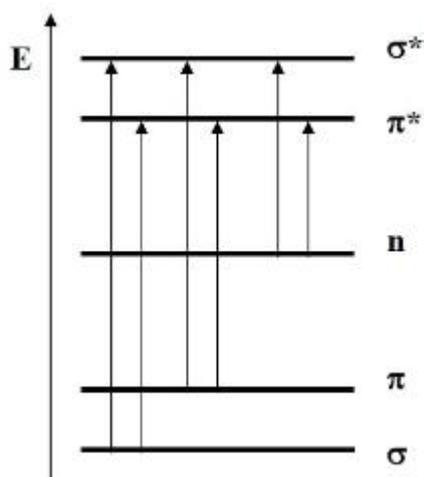


Figura 3 Representação esquemática das transições eletrônicas envolvidas na UV-Vis. Adaptada de [59].

4.1.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

MET é, atualmente, uma das técnicas que mais se destaca quando se quer obter informações acerca do tamanho, morfologia e dispersão de materiais particulados, pois permite uma magnificação cerca de 1000 vezes maior do que a de um microscópio de luz convencional [61] [62].

Seu funcionamento se baseia na aceleração de um feixe de elétrons produzidos pelo aquecimento de um filamento de tungstênio, acelerados do topo para a base por uma diferença de potencial de 100 a 300 keV entre o catodo e o anodo, ou seja, do topo para a base do instrumento. O feixe de elétrons é direcionado para atravessar a amostra por meio de Lentes eletromagnéticas. Assim, são formadas dois tipos de imagem: a de campo claro, formada a partir da seleção do feixe de elétrons incidentes e a de campo escuro, que tem sua formação baseada no feixe de elétrons espalhados [62] [63].

A disposição dos constituintes de um microscópio eletrônico de transmissão pode ser observada por meio do esquema representativo do instrumento na Figura 4. Assim, de uma maneira geral, um MET é constituído por:

- Sistema de lentes condensadoras, que reduz a seção transversal do feixe elétrons e iluminar a área de interesse;
- Corrente da lente objetiva, responsável por controlar o foco e a ampliação inicial;
- Corrente da lente projetiva que proporciona ampliações de 1000 a 250.000 \times ;
- Sistema de vácuo, constituído por bomba difusora e rotativa, que geram uma pressão menor que 10^{-4} torr;
- Sistema de registro de imagens constituído por filmes negativos ou CCD (*charge-coupled device*).

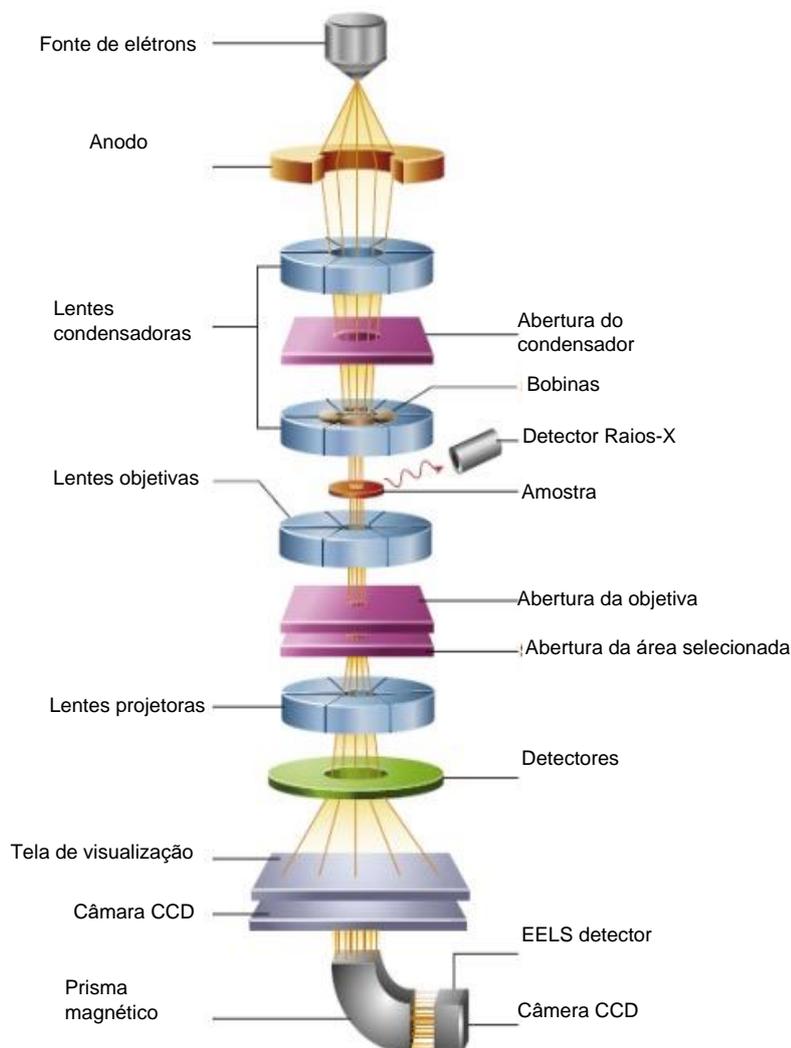


Figura 4 Representação esquemática dos principais constituintes de um microscópio eletrônico de transmissão. Adaptada de [62].

4.1.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O MEV é usado, de forma versátil, para analisar características estruturais de materiais sólidos na escala micrométrica e fornece, a partir de uma amostra sólida, informações acerca de sua morfologia e identidade de seus elementos químicos [64].

Enquanto na microscopia convencional utiliza-se luz visível ou ultravioleta como radiação incidente na amostra para observá-la pelo fenômeno da difração da luz, o que limita a técnica a um aumento máximo de 2000 vezes, a Microscopia Eletrônica de Varredura faz uso de um feixe de elétrons para a mesma finalidade, podendo ser focalizados por campos eletrostáticos ou eletromagnéticos, promovendo a formação de imagens com aumentos de 300.000 vezes ou mais e resolução da ordem de 2 a 5 nanômetros nos MEVs modernos [64].

O primeiro trabalho que tratou dos conceitos do MEV foi realizado por Knoll, em 1935. Então, em 1938, Von Ardenne construiu o primeiro microscópio eletrônico de varredura. Mais tarde, em 1965, foi apresentado o primeiro instrumento comercial. Atualmente, esses instrumentos são produzidos em série, apresentando uma estrutura digital capaz de armazenar imagens temporariamente e transferir dados via rede, sendo usados por um vasto campo da ciência como na inspeção e controle de qualidade de fármacos, semicondutores, peças de precisão, nanomateriais etc [64] [65].

O funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) consiste basicamente na utilização de um feixe de elétrons de pequeno diâmetro para extrair informações da superfície da amostra, ponto a ponto, varrendo em linhas sucessivas e transmitindo o sinal do detector a uma tela catódica com sua varredura sincronizada perfeitamente com a do feixe incidente [64].

É comum o uso de filamento de tungstênio aquecido como fonte de elétrons destes instrumentos. Eles operam numa faixa de tensões de aceleração entre 1 e 50 kV. Assim, devido a alta tensão criada entre o filamento e o ânodo, o feixe é acelerado e, em seguida, focalizado sobre a amostra por uma série de três lentes eletromagnéticas. A interação entre o feixe e a amostra produz elétrons e fótons, coletados por detectores e convertidos em um sinal de vídeo.

A formação de imagens de aparências tridimensionais é uma característica desta técnica que merece destaque, devido as elevadas profundidades de campo e de foco oferecidas pelo equipamento, e depende da energia com que as partículas atingem o detector [64].

Por meio da Figura 5, é possível observar a estrutura de um MEV.

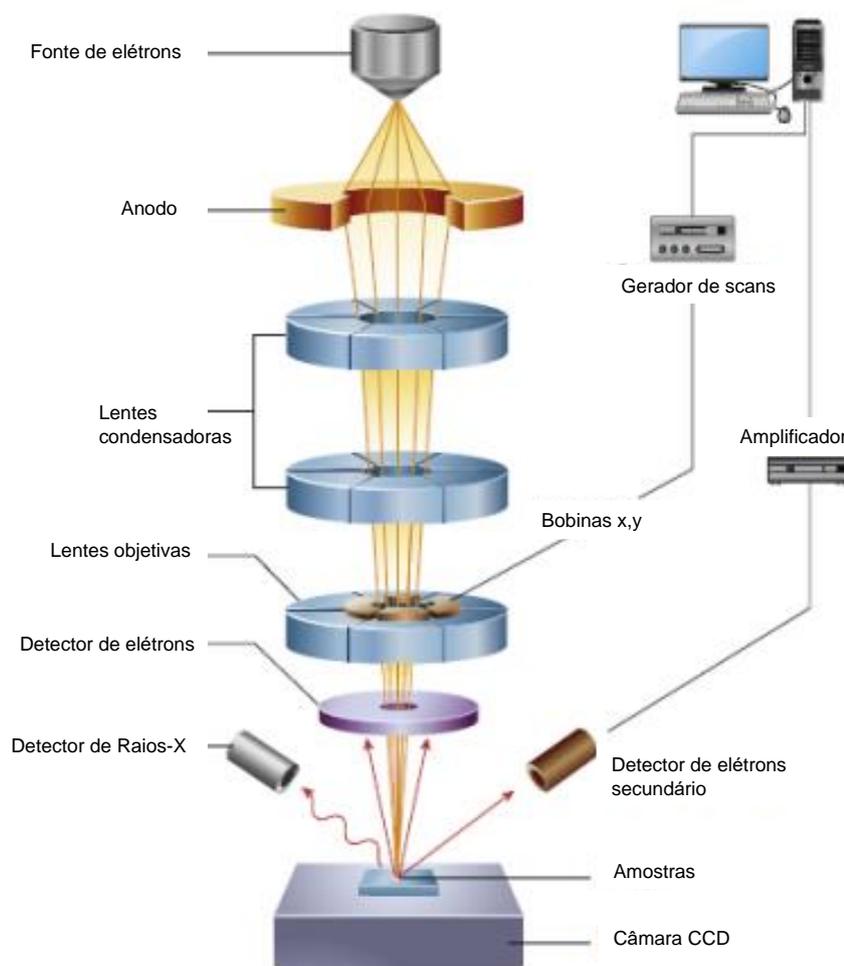


Figura 5 Representação esquemática dos componentes do Microscópio Eletrônico de Varredura. Adaptado de [62].

4.1.4. Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)

A EDS é uma técnica não destrutiva de caracterização, que se baseia na emissão de raios X por uma amostra, quando bombardeada por um feixe de elétrons. Geralmente, as medidas de EDS são realizadas em associação com o emprego das técnicas de microscopia eletrônica (MEV e MET) [66][67].

Dados quantitativos e qualitativos podem ser obtidos como resultado do emprego da técnica. Assim, quando um feixe de elétrons produzido por emissão termiônica e colimado por lentes eletromagnéticas da coluna do microscópio, incide na amostra, os elétrons de suas camadas internas são ejetados. Esses espaços são preenchidos por elétrons de camadas externas. Quando ocorre esse decaimento, raios-x característicos à

amostra são emitidos. Assim, pode ser realizada uma correlação entre a radiação X emitida pela amostra e o número atômico do elemento em estudo [66][67].

A análise de EDS pode ser usada para investigar nanopartículas metálicas realizando a comprovação da presença do metal na amostra [66].

4.1.5. Espalhamento Raman

O efeito Raman ocorre quando uma radiação monocromática sofre espalhamento inelástico ao incidir sobre uma molécula. No processo de interação da radiação eletromagnética com a molécula, o campo elétrico da radiação excitante induz um momento de dipolo na molécula. Esse momento de dipolo induzido é responsável pelo espalhamento Raman [68].

A teoria deste efeito foi proposta em 1923, pelo físico austríaco Adolf Smekal, mas o fenômeno só foi observado experimentalmente em 1928, pelo também físico indiano Chandrasekhara Venkata Raman, agraciado com um Nobel, em 1931, por este estudo.

C.V. Raman, em 1928, verificou diferentes comprimentos de onda da radiação espalhada, em relação à radiação do comprimento de onda da radiação incidente, para estruturas moleculares distintas [59]. Foram realizados testes com aproximadamente 60 amostras líquidas que, ao serem submetidas à radiação monocromática, a luz espalhada apresentava coloração distinta da luz incidente (Figura 6) [69].

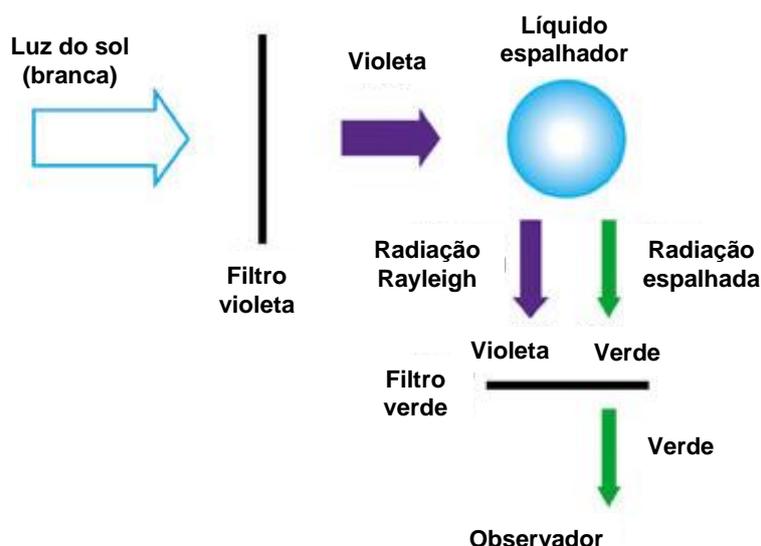


Figura 6 Representação esquemática do experimento realizado por Raman, no início do século XX, onde foi possível a observar a coloração distinta entre a luz incidente no líquido e a luz espalhada. Retirado de [69].

O Brasil apresentou contribuições significativas para o desenvolvimento desta técnica, com destaque para a equipe de Stammreich e colaboradores, que em 1950, depois de várias tentativas, estabeleceram as fontes de luz monocromáticas nas regiões de 587,6, 667,8 e 706,5 nm, permitindo estudos de substâncias coloridas e fotossensíveis. Outra contribuição brasileira muito importante para o desenvolvimento da espectroscopia Raman foi dada pelo físico Brasileiro Sérgio Porto, em parceria com Herwing Kogelnick, os primeiros a utilizarem laser contínuo He-Ne (632,8) na espectroscopia Raman [68] [70] [71] [72] [73].

A aplicação de lasers como fonte de excitação, tornou mais frequente o uso da espectroscopia Raman, uma vez que a intensidade da fonte de laser é *ca.* 1000 vezes maior do que a intensidade do sinal Raman. Os equipamentos Raman atuais fazem uso de fontes de lasers de radiação monocromática com comprimentos de onda compreendidos, no espectro eletromagnético, entre as faixas do UV e infravermelho.

Na espectroscopia Raman, quando a radiação eletromagnética interage com uma molécula, pode ocorrer a excitação da molécula de um nível vibracional do estado eletrônico fundamental para um estado denominado virtual, que, por sua vez, decai rapidamente para outro nível vibracional do estado eletrônico fundamental. Esse processo descreve a radiação espalhada.

A soma das energias eletrônica, vibracional e rotacional (estado gasoso, apenas) respectivamente citadas de acordo com o grau de intensidade de cada uma, resultam na energia total da molécula.

O espalhamento inelástico de luz observado no efeito Raman é um fenômeno no qual a energia do fóton incidente é diferente da energia do fóton espalhado, sendo que, essa energia espalhada pode ser maior (efeito Raman Anti-Stokes) ou menor (efeito Raman Stokes) do que a energia da radiação incidente. Quando a radiação espalhada possui a mesma frequência da radiação incidente, recebe o nome de espalhamento Rayleigh, conforme demonstrado na Figura 7 [68].

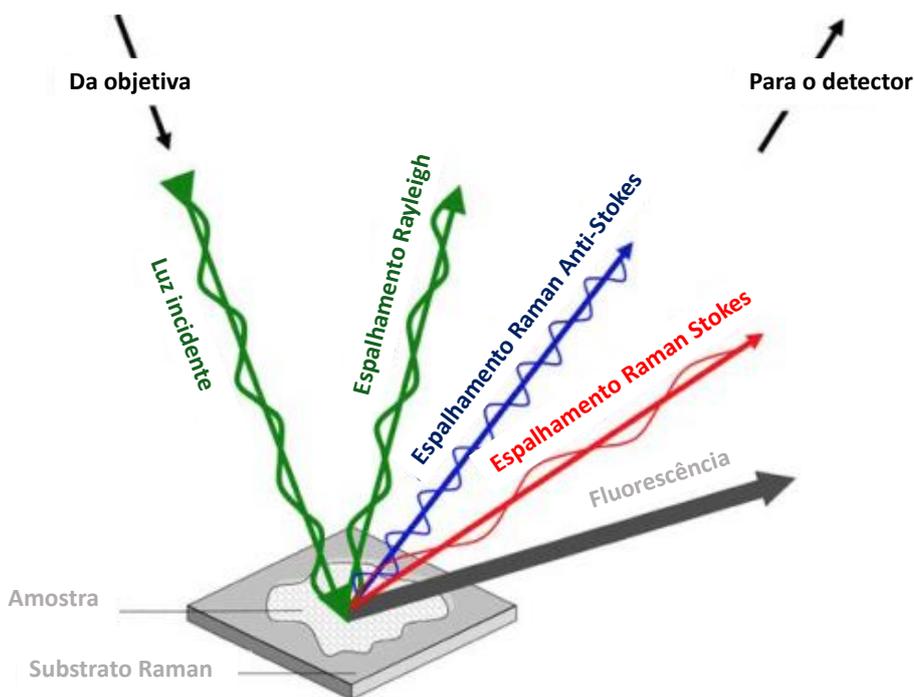


Figura 7 Representação do fenômeno de espalhamento de luz com os três tipos de radiações resultantes possíveis: espalhamento Rayleigh, espalhamento Stokes e espalhamento Anti-Stokes. Adaptado do de [74]

No espalhamento Stokes, há um decaimento do estado virtual para o estado vibracionalmente excitado após a interação do fóton incidente com a molécula, que se encontra no estado fundamental. Assim, o fóton espalhado terá energia menor ($h\nu_e$) que a energia do fóton incidente ($h\nu_0$). Essa diferença de energia corresponde à energia vibracional ($e_v = h\nu_0 - h\nu_e$). No espalhamento Anti-Stokes, a molécula encontra-se em um estado vibracionalmente excitado, neste caso, após a interação há o decaimento do estado virtual para o estado vibracional fundamental, sendo a energia do fóton espalhado ($h\nu_e$) maior que a energia do fóton incidente ($h\nu_0$). A diferença de energia entre os dois estados será igual à energia vibracional, ($e_v = h\nu_e - h\nu_0$) (Figura 8).

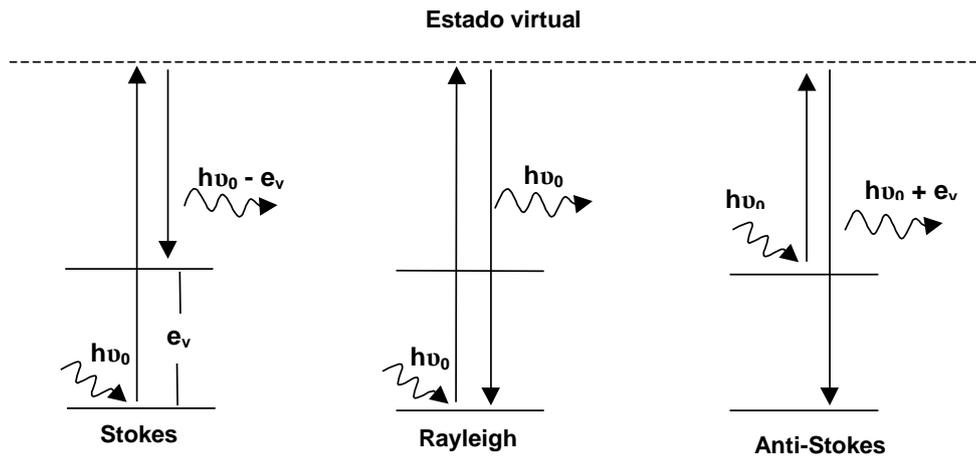


Figura 8 Esquemas dos mecanismos de espalhamento. Adaptada de [68].

Para efeitos práticos, na espectroscopia Raman, considera-se o efeito Stokes, devido a maior população de moléculas no estado fundamental, em temperatura ambiente, que segue a distribuição da Lei de Boltzmann [75].

A intensidade do efeito Raman está relacionada ao momento de dipolo induzido, na molécula pelo campo elétrico da radiação incidente. Essa propriedade das cargas se rearranjarem pela ação do campo é conhecida como a polarizabilidade da molécula. Existe uma relação entre o momento de dipolo induzido (\vec{P}) com a polarizabilidade (α) e o campo elétrico da radiação \vec{E} , conforme equação abaixo:

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (\text{Equação 1})$$

Uma vez que a atividade Raman depende do momento de dipolo induzido, que é proporcional à polarizabilidade, o momento de transição pode ser representado pela seguinte equação:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \Psi_m \alpha_{ij} \Psi_n d\tau \quad (i,j= x, y \text{ ou } z) \quad (\text{Equação 2})$$

onde α_{ij} são os componentes do tensor de polarizabilidade, que pode ser decomposto na matriz:

$$\alpha = \begin{vmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{vmatrix} \quad (\text{Equação 3})$$

Aplicando a série de Taylor, nos componentes de polarizabilidade tem-se que:

$$(\alpha_{ij}) = (\alpha_{ij})_0 + \sum_k \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k \quad (\text{Equação 4})$$

O tensor de polarizabilidade da molécula representado pelo primeiro termo da Equação 5 é o responsável pelo espalhamento Rayleigh. Enquanto o efeito Raman é representado pelo segundo termo. Q_k representa a coordenada normal para o modo vibracional k . As regras de seleção para o espalhamento Raman são obtidas substituindo na Equação 3, o segundo termo da Equação 5. Assim, observa-se que a polarizabilidade deve variar durante a vibração $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)_0 \neq 0$ e que Δv , no oscilador harmônico deve ser +1 ou -1 ou qualquer número inteiro, no anarmônico [75].

4.1.6. Efeito Raman Ressonante

O efeito Raman ressonante ocorre quando a energia da radiação excitante se encontra na região da banda de absorção de alta probabilidade de uma molécula. As intensificações de sinal Raman, nesses casos, podem chegar a 10^6 vezes em relação ao sinal Raman fora da ressonância. Isto se deve a formação um estado de energia intermediário, provocado pelo fóton incidente, que é próximo de estados vibracionais e rotacionais do nível eletrônico excitado e que provoca, portanto, o acoplamento entre estes estados e o intermediário, resultando na intensificação do sinal e no aparecimento de bandas harmônicas, conforme pode ser observado na Figura 9.

Assim, quanto maior a proximidade entre a frequência da radiação incidente com a frequência de absorção, mais provável será a ocorrência do efeito Raman Ressonante [75][76].

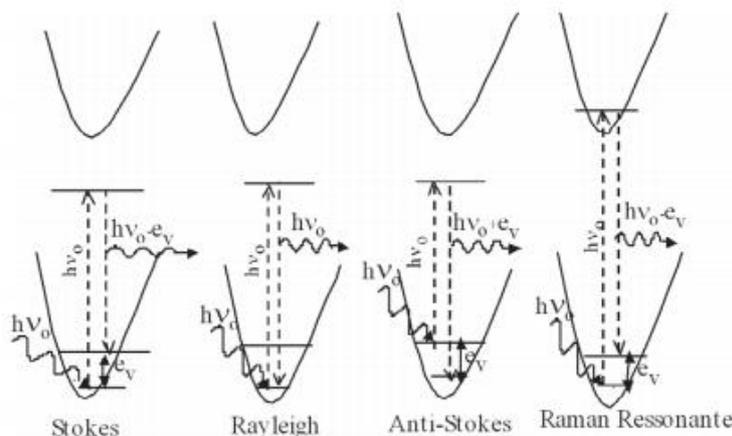


Figura 9 Representação esquemática dos espalhamentos Raman, Rayleigh e Raman ressonante, mostrando que para este último a perturbação pelo fóton incidente envolve o estado eletrônico excitado. Retirado de [77]

4.1.7 Surface Enhancement Raman Scattering - SERS

O SERS é uma poderosa técnica de espectroscopia molecular para detecção de moléculas [78] [79]. A dispersão inelástica da luz, quando a molécula é excitada por fontes em regiões distantes das ressonâncias eletrônicas moleculares é um fator limitador para aplicações que exijam maior sensibilidade. Nas décadas de 1960 e 1970, a utilização de novas fontes de lasers de ondas contínuas impulsionaram estudos com o objetivo de detectar moléculas em baixas concentrações. Neste contexto, em 1974, Fleischmann e colaboradores relataram, pela primeira vez, uma intensificação anormal da dispersão Raman ao realizarem estudos espectroeletróquímicos com piridina adsorvida em eletrodo de prata [78] [80]. Outros estudos confirmaram o fenômeno da amplificação do sinal Raman, como o trabalho realizado, em 1977, por Jeanmarie e Van Duyne com outras aminas adsorvidas em uma superfície de prata, onde também foi relatado que as intensidades observadas no espalhamento da piridina adsorvida em superfície de prata eram de 5 a 6 ordens de magnitude maiores do que o previsto. Os autores descartaram o efeito Raman ressonante como o responsável pelo aumento da intensidade do sinal Raman nas moléculas adsorvidas em superfície de prata [78] [81]. Desde então, diversos estudos teóricos e experimentais concentraram-se numa forma de explicar o novo fenômeno [78].

Existem dois modelos teóricos para explicar o efeito SERS, com farto material bibliográfico que endossa os mecanismos propostos: o mecanismo eletromagnético (EM) e o mecanismo molecular ou químico (QM) [78] [82] [83].

Um mecanismo químico de transferência de carga foi utilizado por Otto e colaboradores para explicar pela primeira vez o efeito SERS [84]. Foi observado a

supressão do sinal SERS do etileno adsorvido em matriz de argônio e prata, sob ultra alto vácuo, quando o substrato foi exposto a pequenas quantidades de O₂. Em outro estudo, Rubim e colaboradores demonstraram que o gás oxigênio suprimiu parte do efeito SERS de piridina adsorvida em eletrodos de prata e cobre [82].

Este mecanismo químico pode ser explicado pela reorganização dos níveis e estados energéticos ocupados e ociosos dos orbitais moleculares, durante a aproximação do adsorbato e do substrato, formando complexos de transferência de carga, conforme observado na Figura 11 [83]. Quando há a interação do sistema com a radiação incidente, é possível a formação do par elétron-lacuna na superfície do substrato. A partir da reorganização dos estados energéticos, há o alargamento das regiões de alta densidade e uma conseqüente diminuição da quantidade de energia necessária para elétrons do adsorbato ocuparem lacunas da banda de valência da superfície do substrato, assim como os orbitais receptores do adsorbato serem ocupados com maior probabilidade por elétrons do local de densidade de estado no nível de Fermi da partícula [85]. O par elétron-lacuna emite radiação e excita vibracionalmente a molécula adsorvida, ao ser recombinado. Ou seja, o metal forma uma ligação química com a molécula adsorvida, dando origem ao complexo de transferência de carga nos clusters dos átomos da superfície metálica, em uma região de contorno de grão que recebe a denominação de sítios de rugosidade de escala atômica (ASR) [46].

Um exemplo desse modelo químico pode ser observado na Figura 10, que representa a interação entre a piridina e clusters de nanopartículas de prata (AgNPs) agregados sobre um eletrodo de Ag. Uma ligação σ é formada entre a molécula (par de elétrons livres do nitrogênio) e o metal (estados receptores). Outra região de alta densidade de estados é formada e conseqüentemente uma retro-doação π ocorre. Quando esses elétrons se reorganizam e retornam para os seus respectivos orbitais, um fóton é emitido e a molécula adsorvida adquire energia vibracional. Pode-se pensar em várias regiões de alta densidade de carga sendo formadas e como conseqüência, a ocorrência de outras transições de transferência de carga. Essas interações acabam por ampliar a seção de choque para o espalhamento Raman [46] [60].

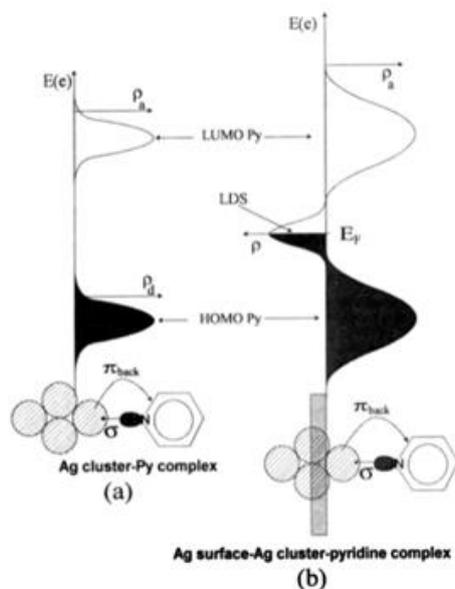


Figura 10. Representação esquemática do modelo do complexo de transferência de carga formado pela interação entre a Piridina (Py) e clusters de nanopartículas de prata (Ag). a) complexo de clusters de prata e piridina dispersos em gás inerte; b) complexo cluster de prata e piridina em eletrodo de prata. E_F , LDS, ρ , representam respectivamente o nível de Fermi da prata, a densidade local de estados, doadores e receptores de cargas. Retirada de [86]

No mecanismo eletromagnético, as discussões sobre o efeito de plasma de superfície tiveram início com a proposta de Moskovits, citado por Aroca [78], que afirmava uma anomalia no aumento da intensidade do sinal, que seria devido a uma excitação pré-ressonante ou ressonante, dos elétrons mais externos do adsorbato e as colisões na superfície do substrato [78]. Assim, neste modelo, quando o sistema a radiação incide em um sistema de adsorbato-substrato de nanopartículas, o campo eletromagnético da superfície do substrato é intensificado por ressonância, pois as nanopartículas metálicas apresentam a característica de oscilar sua nuvem eletrônica (Figura 11), o que dá origem ao efeito plasmônico ou efeito de ressonância de plasmons de superfície localizado (LSPR). A oscilação em fase do campo elétrico local da superfície da nanopartícula com a frequência da radiação incidente, gera a ressonância [83].

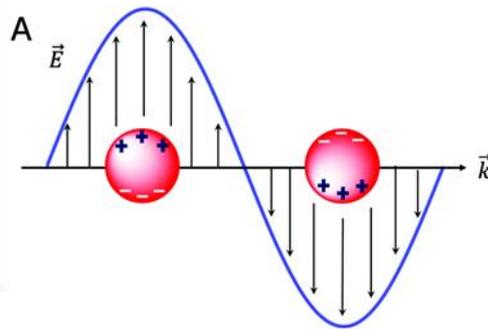


Figura 11. Representação esquemática da oscilação da nuvem eletrônica (plasmon de superfície) de nanopartículas ao serem submetidas a um campo eletromagnético. Adaptada de [87].

No efeito SERS, a intensificação total do sinal é resultante das contribuições dos mecanismos químico e eletromagnético, nos quais a contribuição do primeiro está numa ordem de magnitude 10^2 e a contribuição do mecanismo eletromagnético é cerca de 10^6 a 10^8 . Fatores de intensificação da ordem de 10^{10} podem ser encontrados quando somada a contribuição Raman ressonante. Fatores maiores de intensificação são encontrados na literatura. Desta forma, o fator de intensificação Raman pode chegar à ordem 10^{15} , sendo possível detectar substâncias em níveis de concentração tão baixos quanto de uma única molécula (SMD - *Single Molecule Detection*) tornando a espectroscopia Raman equiparada à espectroscopia de fluorescência e desempenhando papel significativo em diversas áreas do conhecimento [88].

O efeito SERS é encontrado com maior intensidade na prata (maior fator de intensificação), ouro e cobre, mas também pode ser observado em outros metais, como platina e paládio. [38] [68] [69] [70] [68].

Grésillon e colaboradores foram os primeiros a citar a intensificação do campo elétrico em locais específicos, que chamaram de “*hot spots*”. O efeito foi observado em aglomerados de AuNPs, utilizando substrato de vidro, como consequência da excitação de LSPRs. Os autores utilizaram microscopia óptica de varredura de campo próximo [89].

Assim, em substratos SERS ativos, pode ocorrer a formação de dímeros (Figura 12), trímeros ou aglomerados maiores das nanopartículas, sendo observado no espaçamento entre elas um significativo aumento do campo eletromagnético em comparação aos fatores de ressonância, em especial a LSPR, a ressonância de transferência de carga que envolve o sistema complexo metal-molécula e o efeito Raman ressonante da molécula adsorvida [90].

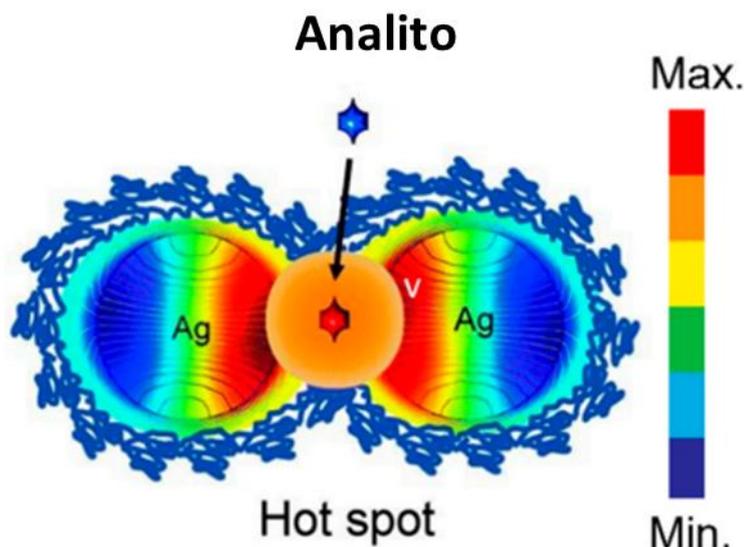


Figura 12. Representação esquemática da formação de dímeros com analito adsorvido e da região com maior intensidade do sinal Raman (cor vermelha da escala). Adaptado de [91]

4.1.8 Espectroscopia de absorção no Infravermelho

O infravermelho compreende a região do espectro eletromagnético com números de onda no intervalo de 12.800 a 10 cm^{-1} , e por ser uma região extensa é dividido em infravermelho próximo (12.800 a 4.000 cm^{-1}), infravermelho médio (4.000 a 200 cm^{-1}) e infravermelho distante (200 a 10 cm^{-1}) [59].

As transições vibracionais fundamentais, que envolvem o estado fundamental e o primeiro estado vibracional excitado, encontram-se na região do infravermelho médio. As bandas correspondentes às harmônicas ou modos de combinação de frequências fundamentais são observadas na região do infravermelho próximo. As transições no infravermelho próximo e médio estão representadas na Figura 13, onde $v = 0$ representa o estado vibracional fundamental e $v = 1, 2$ e 3 representam os primeiro, segundo e terceiro estados vibracionais excitados. Normalmente se referem as ligações C-H, N-H e O-H.

Quando a energia da radiação tem o mesmo valor da diferença de energia entre dois estados vibracionais, que ocorre a absorção no infravermelho, que pode ser entendido como a ressonância entre a diferença de níveis de energia da molécula e a radiação eletromagnética.

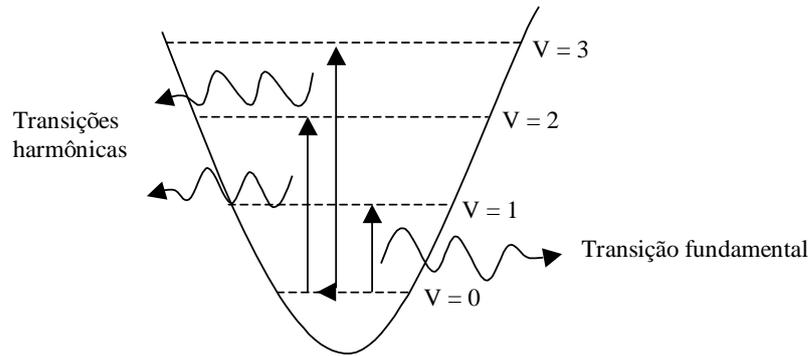


Figura 13. Representação esquemática do mecanismo de absorção no Infravermelho. Adaptado de [59].

Para um modo vibracional ser ativo no infravermelho é necessário que haja variação no momento dipolar durante essa vibração.

No modelo clássico, considerando moléculas diatômicas a única coordenada normal do sistema coincide com a coordenada interna da ligação, q . Ao expandir o momento de dipolo em uma série de Taylor da coordenada q para cada um dos componentes μ_x, μ_y e μ_z obtemos a equação a seguir [68].

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 q + \dots \text{ (Equação 5)}$$

μ_0 é o vetor do momento de dipolo permanente e a derivada é considerada na posição de equilíbrio.

Para pequenas vibrações, é possível que os termos mais altos sejam desprezados. Para haver absorção no infravermelho, a condição de variação no momento de dipolo com a vibração faz com que o termo $\left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0$ seja diferente de zero para pelo menos uma das

componentes μ_x, μ_y e μ_z do momento de dipolo [68].

Na mecânica quântica, a transição entre dois estados, pode ser caracterizada pelas funções de onda Ψ_m (estado inicial) e Ψ_n (estado final) e ser descrita pelo momento de transição de dipolo μ_{mn} :

$$\mu_{mn} = \int \Psi_m \mu \Psi_n d\tau \text{ (Equação 6)}$$

Ou ainda pelas componentes:

$$(\mu_x)_{mn} = \int \Psi_m \mu_x \Psi_n d\tau \text{ (Equação 7)}$$

$$(\mu_y)_{mn} = \int \Psi_m \mu_y \Psi_n d\tau \text{ (Equação 8)}$$

$$(\mu_z)_{mn} = \int \Psi_m \mu_z \Psi_n d\tau \text{ (Equação 9)}$$

O momento de transição pode então ser entendido como a medida do dipolo que é associado com o movimento dos elétrons durante a transição entre os dois estados vibracionais envolvidos. Os valores das integrais que definem a intensidade no infravermelho são proporcionais à probabilidade de transição $|\mu_{mn}|^2$. Assim, para que uma transição vibracional seja permitida é necessário que pelo menos uma das integrais seja diferente de zero [68].

Rearranjando os termos das equações (6) e (7), a série de Taylor pode ser representada como:

$$\mu_{mn} = \mu_0 \int \Psi_m \Psi_n d\tau + \left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 \int \Psi_m q \Psi_n d\tau \text{ (Equação 10)}$$

onde a parte integral do segundo membro da equação é igual a zero, pela ortogonalidade das funções de onda. Assim, para que o segundo termo seja diferente de zero é necessário que as seguintes condições sejam satisfeitas:

i) $\left(\frac{d\mu}{dq} \right)_0 \neq 0$ ou seja, deve haver variação do momento de durante a vibração;

ii) $\int \Psi_m q \Psi_n d\tau \neq 0$, o produto $\Psi_m q \Psi_n$ deve ser uma função par. Como q é função

ímpar, é necessário que o produto $\Psi_m \Psi_n$ seja função ímpar, ou seja, as funções devem ter diferentes paridades. A regra de seleção para o oscilador harmônico é $\Delta v = \pm 1$ (+ corresponde a absorção; – corresponde à emissão e v ao número quântico vibracional).

Considerando o modelo simples do oscilador harmônico e a regra de seleção $\Delta v = \pm 1$, os espectros de absorção no IR só apresentariam absorções dos modos

fundamentais. As transições harmônicas podem ser então explicadas ao ser considerada a anarmonicidade elétrica, que leva em conta termos adicionais, que podem ser observados na equação 12:

$$\mu = \mu_0 + \left(\frac{d\mu}{dq}\right)_0 q + \frac{1}{2!} \left(\frac{d^2\mu}{dq^2}\right) q^2 + \dots \text{ (Equação 11)}$$

O termo quadrático é responsável pelo aparecimento da primeira harmônica, o termo cúbico para o aparecimento da segunda harmônica e os termos superiores da série de Taylor para as harmônicas de ordem superior, sendo então possíveis transições com $\Delta v = \pm 1, \pm 2, \pm 3\dots$ [68].

Na década de 1960, os equipamentos começaram a contar com a transformada de Fourier, que converte a saída do detector em um espectro passível de interpretação obtido a partir de um interferograma. Para a geração do interferograma, o FTIR utiliza-se de um interferômetro de Michelson, no qual a radiação passa por um divisor de feixes conhecido como *beam splitter*. Um dos feixes segue para um espelho fixo enquanto o outro segue para um espelho móvel. Após serem refletidos são recombinados no *beam splitter* de forma construtiva ou destrutiva, a depender da diferença do caminho óptico [59] [92].

Assim, através da mudança do caminho óptico entre os dois feixes um sinal é gerado, que é interpretado por cálculos matemáticos da transformada de Fourier, nos quais a distância do caminho óptico pode ser convertida para o valor da frequência de radiação conforme observado na Figura 14, que traz uma representação esquemática do interferômetro de Michelson, que gera o interferograma é uma função no domínio do tempo. A transformada de Fourier converte a função no domínio do tempo para uma função no domínio da frequência, ou seja, o espectro [59] [92].

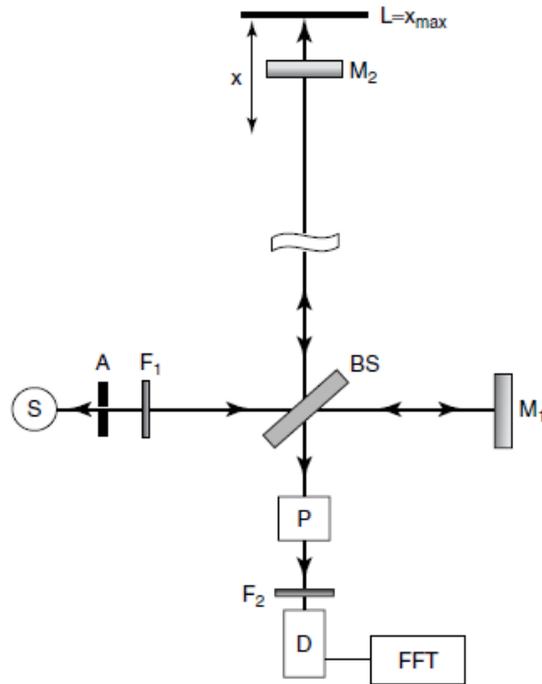


Figura 14. Representação esquemática do interferômetro de Michelson de um FTIR, onde S é a fonte, A é abertura, F1 o espelho parabólico focal, BS o *beam splitter*, M1 o espelho fixo, M2 o espelho móvel, P o local da amostra, F2 espelho parabólico focal, D o detector e FFT o algoritmo de transformada de Fourier, x a distância do caminho óptico e $L = x_{\text{máximo}} = d_{\text{DMCO}}/2$. DMCO = diferença máxima de caminho óptico. Adaptada de [92].

A luz refletida depende das imperfeições da superfície, do tipo da amostra, do índice de refração e do ângulo de incidência. Neste estudo foi utilizada a técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, no modo de reflexão especular que baseia-se no fato de que, a intensidade da luz refletida é medida em um comprimento de onda específico, ou seja, esse fenômeno é observado quando o meio refletor é uma superfície lisa e polida, onde o ângulo de reflexão é igual ao ângulo de incidência da radiação. Em casos de vários absorventes presentes em uma superfície, a intensidade relativa da reflexão é menor para os comprimentos de onda absorvidos [59].

4.2. Isotermas de adsorção

No processo de adsorção, quando duas substâncias (sólido-gás ou sólido-líquido) entram em contato, as concentrações iniciais das fases líquida e gasosa serão diferentes das concentrações finais (C_e), quando o sistema atingir o equilíbrio. Isso ocorre devido à transferência de massa do gás ou do líquido para a superfície do sólido, sendo esse processo obediente a uma condição limite (q). Ao sólido, dá-se o nome de adsorvente ou substrato, enquanto aos solutos (soluções gasosa e aquosa) são chamados de adsorbato. O fenômeno da adsorção é baseado em 3 (três) mecanismos: estérico, de equilíbrio e cinético. O primeiro relaciona a absorção seletiva do adsorbato com a morfologia do adsorvente. No equilíbrio, a adsorção física é um processo reversível e não existe interação química entre o adsorbato e o substrato, enquanto na adsorção química a afinidade de natureza química entre o adsorbato e o adsorvente deve ser considerada para que ocorra a adsorção. Por fim, o mecanismo cinético pode ser entendido como a taxa de transferência do adsorbato na fase fluídica para o adsorvente, em relação ao tempo. Há ainda uma dependência entre o mecanismo cinético e o tipo de sítio de adsorção.

A identificação de traços de substâncias e a separação das mesmas em soluções aquosas e gasosas têm sido objeto de estudo por meio do fenômeno da adsorção, haja vista a inviabilidade de se separar e identificar substâncias em concentrações tão baixas em solução por outros métodos físico-químicos [93].

As forças de quimissorção e fisissorção atuam de forma conjunta ou individual, determinando a intensidade da interação entre o adsorbato e o adsorvente. Com caráter específico, a força de quimissorção torna a interação entre o adsorbato e o adsorvente mais forte por envolver compartilhamento ou troca de elétrons. Nesse caso, a adsorção se torna mais forte e a interação ocorre em sítios localizados de interação com as moléculas/íons do soluto. A força de fisissorção é mais fraca, pois a interação que ocorre entre o adsorbato e o adsorvente são forças de Van der Waals. Nas interações por fisissorção, não há especificidade e estas ocorrem em toda a superfície do adsorvente [93].

Fatores como o pH, a polaridade da molécula, a temperatura, a área superficial do adsorvente e as naturezas do solvente, da interação molécula/íon e da morfologia do adsorvente devem ser considerados, pois influenciam o processo de adsorção. O pH, por exemplo, atua na distribuição de espécies do adsorbato sobre a superfície do adsorvente ao variar a carga de superfície dos adsorbatos. A adsortividade está diretamente relacionada à polaridade da molécula, uma vez que moléculas polares têm forte afinidade

por partículas metálicas. A variação de temperatura influencia na difusão das moléculas na monocamada do adsorvente. Uma forma de constatar isso é fazendo uso de métodos matemáticos de estudo de sistemas de adsorção, chamados de isotermas. Assim, é possível observar diferentes resultados nos modelos construídos para sistemas de adsorção com os mesmos dados. Além disso, os tipos de interação entre adsorvente e adsorbato dependem da área de superfície do adsorvente que, por sua vez, está diretamente relacionada ao tamanho das nanopartículas [93].

Uma isoterma de adsorção é um diagrama que permite estudar e compreender os processos de equilíbrio envolvidos em um sistema, a uma determinada temperatura. Com relação aos conceitos de adsorção já abordados, a partir dos dados experimentais q e C , pode ser construído um modelo matemático para investigar um sistema e obter a informação acerca de sua máxima capacidade de adsorção [93] [94].

Assim, a partir de soluções com concentrações iniciais conhecidas (C_0) e da adição de um volume (V) de cada uma delas à superfície do adsorvente, ocorre uma transferência do adsorbato para o adsorvente e um novo equilíbrio é estabelecido, cuja concentração final pode ser representada por C_e e determinada por métodos analíticos. A capacidade de adsorção é representada por q e pode ser obtida matematicamente [93].

Considerando que a quantidade de adsorbato removido da solução seja igual à quantidade de adsorbato adsorvido pelo adsorvente, pode-se obter a seguinte equação:

$$q = \frac{(C_0 - C_e)V}{m} \quad (\text{Equação 12})$$

As unidades de q , $C_{(0,e)}$, V e m são dadas em mg/g, mg/L, mL e mg, respectivamente.

A Figura 15 representa um gráfico de uma isoterma de adsorção elaborado a partir de valores estabelecidos para as variáveis citadas acima.

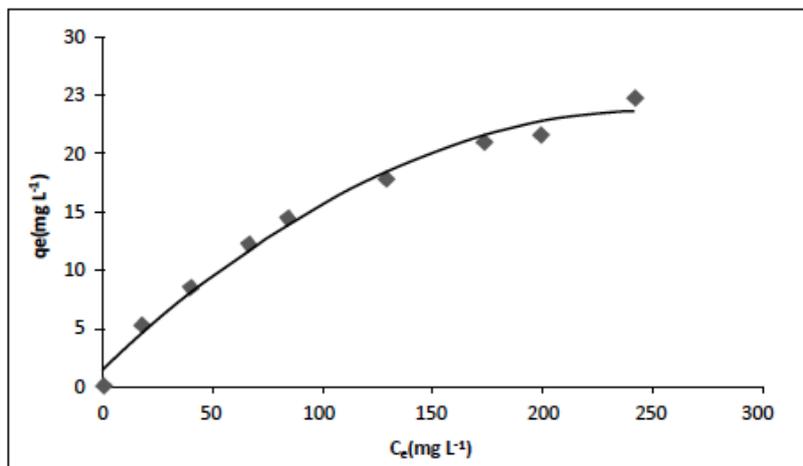


Figura 15. Representação gráfica de uma isoterma de adsorção. Retirada de [93].

Algumas conclusões importantes podem ser tiradas ao se observar as tendências das curvas de adsorção, conforme exposto na Figura 16.

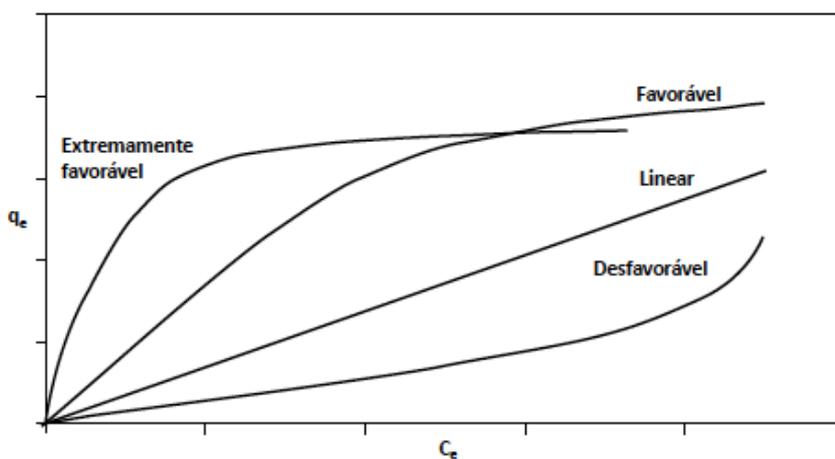


Figura 16. Tendências das isotermas de adsorção. Retirada de [93].

O favorecimento ou não de um processo de adsorção tem relação direta com a massa de adsorbato adsorvida, a massa da unidade do adsorbato e a concentração do adsorbato na fase líquida/gás, conforme estrutura da Tabela 4.

Tabela 4. Representação da relação da quantidade de massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente e tendências das isotermas (adaptado de [95]).

| Tendências das isotermas. | Massa de adsorbato retida por unidade de massa do adsorvente. | Parâmetro de equilíbrio - R |
|------------------------------------|--|-----------------------------|
| Extremamente favorável / favorável | Alta para uma baixa concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida | 0 < R < 1 |
| Linear | Proporcional a concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida. | R = 1 |
| Desfavorável | Baixa e independente da concentração de equilíbrio do adsorbato na fase líquida | R > 1 |

O parâmetro de equilíbrio adimensional é calculado por meio da equação:

$$R_L = \frac{1}{1 + (K \times C_0)} \quad (\text{Equação 13})$$

K refere-se à constante de adsorção e C_0 é a concentração inicial do adsorbato (mg/L).

Dentre as várias propostas de isotermas para estudar sistemas de adsorção, neste trabalho foram utilizadas as isotermas de Langmuir, Frumkin e Freundlich, que serão apresentadas a seguir [93][94][95][96].

4.2.1 Isoterma de Langmuir

A isoterma de Langmuir é um modelo proposto para estudar sistemas contendo soluções aquosas e possui em sua conjectura um número definido de sítios com energia equivalente e somente uma molécula é adsorvida em cada sítio. Além disso, não há interação entre as moléculas adsorvidas pressupondo uma monocamada ideal.

Quando o sistema atinge o equilíbrio, o modelo de isoterma de Langmuir prevê que as velocidades de adsorção e de dessorção do adsorbato, para sítios superficiais, devem ser consideradas iguais [93].

Logo, a taxa de adsorção é dada por:

$$K_a = k_1 C_e (1 - \theta) \quad (\text{Equação 14})$$

Onde K_1 representa a constante de adsorção e θ o grau de cobertura do adsorbato.

A taxa de dessorção é dada por:

$$K_d = k_2\theta \text{ (Equação 15)}$$

Onde K_2 representa a constante de dessorção.

Quando as taxas no equilíbrio são igualadas, a seguinte equação pode ser obtida:

$$k_1C_e(1 - \theta) = k_2\theta \text{ (Equação 16)}$$

Adota-se:

$$K_{ads} = \frac{k_1}{k_2} \text{ (Equação 17)}$$

Reajustando os termos da equação, a equação de Langmuir pode ser expressa da seguinte forma:

$$\theta = \frac{K_{ads}C_e}{1+K_{ads}C_e} \text{ (Equação 18)}$$

De outra forma, pode-se optar também por trabalhar em termos de quantidade q , ou seja, a quantidade de soluto adsorvido por massa de adsorvente, ao invés de θ .

$$q_{eq} = q_{max} \frac{K_{ads}C_e}{1+K_{ads}C_e} \text{ (Equação 19)}$$

A constante de adsorção pode ser encontrada fazendo uso da Equação (19) linearizada:

$$\frac{C_e}{\theta} = C_e + \frac{1}{K_{ads}} \text{ (Equação 20)}$$

Neste trabalho foram utilizadas as equações 19 e 21 para investigar a ocorrência ou não da adsorção das substâncias estudadas nos substratos SERS-ativos. A relação $\frac{I}{I_0}$ foi utilizada para determinar os valores de recobrimento superficial, dado por θ . I

representa a intensidade SERS da substância investigada em uma determinada concentração, enquanto I_0 representa a intensidade SERS da substância investigada na condição de superfície saturada, ou seja, monocamada formada.

4.2.2 Isoterma de Frumkin

No modelo de Frumkin, as moléculas adsorvidas podem interagir entre si formando uma monocamada considerada não ideal. Diferentemente do estabelecido para isotermas de Langmuir, onde os sítios de adsorção possuem energia equivalente, no modelo de Frumkin, a energia livre de adsorção é considerada uma função linear da cobertura. Assim, a isoterma de Frumkin é representada pela equação [93][94]:

$$\theta = \frac{K_{ads} C_e^{2g\theta}}{1 + K_{ads} C_e^{2g\theta}} \text{ (Equação 21)}$$

K_{ads} = constante de equilíbrio de adsorção;

C = concentração da solução;

g = parâmetro de interação entre as espécies adsorvidas.

A interação é repulsiva quando $g < 0$ e atrativa quando $g > 0$. O sistema se comporta conforme o modelo de Langmuir quando $g = 0$.

4.2.3 Isoterma de Freundlich

Esse modelo correlaciona, numa equação empírica, a entalpia de adsorção e a concentração do adsorbato. Assim, ao longo do processo de adsorção, ocorre uma diminuição da energia de adsorção [93] [97]. A equação da isoterma de Freundlich é apresentada da seguinte forma:

$$q = K C_{eq}^{1/n} \text{ (Equação 22)}$$

K = constante de proporcionalidade

n = valor empírico

O valor de n informa se o processo de adsorção é favorável ($1 < n < 10$).

Outra forma de se investigar um sistema adsorvente/adsorbato é linearizando a equação da isoterma de Freundlich, uma vez que esse modelo não se aplica a sistemas onde a variação da quantidade de material adsorvido em relação a concentração de adsorbato deixa de ocorrer. A forma linearizada da equação da isoterma de Freundlich é apresentada a seguir:

$$\ln q_e = \ln K + \frac{1}{n} + \ln C_{eq} \text{ (Equação 23)}$$

Para este trabalho, será assumida uma relação de proporcionalidade entre a intensidade SERS (I_{SERS}) e a quantidade de material na superfície do adsorvente. Assim, $I_{SERS} = kq_e$ e a forma linearizada da equação da isoterma de Freundlich é apresentada da seguinte forma:

$$\ln I_{SERS} = \ln k + \frac{1}{n} \ln C \text{ (Equação 24)}$$

4.3. Quimiometria

A quimiometria surgiu diante da necessidade da organização, análise e obtenção de informações de uma grande quantidade de dados provenientes de análises químicas e instrumentais modernas. A definição de quimiometria adotada neste trabalho é a definição original estabelecida pela Sociedade de Quimiometria: “A quimiometria é a aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas à química”. Com a aplicação destas ferramentas é possível planejar e otimizar procedimentos experimentais assim como extrair o máximo de informações químicas relevantes através da análise dos dados. Por meio dessas informações se obtém um melhor conhecimento dos sistemas químicos, favorecendo o desenvolvimento de novos métodos de análise, materiais, instrumentos, etc. [98].

Nas últimas décadas, o uso de métodos espectroscópicos associados com ferramentas quimiométricas ganhou destaque em análises quantitativas. Neste trabalho, os seguintes modelos de calibração e discriminação serão adotados: PCA, PLS-DA e SVM-DA [98] [99].

A seguir serão apresentadas de forma resumida os princípios dos modelos de calibração e discriminação que serão abordados nesse trabalho, iniciando pela ferramenta quimiométrica de PCA, que pode ser considerada a base para os demais métodos multivariados de calibração e discriminação.

4.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

PCA é um modelo que tem como objetivo realizar a decomposição de uma matriz de dados com o intuito de reduzir sua dimensionalidade, sem afetar a relação entre as amostras. Dessa forma, as informações mais relevantes dos dados são representadas em um número menor de variáveis, facilitando a observação das relações entre objetos e identificar as variáveis que mais contribuem para essa informação. Além de facilitar a interpretação dos dados, a PCA ainda torna possível a detecção de *outliers* (ou seja, amostras que não podem ser consideradas parte de uma distribuição que caracteriza o restante dos dados, por apresentarem alguma característica distinta (interferente, estarem em uma condição diferente, etc.)) e de servir de base estrutural para modelos de classificação e calibração [98].

Assim, a PCA pode ser definida como um processo de decomposição matricial que permite criar um conjunto de autovetores de forma a representar o máximo de variância dos dados no menor número de variáveis. As amostras são organizadas em uma matriz de dados \mathbf{X} (n,m) que contém as amostras representadas nas n linhas e as variáveis

nas m colunas. O cálculo das componentes principais geralmente é realizado com as colunas/variáveis de \mathbf{X} centradas na média, resultando em uma matriz de escores $\mathbf{T}(n,A)$, uma matriz de pesos $\mathbf{P}^T(A,m)$ e os resíduos do modelo, $\mathbf{E}(n,m)$, conforme equação a seguir:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 25})$$

Sendo que n = número de espectros;

m = número de comprimentos de onda selecionados; e

A = número de componentes principais.

4.3.2 Discriminação por Mínimos Quadrados Parcial (PLS-DA)

Os modelos PLS-DA utilizam amostras com classes conhecidas na fase de treinamento, na qual o vetor y para cada modelo é composto por valores numéricos binários (1 e 0) e atribuídos a cada uma das classes a serem discriminadas. As equações principais envolvidas na decomposição dos dados são apresentadas abaixo [100]:

$$\mathbf{X} = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a \mathbf{p}_a^T + \mathbf{E} \quad (\text{Equação 26})$$

$$\mathbf{y} = \sum_{a=1}^A \mathbf{t}_a \mathbf{q}_a^T + \mathbf{f} \quad (\text{Equação 27})$$

Sendo que \mathbf{t}_a = vetor de escores;

\mathbf{p}_a e \mathbf{q}_a = pesos referentes à primeira variável latente;

\mathbf{E} = matriz de erros de \mathbf{X} ; e

\mathbf{f} = matriz de erros de y .

Diversos pré-processamentos e métodos de seleção de variáveis podem ser utilizados para maximizar o modelo. O menor valor de erro de classificação da validação cruzada (CVCE- *Cross Validation Classification Error*) é utilizado como referência para a escolha do número de variáveis latentes A , do método de pré-processamento e da seleção de variáveis da matriz \mathbf{X} . O CVCE não exclui amostras que apresentam elevados erros na estimativa do valor classe y , se estiverem corretamente classificadas, mas esses erros podem ser uma indicação de que a amostra possui características diferentes das outras amostras do grupo de treinamento ou ainda erro nos dados instrumentais (*outlier*),

que podem ser excluídos do conjunto de treinamento. Outro critério que pode ser adotado é a exclusão de amostras que apresentam valores dos parâmetros estatísticos de *Hotelling* T^2 e resíduo espectral Q acima dos limites de 99,9%. Os parâmetros de *Hotelling* T^2 e resíduos Q podem ainda ser aplicados para as amostras do conjunto de validação [98] [100].

Já o valor da raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV, *Root Mean Square Error of Cross Validation*), permite a otimização do modelo PLS-DA a partir da minimização dos erros de estimativa dos valores de classe, pois tende a proporcionar uma maior separação dos valores estimados para a classe discriminada ($y = 1$) em relação às outras classes ($y = 0$) [100].

Depois da otimização do modelo, calcula-se o limite de discriminação baseado na dispersão dos valores estimados de y para o grupo de treinamento para minimizar a ocorrência dos erros positivos falsos e negativos de acordo com o teorema de Bayes, que considera a discriminação das amostras em duas classes, uma com as amostras da espécie atribuída o valor de classe $y=1$ e a outra com as demais amostras com valor de classe $y=0$ (Ex.: classe sexo feminino ($y= 1$) e masculino ($y= 0$)). A partir dos valores estimados para grupo de treinamento são estimadas as probabilidades a priori ($P(A)$ e $P(B)$) e as funções de densidade de probabilidade ($p(\hat{y}_i|A)$ e $p(\hat{y}_i|B)$) de cada classe. O limite de discriminação é determinado pelo valor de classe onde as probabilidades de uma amostra ser atribuída à classe A e B são iguais: $P(\hat{y}_i|A)=P(\hat{y}_i|B)$, conforme equação a seguir

$$p(Y|A).P(A) = P(Y|B).P(B) \quad (\text{Equação 28})$$

Onde se tem:

$$p(Y|A) = \frac{1}{s_A\sqrt{2\pi}} e^{\frac{-1}{2}(\frac{y-\bar{y}_A}{s_A})^2} \quad (\text{Equação 29})$$

$$p(Y|B) = \frac{1}{s_B\sqrt{2\pi}} e^{\frac{-1}{2}(\frac{y-\bar{y}_B}{s_B})^2} \quad (\text{Equação 30})$$

$$P(A) = \frac{I_A}{I_A+I_B} \quad (\text{Equação 31})$$

$$P(B) = \frac{I_B}{I_A+I_B} \quad (\text{Equação 32})$$

Sendo que $p(\hat{y}_i|A)$ = função de densidade de probabilidade para a classe A;

$p(\hat{y}_i|B)$ = função de densidade de probabilidade para a classe B;

s_A = desvio padrão da estimativa obtida no conjunto de treinamento para a classe A;

s_B = desvio padrão da estimativa obtida no conjunto de treinamento para a classes B;

respectivamente;

\bar{y}_A = média das estimativas de y obtidas no conjunto treinamento para a classe A

\bar{y}_B = média das estimativas de y obtidas no conjunto treinamento para a classes B;

$P(A)$ = probabilidade a priori obtida no conjunto treinamento para a classe A;

$P(B)$ = probabilidade a priori obtida no conjunto treinamento para a classe B;

I_A = número de amostras do conjunto de treinamento para a classe A;

I_B = número de amostras do conjunto de treinamento para a classe B;

Considerando as probabilidades de ocorrência das classes A e B iguais ($P(A) = P(B)$), obtém-se a solução simplificada [100]:

$$(S_B^2 - S_A^2)y^2 + (2S_A^2\bar{y}_B - 2S_B^2\bar{y}_A)y + S_B^2\bar{y}_A^2 - S_A^2\bar{y}_B^2 - 2S_A^2S_B^2 \ln\left[\frac{S_B}{S_A}\right] = 0 \quad (\text{Equação 33})$$

Uma vez que a equação é de segundo grau e que a única variável é y, ao substituir os valores experimentais e resolvendo a equação, o limite de discriminação será uma das raízes da equação [100].

Para avaliar as os modelos de discriminação são utilizados figuras de mérito, onde o percentual de amostras que apresentaram erros falso positivos é conhecido como taxa de falsos positivos (TFP), conforme equação [100].

$$TFP = \frac{FP}{FP+VN} \times 100 \quad (\text{Equação 34})$$

Onde se tem FP= número absoluto de falsos positivos

VN= número absoluto de verdadeiros negativos

A taxa de taxa de falsos negativos (TFN) se refere ao percentual de amostras com erros falso negativos, conforme equação:

$$TFN = \frac{FN}{FN+VP} \times 100 \quad (\text{Equação 35})$$

Onde se tem FN= número absoluto de falsos negativos

VP= número absoluto de verdadeiros positivos

O percentual de amostras que pertencem às outras classes ($y=0$) é conhecido como especificidade (SPEC), conforme equação:

$$SPEC = \frac{VN}{VN+FP} \times 100 \quad (\text{Equação 36})$$

Onde se tem VN= número absoluto de verdadeiros negativos

FP= número absoluto de falsos positivos

Tem-se ainda a sensibilidade (SEN) que representa o percentual de amostras pertencentes à classe discriminada que foram identificados como sendo dessa classe, cuja equação pode ser encontrada a seguir:

$$SEN = \frac{VP}{VP+FN} \times 100 \quad (\text{Equação 37})$$

Onde se tem VP= número absoluto de verdadeiros positivos

FN= número absoluto de falsos negativos

A taxa de eficiência (TEF) dos modelos de discriminação pode ser obtida conforme a equação:

$$TEF = \sqrt{\frac{VP \cdot VN}{(VP + FN) * (VN + FP)}} \quad (\text{Equação 38})$$

4.3.3 Máquinas de vetores de suporte (SVM)

SVM são baseadas na teoria de aprendizado estatístico e têm ganhado destaque em diversos tipos de aplicação nos últimos anos. Seus resultados comparam-se com os obtidos pelos algoritmos das redes neurais artificiais tradicionais, tendo a vantagem de convergirem para um mínimo global e apresentarem resultados superiores em alguns casos [101].

Foram introduzidas por Vapnik, em 1992, e possuem, como principais características, uma boa capacidade de generalização, ou seja, a capacidade de previsão

correta da classe de novos dados do mesmo domínio em que utilizado no aprendizado. E ainda, apresenta robustez em grandes dimensões e convexidade do problema de otimização formulado em seu treinamento, que leva a existir um único mínimo global ou limite da função [101][102].

De modo geral, é utilizada a indução como técnica de aprendizagem de máquina, na qual são obtidas conclusões genéricas partindo de um conjunto particular de exemplos. Existem dois tipos principais de aprendizagem indutivas: o supervisionado e não supervisionado. Neste trabalho será explorado o aprendizado supervisionado, ou seja, o processo de classificação considera classes que são previamente definidas. Para que seja possível a determinação dos parâmetros característicos de cada classe, uma etapa de treinamento deve ser executada antes da aplicação do algoritmo de classificação.

Assim, um conjunto de exemplos denominado (\mathbf{x}_i, y_i) , onde \mathbf{x}_i representa um exemplo e y_i uma classe ou rótulo. Então, um modelo ou hipótese é produzido para realizar a classificação dos novos dados. Anteriormente a isso, a classificação a partir de uma amostra de dados recebe o nome de treinamento, ou seja, o classificador é uma função f que recebe um dado \mathbf{x} fornecendo uma predição y [101], conforme observado na Figura 17.

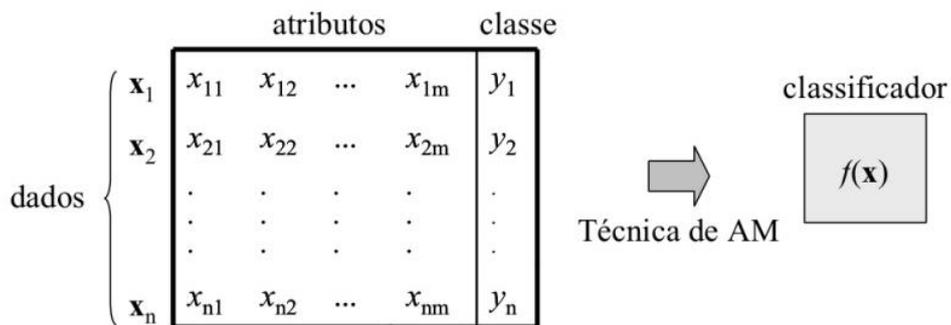


Figura 17. Indução de classificador em aprendizado supervisionado. Retirado de [101].

O processo que determina a qual classe uma determinada amostra pertence pode ser realizada por meio de funções conhecidas como superfícies de decisões, que dividem os espaços de características em regiões. Os algoritmos de classificação podem ser separados em dois grupos: lineares e não lineares. Os lineares têm como característica que a sua superfície de decisão é uma reta ou um hiperplano quando seu vetor de características possui mais de duas classes. Para os dados cujas características não são linearmente separáveis a superfície de decisão é não linear [101].

Assim, o SVM tem como princípio básico a construção de um hiperplano como superfície de decisão com margem de separação entre as classes maximizadas. Essa margem pode ser definida como a distância entre os pontos dos dados de ambas as classes mais próximas ao hiperplano. Ou seja, no SVM, uma medida instrumental referente a uma amostra é representada por um vetor n-dimensional, no plano n-dimensional R^n , onde se pretende separar tais pontos por um plano dimensional (n-1) ou também chamado de classificador linear. Existem diferentes tipos de hiperplanos para classificar dados e o mais adequado deles é aquele que representa a melhor separação ou margem, entre as duas classes (quanto maior a margem, menor o erro de generalização do classificador). Os padrões de treinamento, conhecidos como vetores de suporte, carregam as informações relevantes para os problemas de classificação [103]. A representação do algoritmo SVM pode ser vista na Figura 18.

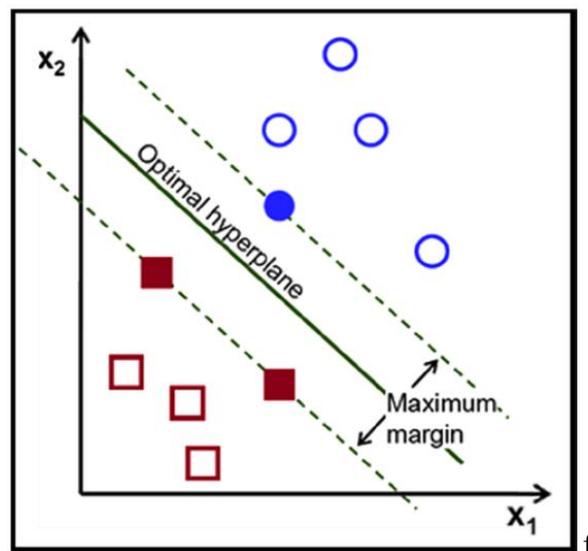


Figura 18. Representação do algoritmo SVM que encontra o hiperplano que maximiza a maior distância mínima entre os vetores de apoio. Retirada de [104].

O SVM utiliza funções de Kernel para a classificação de dados não linearmente separáveis, que tem como ideia a utilização destas funções predefinidas em um novo espaço de dimensão superior, onde um separador linear seria capaz de discriminar entre as diferentes classes, conforme Equação 40 [101].

$$K(x_i, x_j) = \Phi(x_i) \cdot \Phi(x_j) \quad (\text{Equação 39})$$

Essa equação tem como vantagem a representação de espaços abstratos por meio de cálculos simples. Ainda neste contexto, de forma resumida, quando as condições do teorema de Mercer é satisfeito por Kernel são criadas matrizes positivas semi-definidas K , podendo ser expandido como uma série de produtos de funções normais, em que cada elemento K_{ij} é definido por $K_{ij} = K(x_i, x_j)$, para todo $i, j = 1, \dots, n$ [101][105].

Na análise discriminante (DA), um grupo de amostras pode ser classificado segundo a possibilidade do mesmo se encaixar em uma das classes possíveis. Assim, a análise por SVM-DA sugere o grau de semelhança entre o conjunto de amostras e as classes indicadas no processo de treinamento, para realizar a separação das amostras na etapa de validação.

Em problemas lineares, o PLS-DA pode fornecer modelos muito eficientes e robustos. No entanto, na presença de um problema não linear, o SVM-DA tem mostrado melhores resultados superiores em várias aplicações. Resumidamente, para problemas de discriminação, seu método também fornece uma separação binária entre duas classes, resolvendo um problema de programação quadrática, usando um espaço de características induzido pela função kernel, levando a modelos globais que muitas vezes de solução única. A escolha da função do kernel dependerá de cada caso. No entanto, a função do kernel mais utilizada é a função de base radial (RBF). Mais detalhes dos algoritmos PLS-DA e SVM-DA podem ser obtidos em referências específicas [106][107][108][109][110][111][112][113].

4.4. Síntese de Nanopartículas Metálicas

4.4.1 Síntese Fotoquímica de Nanopartículas de Ouro

Dentre as metodologias mais utilizadas na formação de nanopartículas metálicas, o uso de rotas fotoquímicas tem ganhado destaque, em especial pelos métodos convencionais apresentarem algumas desvantagens como a toxicidade de agentes redutores, elevado custo e formação de resíduos [114]. A Figura 19, apresenta um esquema da síntese fotoquímica de nanopartículas.

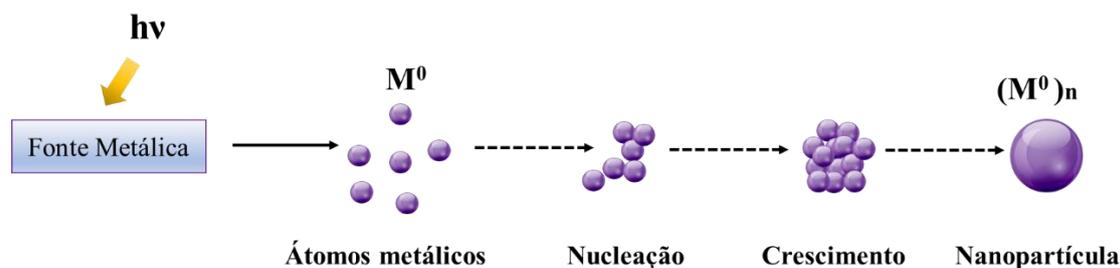


Figura 19. Representação esquemática da síntese fotoquímica de nanopartículas.

No campo da química coloidal, o uso da luz aparece como uma ferramenta poderosa para o controle do tamanho, formato e composição de nanopartículas. Trazendo ainda como vantagens a redução de custos, a maior homogeneidade do agente redutor e controle da redução do íon metálico pelas variações no comprimento de onda ou do tempo de exposição à radiação [114].

A fraca fotoestabilidade de complexos de metais de transição sob luz UV induz uma dissociação gradual dos íons metálicos do complexo para produzir aglomerados metálicos estáveis ou coloides. A irradiação do AuCl_4^- induz a fotólise do complexo para produzir Au^0 , conforme demonstrado na Figura 20 [114].

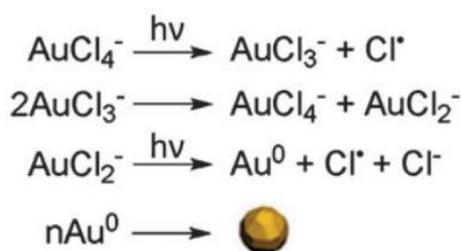


Figura 20. Representação da fotólise do ácido tetracloriáurico por radiação UV que leva à formação de núcleos metálicos e ao crescimento adicional das partículas. Retirado de [114].

4.4.2 Poli(etileno imina) (PEI)

Polímeros são utilizados para estabilizar sistemas coloidais e, além disso, imprimem outras vantagens como a proteção da superfície de nanopartículas metálicas contra o meio atmosférico e outros agentes desestabilizadores; promovem atração ou repulsão com moléculas específicas e permite a transmissão da luz na dispersão coloidal.

PEI é um dos polímeros empregados para essa finalidade. São encontrados dois tipos de arranjo para esse material: linear e ramificado. Neste trabalho foi utilizada a forma ramificada e de baixo peso molecular, representado pela Figura 21 [115].

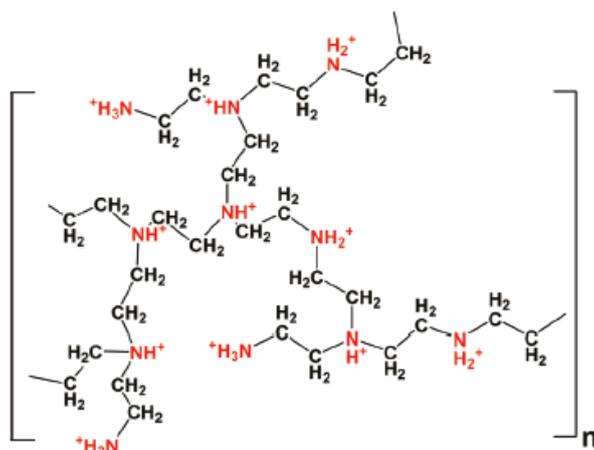


Figura 21. Estrutura do PEI. Retirado de [115].

PEI é flexível e muito hidrofílica, sendo sua estrutura constituída de 25% de aminas primárias (pKa – 4,5), 50% de iminas secundárias (pKa = 6,7) e 25% de iminas terciárias (pKa = 11,6). Em ambientes cujo pH = 7 o PEI se comporta como um polieletrólito, enquanto que, para ambientes com pH < 5, a molécula se apresenta protonada. Dentre as aplicações desse polímero na sua forma ramificada, destacam-se a formulação de espessantes, agentes floculantes e adesivos [115].

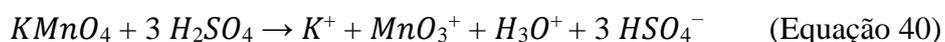
4.4.3 Óxido de Grafeno

A descoberta do grafeno rendeu o prêmio Nobel de Física de 2010 aos pesquisadores da Universidade de Manchester envolvidos neste estudo, e é considerada uma das maiores realizações científicas do século XXI. Sua estrutura é representada por uma camada monoatômica de carbonos com hibridização sp^2 , o que permite a cada um desses átomos possuir um elétron delocalizado no orbital p_z . Desta forma, esse material possui propriedades particulares como condutividade elétrica (que não é alta, mas é bipolar, ou seja, conduz elétrons e lacunas), térmica, transparência óptica, resistência mecânica, flexibilidade e elevada área superficial [116].

Sua estrutura modificada na forma de óxido de grafeno (GO) tem despertado grande interesse por apresentar algumas vantagens em relação a sua forma pura, como solubilidade em solventes comuns (ex: água), o que facilita processos de funcionalização e de deposição de filmes a custos reduzidos. E ainda, os grupos introduzidos na oxidação por meio de interações das ligações π incorporando grupos funcionais como carbonilas (C=O) carboxilas (COOH), epóxidos (C-O-C) e hidroxilas (C-OH) promovem a repulsão

eletrostática entre as folhas de GO o que implica numa baixa aglomeração das folhas e aprimoram a estabilidade dos colóides [116] [117].

A estrutura do GO depende da rota sintética e do grau de oxidação sofrido pelo material. Com relação a rota sintética, existe uma variedade de formas de se obter o óxido de grafeno. A rota de síntese mais conhecida é a proposta por Hummers e Offeman que consiste na oxidação dos flocos de grafite utilizando permanganato de potássio e ácido sulfúrico concentrado. O produto da reação entre o permanganato de potássio e o ácido sulfúrico, que consiste uma etapa primária, é a formação da espécie ativa heptóxido de dimanganês (Mn_2O_7), conforme apresentado nas equações das reações 41 e 42 [116][117].



O heptóxido de dimanganês exerce a função de agente oxidante das folhas de grafite e, por meio de uma oxidação seletiva, que atacam as duplas ligações aromáticas, promovem alterações na estrutura do grafite e no mecanismo de oxidação. A propriedade de oxidação seletiva do Mn_2O_7 foi demonstrada por Tromel e Russ. O material oxidado é submetido ao processo de sonificação para possibilitar a esfoliação mecânica, separando fisicamente as folhas de óxido de grafite e dando origem ao óxido de grafeno [116][117].

As estruturas propostas para o GO são amorfas e não apresentam estequiometria bem definida. Além disso, o material possui propriedade hidrofílica sendo solúvel em solventes polares. Isso pode ser explicado pela distribuição dos grupos oxigenados ao longo da folha. O modelo mais usual de representação do GO na literatura foi proposto por Lerf e Klinowski e pode ser observado na Figura 22 [118].

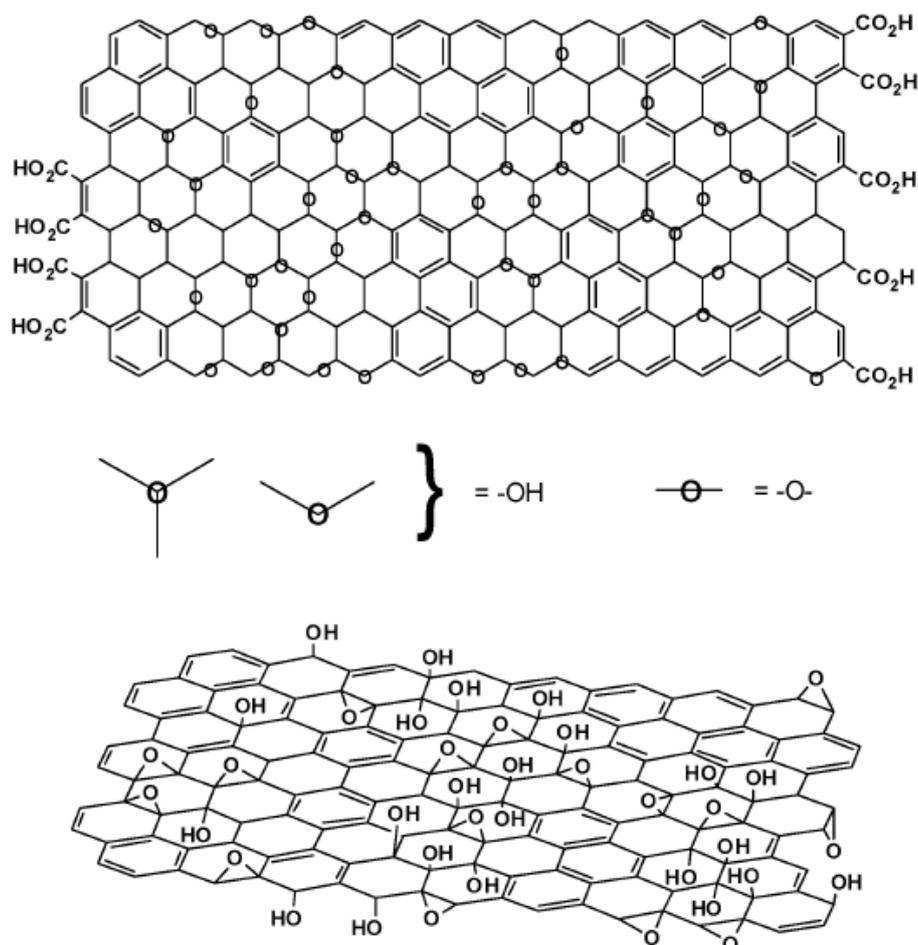


Figura 22. Representação da estrutura de GO proposta por Lerf e Knowski. Na imagem acima, em duas dimensões, observa-se a presença de grupos de carboxila nas extremidades da estrutura, enquanto que, na imagem inferior, em três dimensões, é observada a presença de grupos oxigenados ao longo da estrutura [118].

4.4.4 Nanobastões de Ouro (AuNBs)

As propriedades óticas de uma NP metálica estão relacionadas ao seu tamanho, forma e interação inter-partículas, possibilitando sua aplicação em diferentes regiões espectrais. Os AuNBs podem ser obtidos por uma variedade de rotas sintéticas de fácil execução. Ressalta-se então, que as propriedades plasmônicas dos NBs são diferentes das apresentadas por nanopartículas esféricas, com destaque à LSPR, que são modos eletromagnéticos associados as oscilações da nuvem eletrônica da região adjacente à superfície da nanopartícula. Na excitação ressonante, ocorre uma concentração do campo elétrico nessa região [119]. Nos AuNBs, esse fenômeno intensifica o campo elétrico em seu entorno. Desta forma, quando excitadas por uma radiação ressonante, três fenômenos são observados [119]:

- 1- Pares elétron-buraco são gerados
- 2- Termonização e emissão de fótons
- 3- Espalhamento da luz incidente

Esses processos foto-físicos podem ser observados na Figura 23 que compara os espectros de absorção UV-Vis de nanopartículas esféricas e bastões de Au. Nessa faixa de radiação ocorre uma excitação do modo de ressonância do plasmon longitudinal promovendo absorção e espalhamento da luz. A absorção ocorre por meio da oscilação da nuvem eletrônica na direção longitudinal e transversal. A depender de como a radiação incide na nanopartícula, em função do seu comprimento/largura, pode ocorrer uma variação da quantidade de radiação absorvida, que por sua vez, confere a esse tipo de nanomaterial diferentes propriedades ópticas. O comprimento de onda do plasmon longitudinal dos AuNBs é muito sensível ao meio dielétrico, possibilitando utilizá-los como sondas em biosensores [120].

O forte campo elétrico gerado ao redor dos AuNBs na condição de ressonância, lhes conferem um comportamento condizente ao de “nanoantenas”, amplificando o campo eletromagnético ao redor da superfície. Esse comportamento contribui fortemente para o efeito SERS. Alguns estudos têm abordado esse comportamento aplicado ao SERS, especialmente por conta desta intensificação que é provocada pela curvatura do material [121]. No estudo realizado por Zuloaga e colaboradores foi observado que as curvas de absorção ópticas exibem diferentes regiões plasmônicas dependendo da direção longitudinal ou transversal, sendo mais intensa nas extremidades, onde a curvatura é maior [122]. Outro estudo demonstra um efeito SERS com maior intensidade observado em AuNBs quando comparado com AuNPs esféricas. De acordo com os autores desse trabalho, esse fenômeno é ocasionado pela excitação parcial da banda de plasmon de superfície do eixo longitudinal e também pela contribuição do efeito químico devido as fortes ligações do adsorbato na face {110} [123].

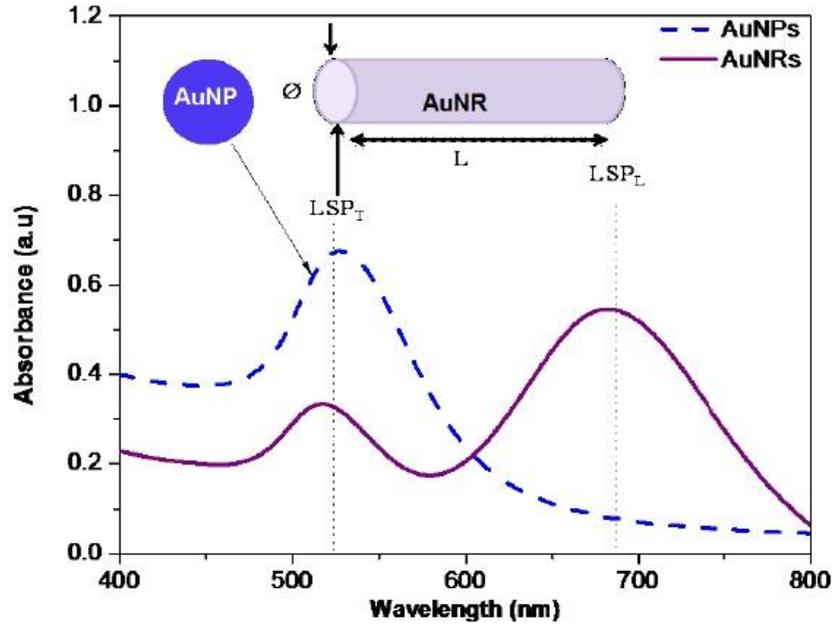


Figura 23– Espectros de absorção UV-Vis-NIR de suspensões de AuNPs e AuNRs com as bandas de absorção relacionadas ao plasmon de superfície transversal e ao plasmon de superfície longitudinal. Retirado de [124].

O espectro de absorção é alterado de acordo com as diferentes morfologias das nanopartículas. Enquanto no espectro de nanopartículas esféricas se observa apenas um pico de absorção (AuNPs ca. 520nm), que por serem simétricas o elétron se restringe uma direção preferencial de movimento, os AuNBs, apresentam duas bandas de absorção, um atribuído à oscilação coletiva dos elétrons nas extremidades dos nanobastões e outra banda mais intensa, devido à ressonância de plasmon ao longo do comprimento dos nanobastões [121] [125].

A transição referente ao plasmon de superfície transversal (LSPR_T) ocorre no mesmo comprimento de onda que em partículas esféricas, enquanto a transição longitudinal (LSPR_L) sofre um deslocamento para a região do infravermelho próximo, que escala com a razão de aspecto (AR) (razão entre o comprimento e o diâmetro da nanopartícula) das AuNBs, conforme observado na Figura 24 [126].

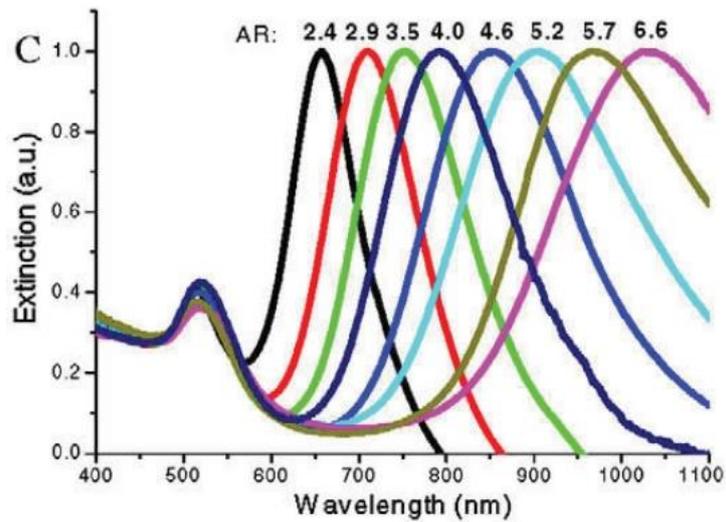


Figura 24. Variação do comprimento de onda de absorção de acordo com a AR dos AuNBs. Retirado de [126].

De modo geral, quanto à sua estrutura cristalográfica, os AuNBs, apresentam uma superfície fechada pelos planos $\{100\}$, $\{110\}$ e $\{001\}$, como pode ser observado na Figura 25. [127].

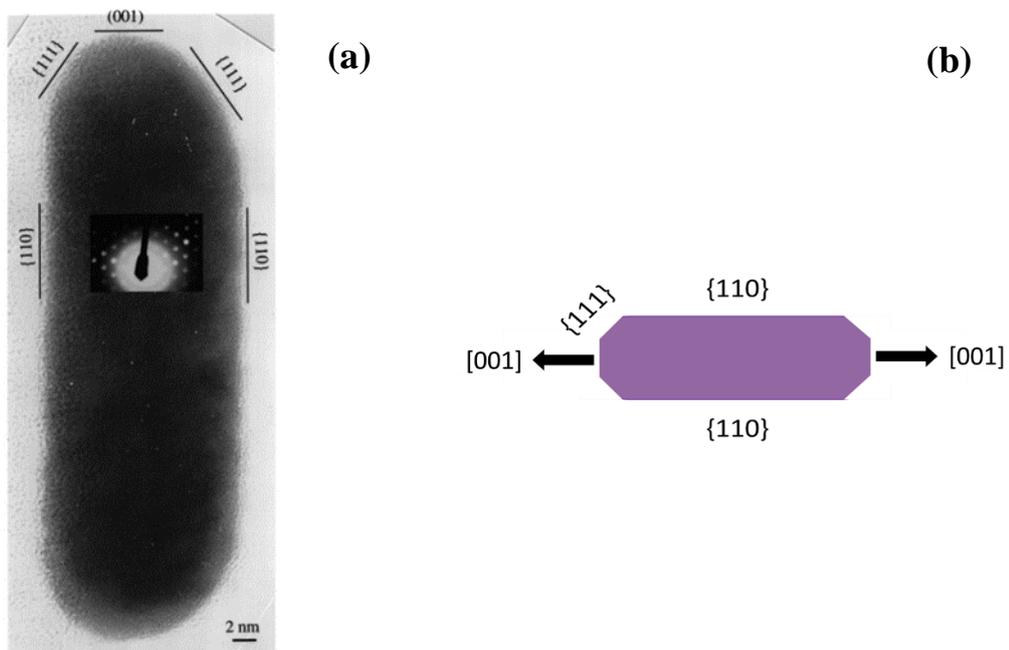


Figura 25. Imagem TEM de um AuNB orientado ao longo da direção $[001]$, exibindo os planos cristalinos $\{100\}$, $\{111\}$ e $\{110\}$ do bastão (a) (retirado de [127]) e uma representação esquemática da do crescimento de um AuNB na direção axial $[001]$ (b).

Essa estrutura é formada quando os íons Au^{3+} são reduzidos preferencialmente nas faces $\{001\}$ na fase de nucleação e as faces $\{110\}$ são adsorvidas por moléculas de CTAB, estabilizando-as e promovendo um crescimento na direção axial $[001]$.

Diversos mecanismos foram propostos para síntese de AuNBs. Estudos apontam que a presença do sal de prata é fundamental para a formação dos nanobastões, especialmente, em processos fotoquímicos. Conforme pode ser observado na Figura 26, a redução de sais de ouro e de prata na presença de CTAB produz as nanopartículas metálicas de ouro e de prata, respectivamente. Ahmed e colaboradores propuseram que as nanopartículas de prata interagem com a estrutura micelar do CTAB, formando um molde para o crescimento dos AuNBs [120]. No estudo de Abdelrasoul e colaboradores foi utilizado ainda a acetona e o ácido ascórbico com a finalidade de promover a redução do íon de ouro para Au^0 e a formação de um complexo com o metal, respectivamente. Por fim, ao inserir a radiação UV, o íon Au^+ é reduzido para Au^0 [114] [128].

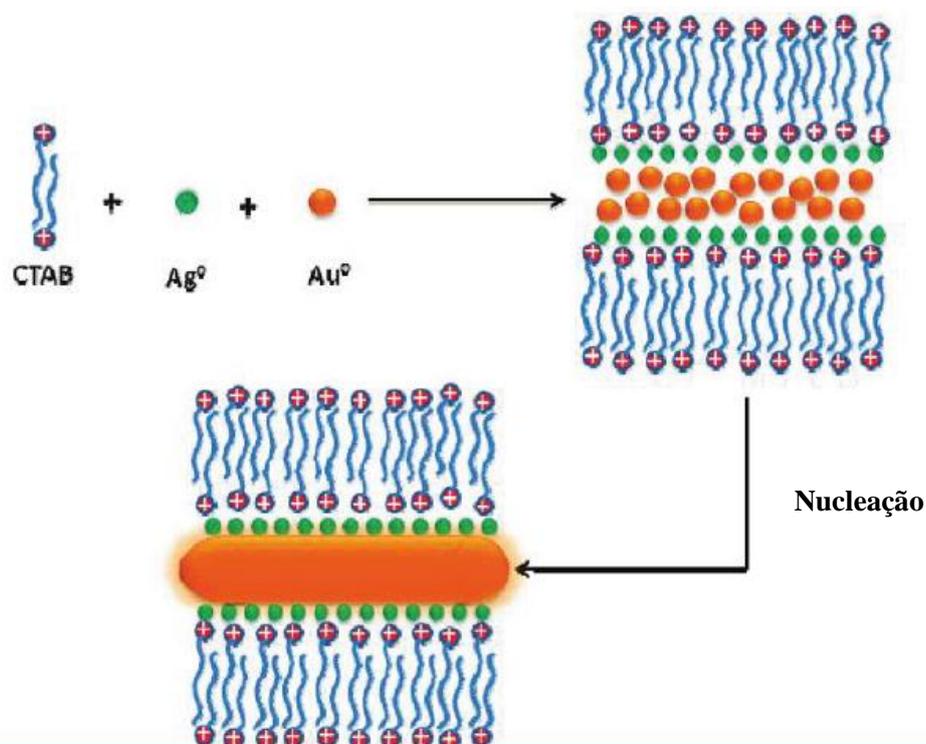


Figura 26. Representação esquemática da formação de AuNBs. Adaptado de [120].

5. Materiais e Métodos

5.1. Comitê de ética

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (FS/UnB), sob o número 42304220.0.0000.0030 de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

5.2. Materiais e Reagentes utilizados

- Acetona P.A. (Sigma Aldrich);
- Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$ 99,0% - VETEC);
- Ácido clorídrico (HCl 36% - VETEC);
- Ácido nítrico (HNO_3 65% - Hexis).
- Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4 96% v/v – Vetec);
- Ácido tetracloroáurico(III) tri-hidratado ($HAuCl_4 \cdot 3 H_2O$ 99% - Sigma Aldrich);
- Água ultrapura (tipo I);
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB- Merck);
- Cicloexano P.A. (Sigma Aldrich);
- Cocaína na forma cloridrato (Amostra apreendida cedida pela PF, com teor de pureza calculado pela central analítica da UnB de 88,27%);
- Eletrodo NiTSPc (Sigma Aldrich);
- Flakes de grafeno (>100 mesh - Sigma Aldrich);
- Hidróxido de amônio (NH_4OH 30% v/v – Vetec);
- Isopropóxido de titânio (IV) ($Ti[OCH(CH_3)_2]_4$ 97%- Sigma Aldrich);
- Lâminas de alumínio de dimensão 25x25mm;
- Lâminas de vidro para microscópio;
- Nitrato de prata ($AgNO_3$ – FMaia);
- Nitrato de sódio ($NaNO_3$ 99,0% - VETEC);
- Papel alumínio;
- Permanganato de potássio ($KMnO_4$ 99,0% - VETEC);
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2 35% v/v – Dinâmica);
- Pó preto revelador de impressões digitais (SIRCHIE);
- Hidrocloreto de poli(dialil dimetilamônio) (PDAC, M_w 450 000 g/mol – Sigma Aldrich);
- Poli(estireno sulfonato de sódio) (PSS , M_n 70.000 g/mol - Sigma Aldrich);
- Poli(etilenoimina) ramificada (PEI, M_n 60.000 g mol⁻¹);
- Rodamina 6G ($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ – Sigma/Aldrich)

5.3. Procedimento de limpeza

Antes do uso, todas as vidrarias foram limpas de forma cuidadosa com soluções piranha. Primeiro foi utilizada solução alcalina (70% v/v NH_4OH / 30% v/v H_2O_2), por 20 min. Depois, solução ácida (70% v/v H_2SO_4 concentrado / 30% v/v de H_2O_2) também por 20 min, em seguida enxagues com água destilada, seguido de água ultrapura Milli-Q. Para a limpeza das lâminas de alumínio, o tempo de imersão na solução ácida foi reduzido para 10 minutos para evitar a formação de óxido de alumínio, o que prejudicaria a utilização destas lâminas, além da reação ser exotérmica.

5.4. Substratos SERS ativos

5.4.1. Síntese fotoquímica de nanopartículas de ouro estabilizadas com PEI (AuNPs/PEI)

Para a realização da síntese, conforme metodologia publicada previamente [132], 20 mL de uma mistura reacional com razão molar $[\text{PEI}/\text{Au}] = 10:1$ foi preparada em um béquer de 25 mL e depois exposta à radiação UV (254 nm, 16 W, Osram) fornecida por uma câmara de reação construída em laboratório, conforme fotografia apresentada na Figura 27 [129].

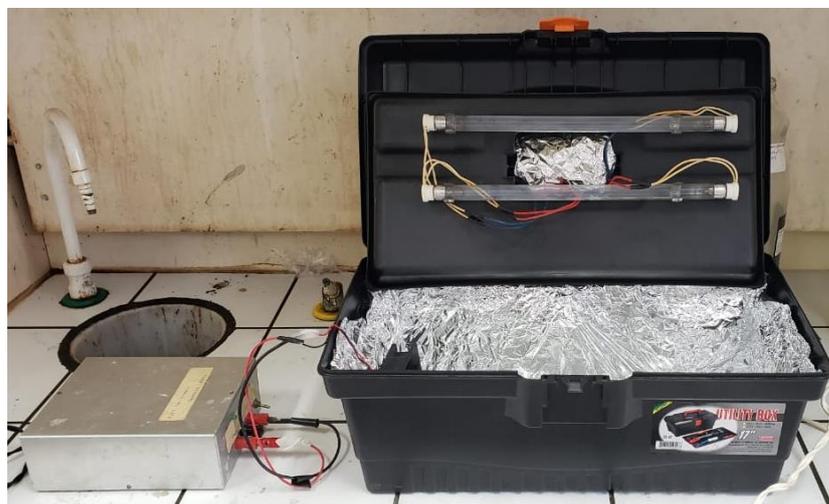
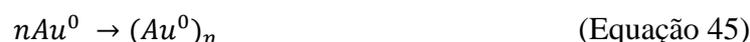
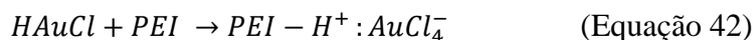


Figura 27. Imagem da câmara de reação com fonte de radiação UV com comprimento de onda em 254 nm e 16W.

O mecanismo de reação é proposto por Teixeira e colaboradores [129]. Os grupos doadores de e^- , (aminas) no PEI, participam do processo de nucleação das espécies excitadas pela absorção dos fótons da luz UV do ácido cloroáurico $[\text{Au}^{+3}\text{Cl}^{-4}]$. Os fótons incidentes reduzem as espécies de ouro, de Au^{+3} para Au^{+2} , que é instável que, por sua

vez, reduz para Au^+ . Uma vez que o meio contém elétrons livres, a espécie Au^+ adquire um elétron reduzindo a Au^0 . Na reação $PEI - HAuCl_4$, o PEI se comporta como uma base de Lewis.



5.4.2. Síntese fotoquímica de nanopartículas de ouro estabilizadas com óxido de grafeno funcionalizado com poli(etileno imina) - (AuNPs/GO-PEI)

Esta síntese foi adaptada da metodologia publicada por Teixeira e colaboradores, para AuNPs/PEI [129]. A síntese das AuNPs utilizou como agente estabilizador o nanocompósito formado por óxido de grafeno funcionalizado com poli(etileno imina) (GO-PEI 0,045 g/L), fornecido pelo Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais do Instituto de Química, da Universidade de Brasília. Para a realização da síntese, 5 mL de solução aquosa de GO-PEI foram adicionados em um béquer. Adicionou-se 0,5 mL de $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ (3 g/L) e o volume foi completado para 20 mL com água ultra pura. A mistura foi submetida ao sonicador por cerca de 3 minutos e exposta à radiação UV (254 nm, 16 W) por 30 minutos, na mesma câmara representada na Figura 28.

5.4.3. Síntese fotoquímica de nanobastões de ouro estabilizados com brometo de hexadeciltrimetilamônio (AuNBs)

Esta síntese foi realizada baseada em metodologia publicada por Abdelrasoul e colaboradores [128]. Em um béquer de 25 mL foram adicionados 7,2 mL de solução de CTAB ($2,4 \times 10^{-4}$ g/L); 2,0 mL de $HAuCl_4$ (3 g/L); 178 μ L de $AgNO_3$, (2 g/L); 195 μ L de acetona; 135 μ L de ciclohexano e 80 μ L de ácido ascórbico (0,1 g/L). Após adição do ácido ascórbico, a cor da solução mudou de laranja escuro para incolor, indicando a redução $Au^{3+} \rightarrow Au^{1+}$. A mistura reacional foi irradiada por 1h na câmara apresentada na Figura 28. Após a síntese, o produto obtido foi purificado após ciclos sucessivos de lavagem com água ultrapura e centrifugação a 10000 rpm por 20 min. Os produtos obtidos

foram ressuspensos em água ultrapura e denominados NB1, NB2 e NB3, de acordo com o número de ciclos de purificação. O NB3 foi submetido a uma centrifugação adicional a 5000 rpm por 20 minutos sendo, em seguida, descartado o corpo de fundo, no intuito de deixar a amostra mais homogênea, e foi completado com água ultrapura até o volume de 3 mL. O produto deste último procedimento foi denominado NB4.

5.4.4. Preparação das amostras para SERS

A atividade SERS de um substrato pode ser avaliada por diversas substâncias, sendo a R6G uma das mais utilizadas [130]. Assim, essa substância foi selecionada para confirmar a eficácia dos substratos desenvolvidos neste trabalho. Para isso, foram preparadas soluções de R6G a concentrações de 1×10^{-6} a 3×10^{-12} mol/L.

Para os testes com a R6G, uma gota de solução do corante (15 μ L) de cada concentração foi depositada em lâminas de alumínio de 25×25 mm. Após a secagem da R6G (24 horas), foi gotejado 15 μ L do substrato SERS sobre cada gota de R6G seca. Em seguida, aguardou-se 24h para secagem. Nos testes com os substratos SERS AuNP/PEI e AuNPs/GO-PEI para a R6G, foram gotejadas de 1 a 5 gotas do substrato nas lâminas, sendo obedecido um intervalo de 24h entre cada gota depositada.

Para os testes com COC, foram preparadas soluções aquosas com concentrações variando entre 5×10^{-2} M a 1×10^{-9} mol/L. As amostras para os testes SERS foram preparadas da seguinte forma: 15 μ L da solução da droga foi misturada a 15 μ L do substrato SERS (AuNBs) em um *ependorf* de 2,5 mL. Em seguida 30 μ L da mistura foi gotejada sobre uma lâmina de alumínio. Então, aguardou-se 24h para secagem.

5.4.5. Coleta das impressões digitais e contaminação com COC

Foram adquiridas impressões digitais de 1 homem e de 1 mulher. Os doadores seguiram com a lavagem das mãos com sabonete líquido neutro (o mesmo sabão para os dois doadores), como procedimento prévio à coleta. Em seguida, esperou-se 10 minutos para a secagem das mãos a temperatura ambiente, sem que tocassem em nada. Os indivíduos então, foram orientados a pressionar o dedo polegar direito sobre a testa visando simular a oleosidade natural dos dedos. Então, cada voluntário pressionou o dedo polegar direito sobre 30 μ L de uma solução de COC depositada em uma lâmina de vidro. Para o experimento, foram utilizadas 30 μ L de soluções em diferentes concentrações de COC (5×10^{-2} a 6×10^{-4} mol/L). Esperou-se 10 minutos para que o dedo contaminado secasse a temperatura ambiente e sem tocar em nada. Por fim, pressionou-se o dedo

contaminado em uma lâmina de alumínio de tamanho 25 × 25mm e foram realizadas as medidas SERS utilizando as AuNBs como substrato SERS ativo.

Para fins de comparação, foram realizadas medidas das impressões digitais sem a droga, após as fases de lavagem das mãos, secagem e a pressão do dedo sobre testa, e também utilizando o substrato SERS ativo AuNBs nessas impressões sem contaminação.

5.4.6. Instrumentação

As medidas SERS foram obtidas em um sistema Raman InVia (Renishaw), com um detector CCD e uma rede de difração de 1200 linhas/mm. Um microscópio Leica com objetiva de 50× foi utilizado para focalizar o feixe da radiação laser na amostra e coletar a radiação espalhada. A resolução espectral nominal foi 6 cm⁻¹. O laser de excitação utilizado foi o de HeNe (Renishaw) com emissão em 632,8 nm. Os números de onda foram calibrados utilizando uma pastilha de Si. Foram utilizadas as potências de laser correspondentes a 10% (para medidas das matrizes aquosas nas lâminas) do laser (potência nominal de 30 mW), de acordo com a objetiva utilizada (50×) e 10% (para medidas das impressões digitais aplicadas nas lâminas) do laser com um tempo de integração de 3 s,

As medidas Raman das amostras (substratos SERS-ativos) foram realizadas na faixa espectral de 100 a 1800 cm⁻¹ utilizando o procedimento de mapeamento superficial de modo a se registrar um total de 100 espectros por medida utilizando a função *mapping* do equipamento. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas. Os 100 espectros foram adquiridos em intervalos de 2 μm, resultando em uma área varrida de 20 × 20 μm para a objetiva de 50×.

Os espectros na região do UV-Vis (200 a 800 nm) foram adquiridos em um espectrofotômetro UV-Vis 2450 (Shimadzu), utilizando uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

As micrografias foram adquiridas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão (MET), JEM-2100 (Jeol), operando em 200 kV e as medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de (EDS) foram realizadas em um MEV JSM – 6610, equipado com EDS, no laboratório multiusuário de microscopia de alta resolução da Universidade Federal de Goiás.

Os equipamentos de espectroscopia Raman, FTIR e UV/Vis encontram-se alocados nos Laboratórios de Materiais e Combustíveis do Instituto de Química e Laboratório de Espectroscopia Óptica do Instituto de Física da Universidade de Brasília.

5.5. Determinação do sexo

5.5.1. Coleta das impressões digitais e aquisição de dados para classificação do sexo

Foram adquiridas impressões digitais de 21 homens e 21 mulheres. Os doadores foram selecionados de modo a considerar variação no gênero, idade e cor da pele (25-65 anos, 34 de cor de pele branca e 8 de pele negra). O detalhamento do perfil dos voluntários pode ser encontrado na Tabela 5. As coletas foram realizadas em dias diferentes. Para cada amostra foi considerado como D0 a data da coleta, D7 o prazo de sete dias após a coleta e D30, 30 dias após a coleta.

Para estudar a influência da luz nas amostras foram coletadas duas impressões digitais de cada voluntário, totalizando 84 amostras, sendo que um grupo foi armazenado a luz ambiente e o outro no escuro.

Tabela 5. Perfil dos voluntários

| Voluntario | Gênero | Idade | Cor da pele |
|------------|-----------|-------|-------------|
| 1 | Feminino | 29 | Branca |
| 2 | Feminino | 34 | Branca |
| 3 | Feminino | 47 | Branca |
| 4 | Feminino | 43 | Branca |
| 5 | Feminino | 42 | Branca |
| 6 | Feminino | 64 | Branca |
| 7 | Feminino | 32 | Branca |
| 8 | Feminino | 53 | Branca |
| 9 | Feminino | 40 | Branca |
| 10 | Feminino | 42 | Branca |
| 11 | Feminino | 40 | Branca |
| 12 | Feminino | 59 | Branca |
| 13 | Feminino | 32 | Branca |
| 14 | Feminino | 29 | Branca |
| 15 | Feminino | 46 | Negra |
| 16 | Feminino | 41 | Branca |
| 17 | Feminino | 33 | Branca |
| 18 | Feminino | 45 | Negra |
| 19 | Feminino | 42 | Branca |
| 20 | Feminino | 39 | Negra |
| 21 | Feminino | 65 | Negra |
| 22 | Masculino | 49 | Branca |
| 23 | Masculino | 53 | Branca |
| 24 | Masculino | 35 | Branca |
| 25 | Masculino | 28 | Branca |
| 26 | Masculino | 25 | Branca |
| 27 | Masculino | 43 | Branca |
| 28 | Masculino | 41 | Branca |
| 29 | Masculino | 39 | Branca |
| 30 | Masculino | 65 | Branca |
| 31 | Masculino | 44 | Branca |
| 32 | Masculino | 41 | Branca |
| 33 | Masculino | 58 | Branca |
| 34 | Masculino | 31 | Branca |
| 35 | Masculino | 45 | Branca |
| 36 | Masculino | 56 | Branca |
| 37 | Masculino | 42 | Branca |
| 38 | Masculino | 39 | Branca |
| 39 | Masculino | 48 | Branca |
| 40 | Masculino | 43 | Branca |
| 41 | Masculino | 44 | Branca |
| 42 | Masculino | 29 | Branca |

Foi solicitado aos doadores que não usassem cosméticos 24 horas antes da coleta. Cada indivíduo lavou as mãos com sabão neutro, deixando-as secar por 10 minutos para realizar a coleta da impressão digital. O mesmo sabão foi usado para todos os doadores. As impressões digitais foram coletadas por um papiloscopista da Polícia Federal em uma lâmina de vidro de 25 x 25 mm, revestida com papel alumínio. Não foi realizado pré-tratamento das amostras.

Após as medições de D0, as amostras foram divididas em dois grupos, sendo cada um submetido a duas condições diferentes: escuro (E) e claro (C). Os espectros Raman e FTIR foram obtidos no dia da coleta (D0), após 7 (D7) e 30 (D30) dias.

5.5.2. Obtenção dos Espectros Raman

A análise de microespectroscopia Raman de amostras de impressões digitais masculinas e femininas foi realizada utilizando-se um Labram HR Evolution (HORIBA Scientific, Palaiseau, França) equipado com uma grade de 1800 linhas/mm e detector CCD. As medições foram realizadas com uma fonte de excitação a laser de 532 nm (10mW) focada nas amostras por um microscópio OLYMPUS com um objetiva de 50x. A resolução espectral nominal foi 1 cm^{-1} .

Três espectros Raman foram obtidos em três pontos diferentes (gota ou material oleoso) de cada uma das amostras. Assim, foram realizadas 126 medidas de homens e 126 de mulheres. Em cada ponto obteve-se três acumulações, com 20 segundos cada. Utilizou-se a faixa de $800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ para aquisição dos espectros. Um filtro local foi usado para remover picos de intensidade decorrentes de eventos de raios cósmicos (LabSpec® -Horiba Jovin Yvon). Para tratamento dos dados foi utilizado um computador pessoal com processador Intel inside core i7 de 8GHz.

Considerando a variação entre as regiões na impressão digital e o número de doadores, a fim de aumentar a representatividade do conjunto de dados cada espectro da amostra, foi considerado para as análises e para o resultado do modelo de discriminação a maioria das réplicas da amostra.

5.5.3. Obtenção dos Espectros FTIR

As medidas de FTIR foram realizadas no equipamento Bruker Vertex 70 usando o método de reflectância, com ângulo de 40° , sendo medidos três espectros em cada amostra em pontos distintos, com 64 segundos e 64 varreduras, na região espectral de $400\text{ à }4000\text{ cm}^{-1}$. Assim, foram obtidas 126 medidas de homens e 126 de mulheres. A resolução espectral nominal foi 4 cm^{-1} .

5.5.4. Análises quimiométricas

As análises quimiométricas: PCA, PLS-DA e SVM-DA foram realizadas usando as funções correspondentes do PLS-toolbox (versão 8.81, Eigenvector, Wenatchee, WA) e MATLAB R2020b (The Mathworks Inc., Natick, MA) [37].

5.5.4.1. Obtenção dos modelos quimiométricos - Raman

Inicialmente, todos os espectros do mesmo gênero de D0 foram analisados utilizando-se a PCA para detectar e excluir medidas discrepantes (*outliers*) com base nos resíduos de *Hotelling* T^2 e Q , sendo considerados os escores das três primeiras componentes principais, com o intervalo de confiança de 99%. Após esta etapa, os espectros remanescentes de ambos os sexos foram reunidos em uma mesma matriz e separados em grupo de treinamento e de teste, pelo algoritmo *Kennard-Stone*, disponível no pacote PLS-Toolbox, no qual foram selecionados 34% dos voluntários para conjunto de testes e 66% para o conjunto de treinamento. O grupo de treinamento de D0, composto por 138 espectros, foi utilizado para obtenção dos modelos PLS-DA e SVM-DA. Outros 64 espectros de D0, pertencentes a amostras diferentes das selecionadas para treinamento, foram utilizadas para o teste. Todos os espectros medidos em D7 e D30 (escuro (D) e claro (L)) foram utilizados para conjunto de dados de validação (126 e 117, respectivamente).

A composição dos conjuntos de teste é mostrada na Tabela 10, onde TS0 corresponde ao grupo de teste dos espectros medidos no D0; TS7L ao grupo de teste dos espectros medidos no D7L; TS7D ao grupo de teste dos espectros medidos no D7D; TS30L ao grupo de teste dos espectros medidos no D30L e TS30D ao grupo de teste dos espectros medidos no D30D.

Tabela 6. Número de homens e mulheres por dia nos grupos de teste D0, D7 e D30.

| Grupo de teste | Número de espectros de cada gênero nos grupos de teste |
|----------------|--|
| TS0 | 32 femininos e 32 masculinos do D0 |
| TS7L | 63 femininos e 63 masculinos do D7 Luz |
| TS7D | 63 femininos e 63 masculinos do D7 Escuro |
| TS30L | 57 femininos e 60 masculinos do D30 Luz |
| TS30D | 57 femininos e 60 masculinos do D30 Escuro |

O pré-processamento é um passo particularmente importante na análise multivariada. Assim, o pré-processamento dos espectros foi realizado antes da construção dos modelos. Foram avaliados diversos métodos de pré-processamento, como derivadas, suavização, normalização e centragem na média para remover variações sistemáticas indesejáveis nos dados e encontrar modelos de discriminação com melhor desempenho.

A escolha do melhor pré-processamento foi feita com base no RMSECV. O pré-processamento selecionado foi: *Absolute Value*, *Baseline (Automatic Weighted Least Squares, order = 5)*, *Normalize (1-Norm, Area = 1)*, *Smoothing (order: 0, window: 15 pt*,

tails: polyinterp) e *Mean Center*. O pré-processamento *baseline* foi usado para remover o fundo de fluorescência dos espectros que, por sua vez foram normalizados pela área para minimizar as diferenças de escala decorrentes de efeitos de espalhamento. O pré-processamento *smoothing* foi usado para reduzir o ruído [131]. O pré-processamento do *Mean Center* foi usado para mover a origem do sistema de coordenadas para coincidir com o ponto médio.

O desempenho dos modelos PLS-DA e SVM-DA foi avaliado em termos das figuras de mérito sensibilidade, especificidade, taxa de erros falso negativo, falso positivo e taxa de eficiência [110] [132].

Foram obtidos modelos de calibração dos espectros Raman médios, a partir de cada grupo amostral conforme descrito a seguir. Foram considerados as amostras obtidas dos 42 voluntários, nas diferentes condições de tempo (D0, D7 e D30) e de armazenamento (claro e escuro), totalizando 252 medidas.

Para a melhor comparação dos resultados, foram utilizados os mesmos pré-processamentos e regiões espectrais dos modelo PLS-DA e SVM-DA avaliados na seção 7.1.1.

Neste caso a exclusão dos outliers foi realizada no modelo PLS-DA, a partir do modo de validação cruzada, obtido considerando todos as médias dos espectros. Assim, com a exclusão dos outliers, o conjunto de treinamento utilizado para a construção de modelos foi composto por 162 espectros e o grupo de teste por 62 espectros (total: 224). Cabe ressaltar que as amostras do mesmo indivíduo ou compunham o grupo de teste ou de treinamento.

5.5.4.2. Obtenção dos modelos quimiométricos - FTIR

Devido a problemas observados em alguns espectros causados pela aquisição espectral, um total de 246 amostras foram utilizadas das 252 amostras padrão.

As médias dos espectros para ambos os sexos, considerando D0, D7 e D30, foram incluídos na mesma matriz e, por meio da modelagem de PCA, foi realizada a identificação e exclusão dos *outliers*, com base nos resíduos de T2 Hotelling e Q, utilizando validação cruzada e considerando o intervalo de confiança de 99%.

O conjunto de treinamento utilizado para a construção do modelo após a exclusão dos *outliers* foi composto por 157 espectros femininos e masculinos, enquanto 62 espectros foram usados para o conjunto de testes. O algoritmo Kennard-Stone foi utilizado na seleção dos espectros, sendo 2/3 das amostras para o conjunto de treinamento,

enquanto o restante (1/3) foi usado para o conjunto de teste, conforme as configurações padrão do PLS-Toolbox e estudos anteriores [133].

O pré-processamento espectral foi realizado antes da discriminação por PLS-DA. Foram avaliados diversos métodos de pré-processamento, como derivação, suavização, normalização e centralização na média, buscando obter o melhor desempenho com a ferramenta otimizador de modelos, disponível na Caixa de Ferramentas PLS 16. A escolha do método de pré-processamento foi feita com base no RMSECV.

6. Resultados e discussão

6.1. Detecção de substâncias exógenas em impressões digitais

6.1.1. Caracterização da cocaína

O espectro Raman da amostra de cristais de cloridrato de COC apresentado na Figura 28 foi obtido com uma fonte de excitação em 785 nm e também utilizando a função de modo estendido do equipamento. Dentre as bandas características da COC, destaca-se a banda mais intensa próxima a 1004 cm^{-1} .

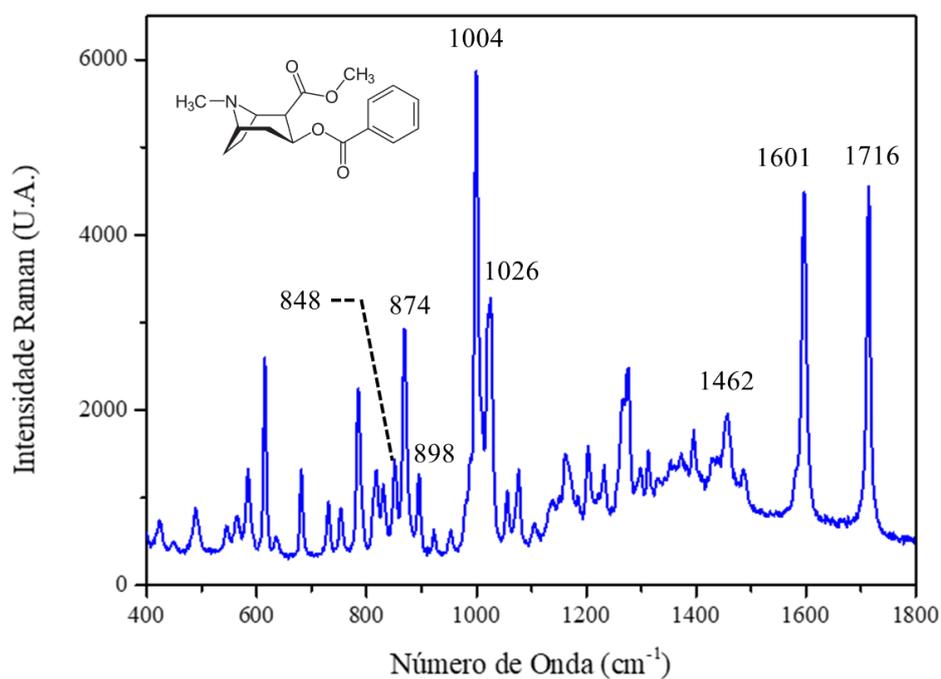


Figura 28. Espectro Raman da amostra de cristais de cloridrato de COC obtido com uma fonte de excitação em 785 nm e também utilizando a função de modo estendido do equipamento.

A Tabela 6 apresenta as atribuições dos possíveis modos vibracionais para a molécula de COC, conforme indicado na Figura 28 [134].

Tabela 7. Principais atribuições vibracionais para a molécula de COC [134].

| $\bar{\nu}/\text{cm}^{-1}$ | Atribuição vibracional tentativa |
|----------------------------|--|
| 848,874,898 | C-C (estiramento do anel tropano) |
| 1004 | Modo de respiração do anel aromático (estiramento simétrico) |
| 1026 | Anel aromático (estiramento assimétrico) |
| 1462 | CH ₃ (deformação assimétrica) |
| 1601 | C=C (estiramento do anel aromático) |
| 1716 | C=O (estiramento simétrico da carbonila) |

O espectro de absorção no UV-Vis de uma solução de $1,0 \times 10^{-7}$ M de COC é apresentado na Figura 29, com máximo de absorção em 274 nm, consoante com o estudo de Muhtadi e Al-Badr, que atribui o máximo de absorção da COC na região entre 233 a 274 nm [135].

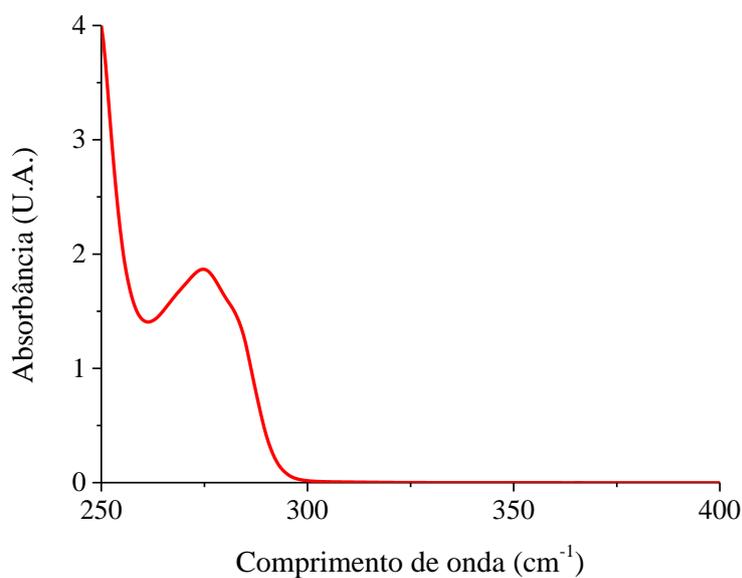


Figura 29. Espectro de absorção no UVvis para amostra de COC 1×10^{-7} M.

6.1.2. Caracterização dos substratos SERS ativos

6.1.2.1. AuNPs/PEI

6.1.2.1.1. Espectroscopia Raman

Foram realizados testes com o substrato SERS de AuNPs/PEI com solução de R6G (1×10^{-6} mol/L). Os espectros Raman obtidos são mostrados na Figura 30. Conforme pode ser observado, há uma intensificação dos sinais Raman da molécula de R6G, em especial das bandas em 612 (referente à deformação do anel do xanteno), 1361 e 1510 cm^{-1} (essas duas últimas envolvem os modos de estiramento do anel do xanteno) [136].

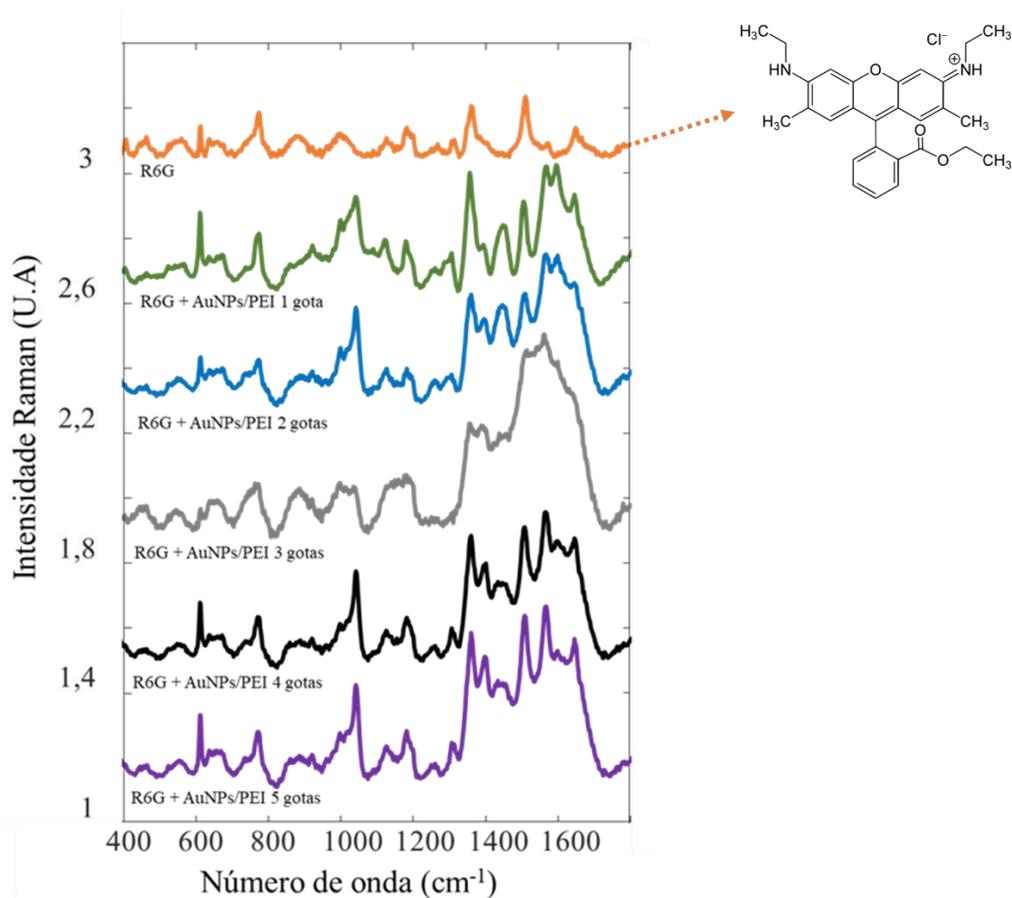


Figura 30. Espectros SERS da R6G 1×10^{-6} mol/L pura e em diferentes condições no substrato AuNPs/PEI.

6.1.2.2. AuNPs/GO-PEI

6.1.2.2.1. UV-VIS

O espectro de absorção no UV-Vis das AuNPs/GO-PEI pode ser observado na Figura 29. O pico de máximo de absorção encontra-se em 538,5 nm. Na literatura a absorção do plasmon superficial (LSPR) das AuNPs possui seu máximo em cerca de 520 nm, a depender do diâmetro das NPs. Observa-se na Figura 31, um deslocamento batocrômico, provavelmente pelo aumento do tamanho[137].

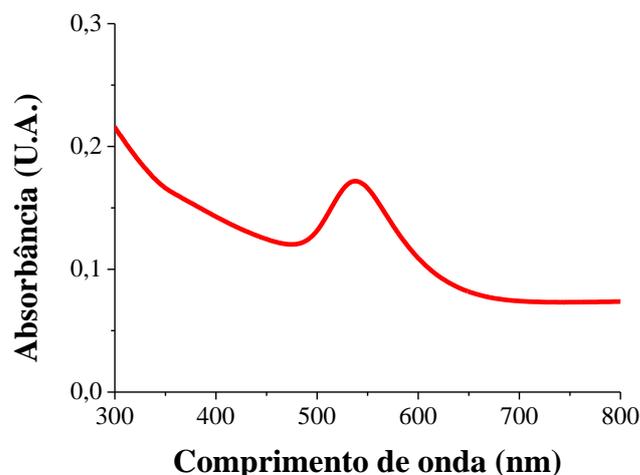


Figura 31. Espectro UV/Vis do AuNPs/GO-PEI, com máximo de absorção em 538,5 nm correspondente à banda LSPR da fase Au.

6.1.2.2.2. Espectroscopia SERS e Raman

Foram realizados testes com o substrato SERS de AuNPs/GO-PEI com solução de R₆G (1×10^{-6} mol/L). Os espectros Raman foram obtidos e são mostrados na Figura 32.

Neste caso, além da intensificação do sinal, observa-se no espectro da amostra com uma gota, a supressão da fluorescência da R6G, quando comparada com o espectro da R6G pura. O GO contribui para a imobilização das AuNPs e como estabilizante. Sua estrutura conjugada suprime a fluorescência de muitas espécies químicas, e contribui para a intensificação do sinal SERS. Isso tem sido relacionado ao sistema π conjugado, que torna o GO um bom receptor de elétrons e o permite formar estruturas supramoleculares não emissivas e muito estáveis com essas moléculas conjugadas, aumentando a adsorção de analitos conjugados e com isso possibilita uma contribuição mais forte do efeito químico para o SERS [138].

Entretanto, foi observado que, a partir da segunda gota do substrato SERS depositada na amostra, as bandas G (1602 cm^{-1}) e D (1334 cm^{-1}) do GO se sobrepõem às bandas da R6G. Conforme a literatura, para o óxido de grafeno, a intensidade da banda G é maior que a da banda D. Aqui observou-se uma inversão nas intensidades das bandas G e D que pode ser explicado pela formação de ligações covalentes entre o PEI e o GO, favorecendo a substituição de grupos funcionais oxigenados na folha gráfitica, promovendo carbonos sp^3 numa rede predominantemente de carbonos sp^2 [139].

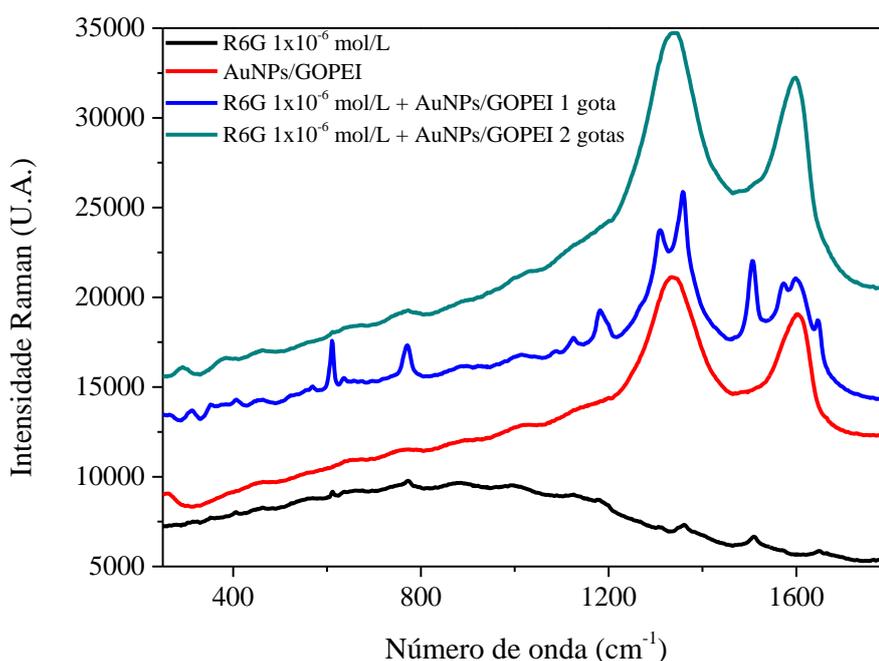


Figura 32. Espectros SERS da R6G 1×10^{-6} mol/L pura e em diferentes condições no substrato AuNPs/GO-PEI. Foi utilizada uma objetiva de 50x.

O mesmo procedimento foi utilizado para testar o substrato AuNPs/GO-PEI com COC 1×10^{-2} mol/L. Conforme pode ser observado na Figura 33, não foi observado sinal da droga e, por este motivo, o uso deste substrato foi descartado.

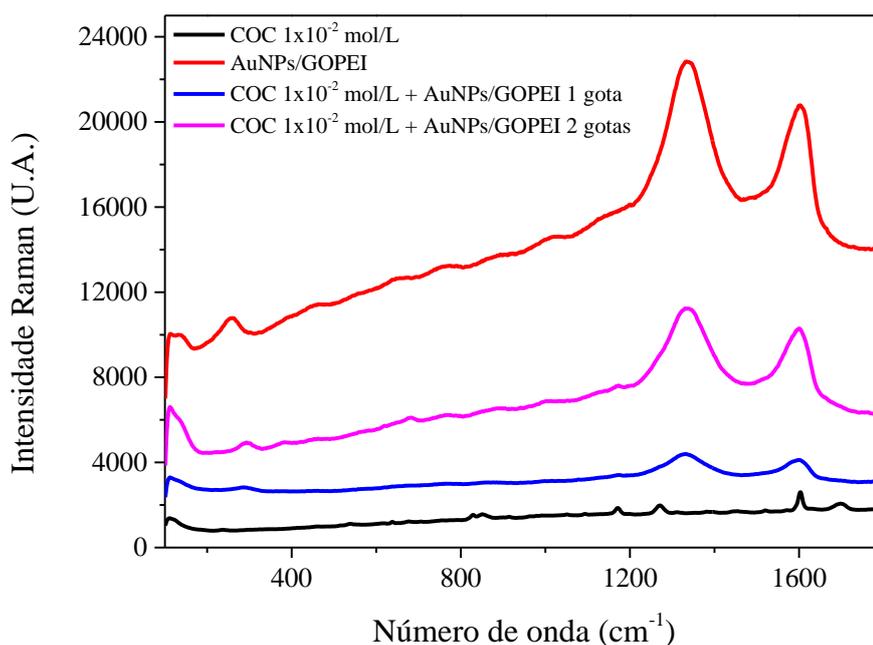


Figura 33. Espectros SERS da COC 1×10^{-2} mol/L pura e em diferentes condições no substrato AuNPs/GO-PEI. Foi utilizada uma objetiva de 50x.

6.1.2.3. AuNBs

Os nanobastões foram sintetizados mediante adaptações a metodologia de Abdelrasoul e colaboradores[128] buscando maior rendimento da reação. Esse ajuste realizado na proporção dos reagentes pode ter sido um fator preponderante na morfologia do material obtido e que será demonstrado nos itens subsequentes. Além disso, a intensidade da radiação utilizada no estudo original foi de 1,3 a 6,6 mW /cm², com fluência variando de 2,3 a 11,9 J/cm², considerando 30 minutos de reação e distância da luz que variou de 1 a 7 cm. No presente estudo a intensidade de radiação utilizada foi de 12,1 mW/cm², fluência 21,8 J/cm², com um tempo de reação de 1h e distância da luz de 5 cm, conforme descrito na seção 5.4.1.3.

Nesta síntese espera-se que a irradiação com raios UV induza a redução dos íons Au⁺¹ para Au⁰ pela geração dos radicais cetila da acetona e abstração de átomos de H do CTAB. Na fase inicial, a concentração de Au⁰ na solução é progressivamente aumentada, pelo efeito da reação fotoquímica das cetonas. No momento em que a concentração de monômero atinge a supersaturação, acima de um limiar crítico de exposição radiante, é iniciado o processo de nucleação. Na etapa seguinte, o crescimento dos núcleos formados ocorre em paralelo com a nucleação. O crescimento dos nanobastões é conduzido pela redução do complexo precursor na superfície dos nanocristais. O crescimento

anisotrópico ocorre pela absorção preferencial de íons de prata em faces de ouro específicas, dificultando o crescimento nessas faces.

6.1.2.3.1. Influência das Lavagens

Para verificar a influência das lavagens sobre o efeito SERS, ou seja, da presença de CTAB e outros materiais que não reagiram, foram obtidos espectros SERS da R6G 5×10^{-8} mol/L com os substratos NB1, NB2, NB3 e NB4. Fotografias das suspensões dos substratos são apresentados na Figura 34.

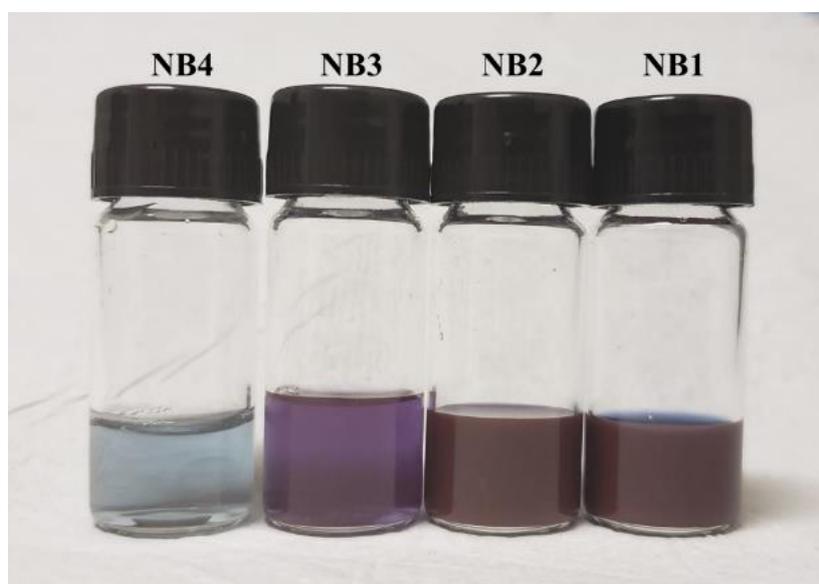


Figura 34. Representação fotográfica dos substratos SERS NB1, NB2, NB3 e NB4.

Os espectros SERS obtidos podem ser observados na Figura 35.

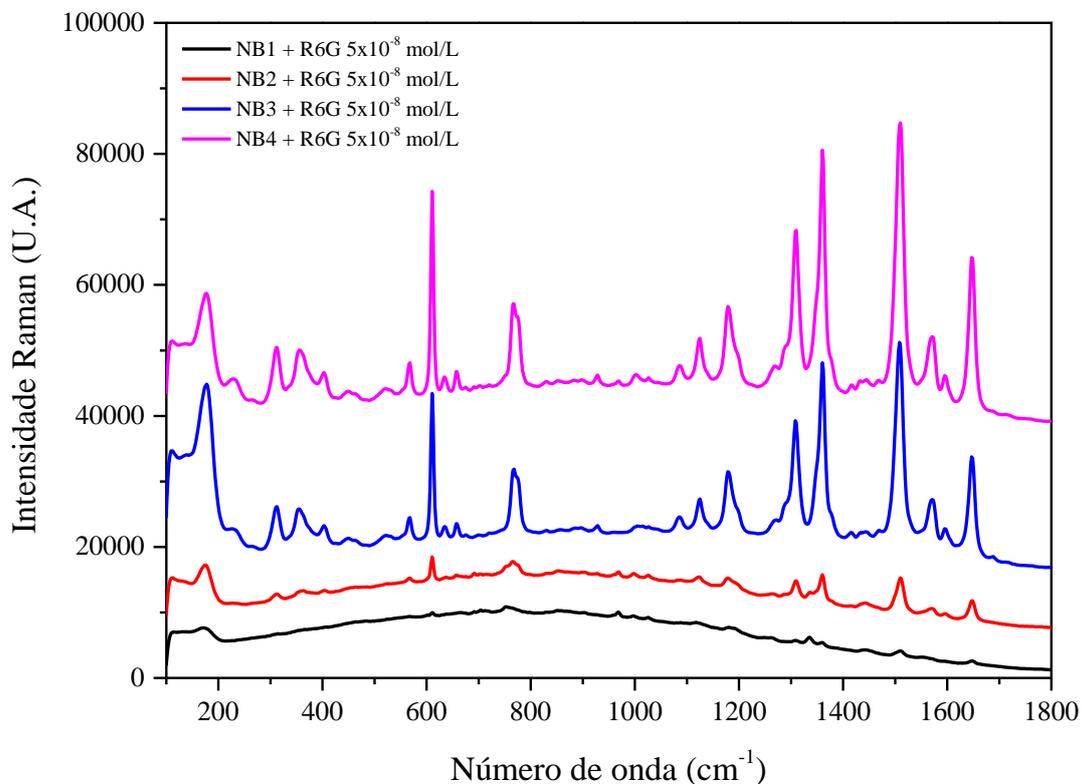


Figura 35. Espectros SERS da R6G 5×10^{-8} mol/L adsorvida nos substratos SERS NB1, NB2, NB3 e NB4.

O CTAB, por ser uma molécula de tamanho considerável, acaba por promover um maior distanciamento entre as AuNBs. Como pode ser visto na Figura 36, após as lavagens, com a retirada parcial do surfactante, o sinal SERS se intensifica, conforme observado nos substratos NB3 e NB4. Isso pode ser explicado pela maior aproximação entre os AuNBs e, conseqüentemente, maior ocorrência de *hot spots*, que favorecem o efeito SERS [140].

6.1.2.3.2. UV-Vis

Nos espectros UV-Vis do substrato NB3, apresentados na Figura 37, foram observadas duas bandas de absorção: uma em 545 nm e outra em 599 nm, correspondentes às $LSPR_T$ e $LSPR_L$, respectivamente. Conforme demonstrado no item 4.2.1.3, a distância entre as duas bandas de absorção plasmônica varia de acordo com sua AR [125]. A Figura 36 apresenta ainda os espectros de absorção da amostra durante um período de 28 dias, com o objetivo de acompanhar a estabilidade do substrato. Como pode ser observado, não houve variações significativas, o que permite inferir sua estabilidade neste período.

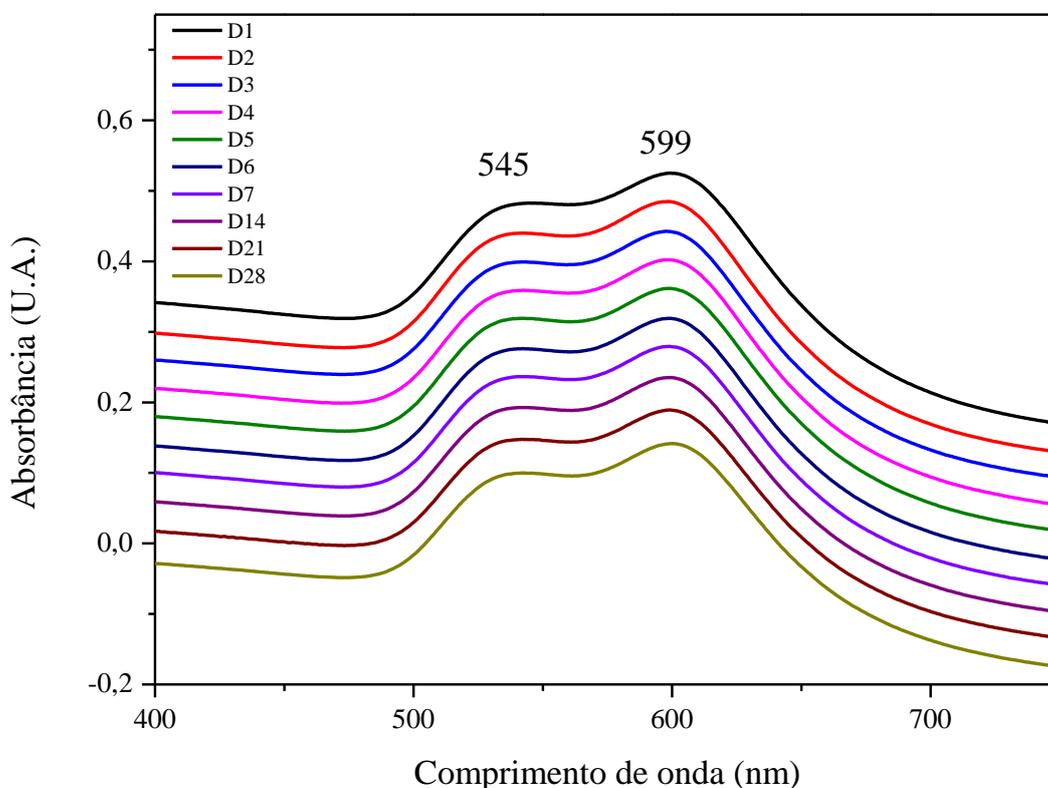


Figura 36. Espectro de absorção experimental UV-Vis de uma amostra de NB3. A banda em 545 nm corresponde a $LSPR_T$, enquanto a centrada em 599 nm está relacionada a $LSPR_L$ dos NBs presentes na amostra.

Na Figura 37, são apresentados os espectros de absorção de UV-VIS do substrato NB4 e podem ser observadas duas bandas de absorção: uma em 526 nm e outra em 617, para o primeiro dia de medida – D1, que se deu logo após a síntese e duas bandas de absorção em 526 e 588 nm, observadas para as medidas realizadas nos dias subsequentes (D2 a D28), correspondentes às $LSPR_T$ e $LSPR_L$, respectivamente. O deslocamento hipsocrômico observado indica uma mudança nas características da amostra, nas

primeiras 24 horas, que se manteve estável segundo observado nas medidas realizadas até o vigésimo oitavo dia (D28).

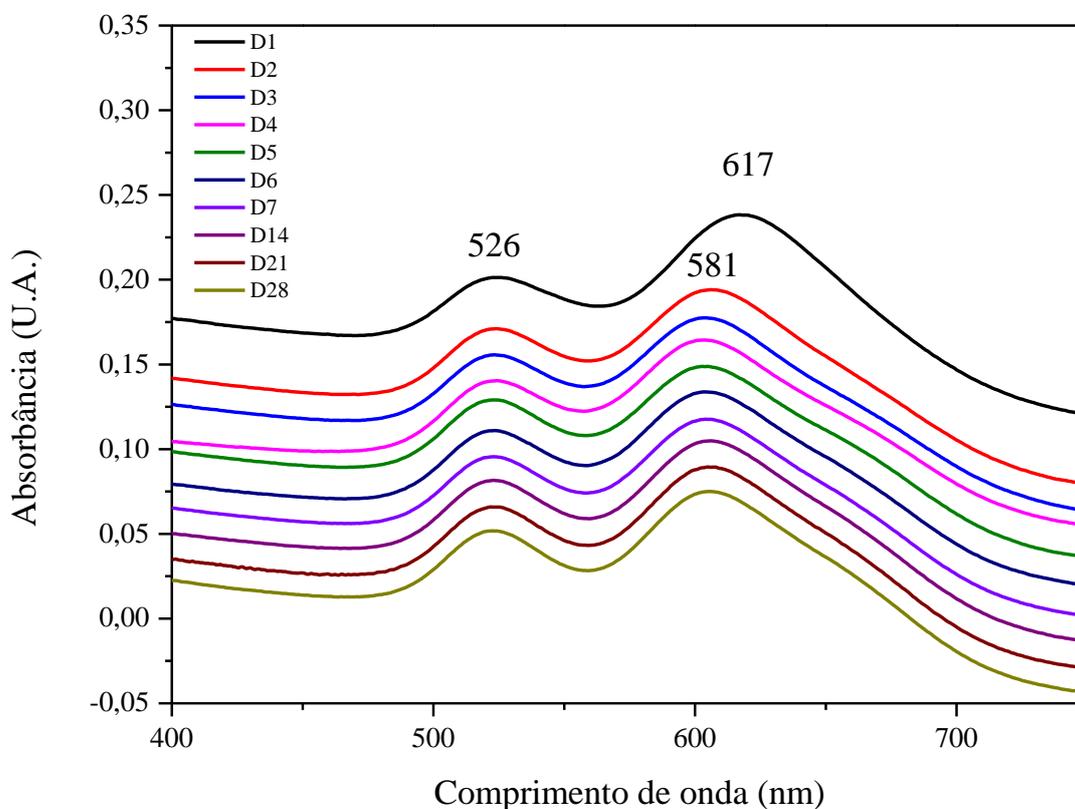


Figura 37. Espectro de absorção experimental UV-Vis de uma amostra de NB4. A banda em 526 nm corresponde a $LSPR_T$, enquanto a centrada em 617/581 nm está relacionada a $LSPR_L$.

6.1.2.3.3. MET

As micrografias por MET dos nanomateriais podem ser visualizadas na Figura 38 e foram obtidas para verificar a morfologia e determinar o tamanho médio dos NBs.

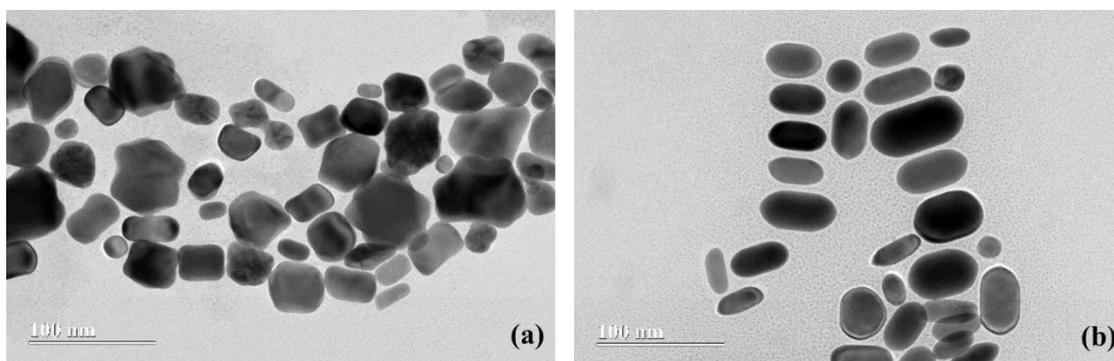


Figura 38: Micrografias MET obtidas para os substratos NB3(a) e NB4(b).

As imagens demonstram a presença de aglomerados e polidispersão dos nanobastões formados. Na Figura 38 (a), ainda que sejam observados aglomerados, um fator que pode influenciar é o modo de preparo da amostra para a análise de MET, que tem consequências na forma com que as partículas se arranjam durante a secagem. Em (b), embora predominem os AuNBs, outros formatos podem ser observados e isso pode estar relacionado, em parte, com o processo de lavagem, em especial com a etapa de centrifugação.

As Figuras 39 (a) e (b) apresentam o histograma de distribuição da amostra NB4, do tamanho dos AuNBs por comprimento e largura. O comprimento médio obtido foi de $74,3 \pm 13,6$ nm (Figura 39(a)) e a largura média de $40,9 \pm 14,5$ nm (Figura 39(b)), com razão de aspecto (AR – comprimento dividido pela largura) de 1,81. No estudo de referência foram obtidos comprimento médio entre 44 ± 5 nm e 35 ± 5 nm, dependendo das condições de síntese e largura média de 14 ± 3 nm a 10 ± 2 nm [128]. Cabe ressaltar que não foi calculado o tamanho da amostra NB3, devido ao seu maior polimorfismo.

Conforme pode ser observado na Figura 37 (UV-Vis), a proximidade das bandas em 526 e 617 nm já indicava um baixo valor de AR, o que foi confirmado pelo resultado obtido a partir do MET.

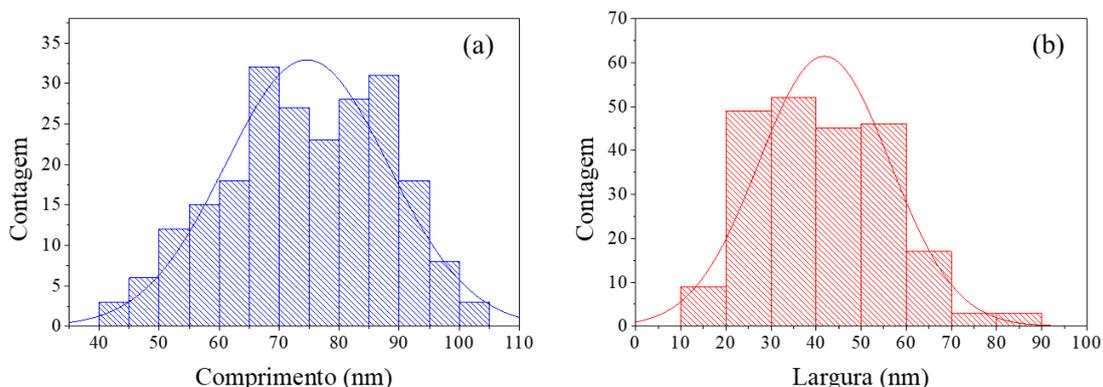


Figura 39: Histogramas de distribuição do tamanho dos AuNBs pelo comprimento (a) e largura (b).

No estudo utilizado como referência para esta síntese, a autora afirma que a diminuição do comprimento dos NBs produzidos pode ser atribuída à dissolução dos NBs já produzidos, o que é muito provável de acontecer em altas potências de irradiação, especialmente quando todo o precursor já é consumido durante a síntese fotoquímica. A autora afirma que os átomos de ouro da superfície dos AuNBs são removidos em favor da formação de nanopartículas esféricas que são termodinamicamente mais estáveis e que, provavelmente, esse processo, comece pelas pontas que são menos protegidas, o que

favorece o seu encurtamento [128]. Uma vez que foi utilizada uma maior radiação, o AR obtido pode ser explicado por este fato.

6.1.2.3.4. Caracterização morfológica das nanopartículas

A micrografia do substrato SERS ativo do NB4 pode ser observada na Figura 40. É possível observar uma superfície heterogênea com destaque para os aglomerados formados.

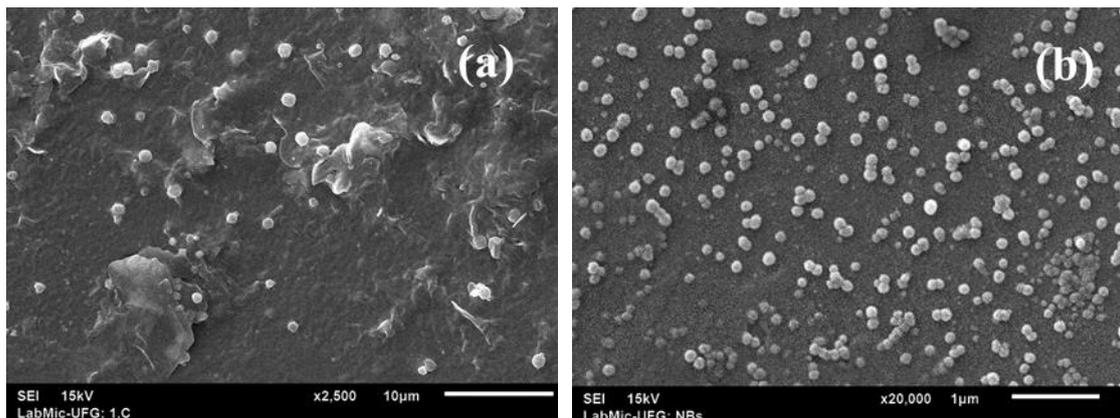


Figura 40. Micrografia do substrato SERS ativo de NB3(a) e NB4(b) por microscopia eletrônica de varredura.

Foi realizada uma análise de mapeamento do ouro por EDS, na amostra NB4, apresentada na Figura 41. Foi possível constatar a presença de ouro sobre a superfície estudada. Além do ouro, foi observado o elemento cobre, que tem como fonte o porta amostra.

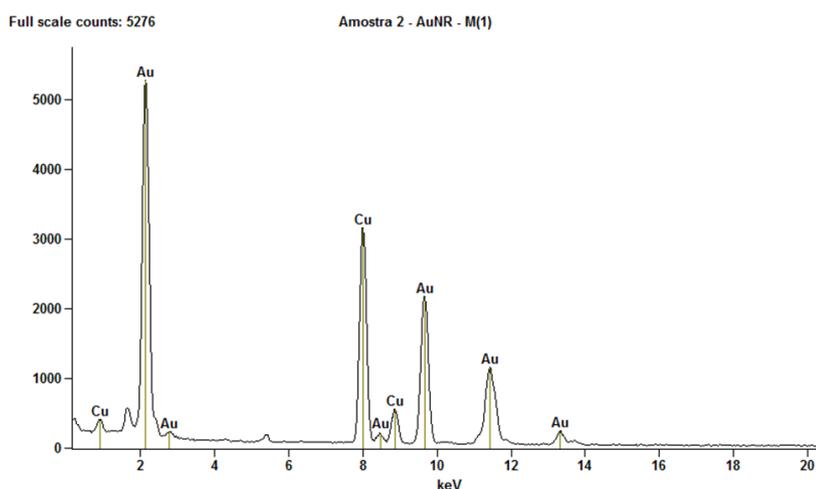


Figura 41. Espectro EDS do substrato NB4.

6.1.2.3.5. Espectroscopia Raman e SERS da R6G

Considerando que os espectros de NB3 e NB4 apresentaram intensificações próximas, o fato de que o rendimento de NB4 foi menor, além de demandar uma etapa a mais de lavagem, optou-se pela utilização do substrato NB3 para obtenção dos espectros SERS, utilizados nos estudos de adsorção com a R6G e com cocaína.

Foram obtidos espectros SERS de soluções de R6G com concentrações variando de 1×10^{-8} a 3×10^{-12} mol/L, com o substrato SERS de NB3.

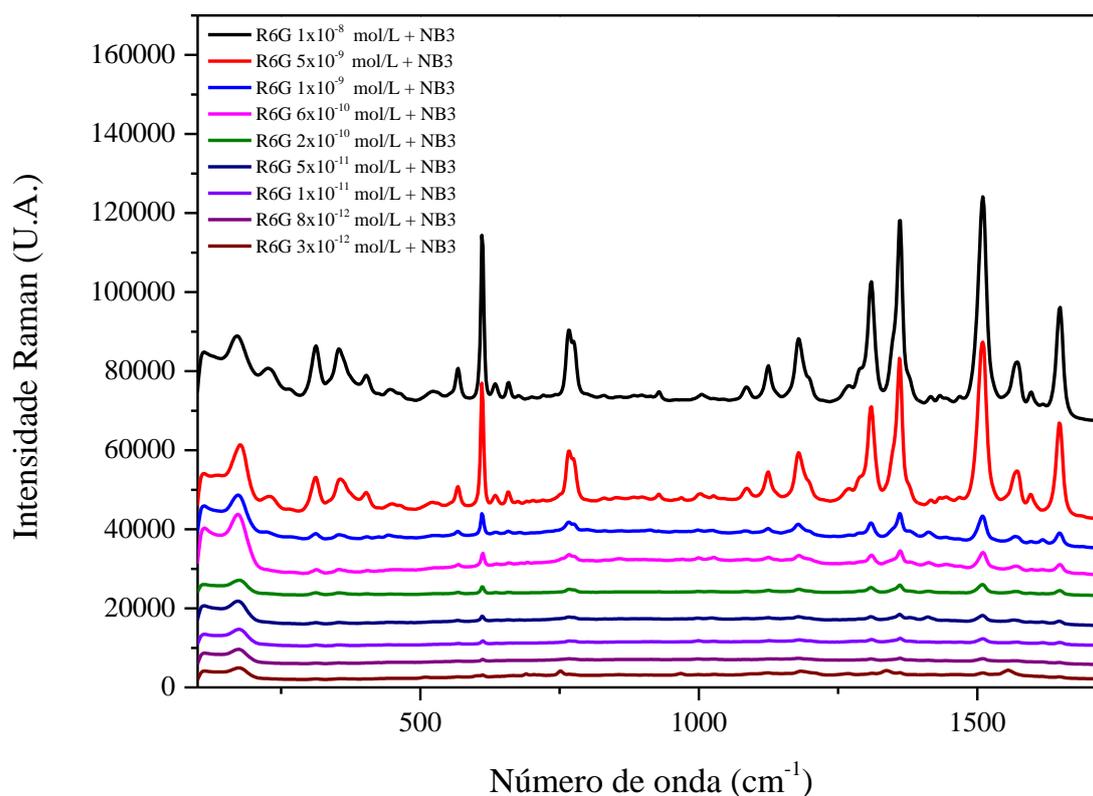


Figura 42. Espectros SERS da R6G com substrato NB3 em diferentes concentrações (1×10^{-8} a 3×10^{-12} mol/L).

As principais bandas da R6G foram observadas em 612, 1361 e 1510 cm^{-1} , sendo a primeira relacionada a deformação do anel xanteno e as demais relativas a modos de estiramento do anel [136].

A variação proporcional da intensidade da banda em 612 cm^{-1} , em função da concentração, pode ser observada por meio dos espectros SERS da R6G mostrados na Figura 42.

6.1.2.3.6. Estudo da adsorção da R6G no substrato SERS NB3

Foram utilizadas as isotermas de Langmuir, Frumkin e Freundlich para a investigar a interação entre a molécula de R6G e o substrato SERS ativo NB3. Assim, foi verificada a variação da intensidade SERS da molécula de R6G adsorvida em função de sua concentração, onde foi possível observar que a partir de uma determinada concentração (alta) a intensidade tende a não variar e, avaliados os melhores ajustes.

6.1.2.3.6.1 Isotermas de Langmuir

Os resultados apresentados na Figura 43(a) demonstram a variação do recobrimento superficial (θ) em função da concentração de R6G adsorvida em NB3 e, em (b), é apresentada a representação linear da isoterma de Langmuir para a R6G adsorvida nesse substrato, utilizando como referência a intensidade SERS em 612 cm^{-1} .

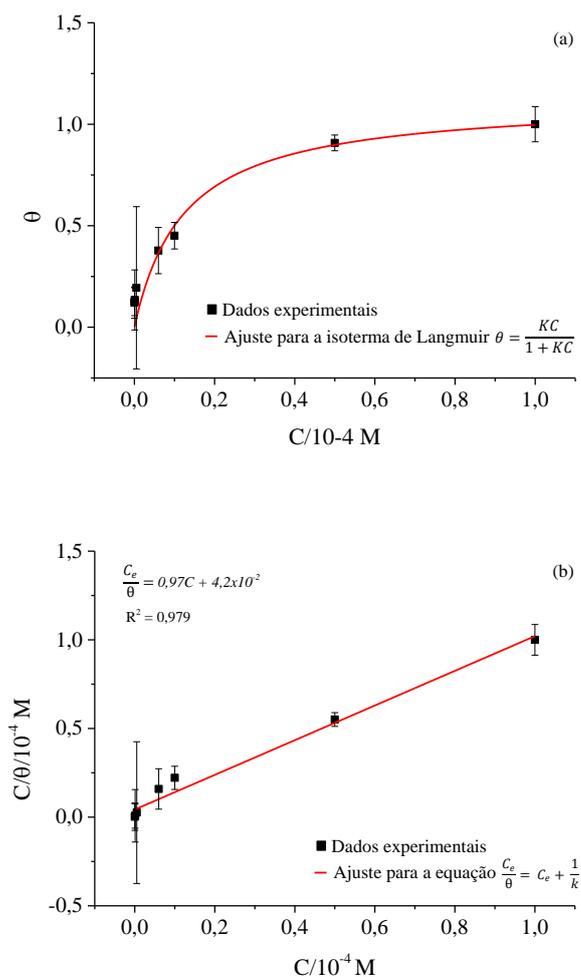


Figura 43. Isotermas de Langmuir para adsorção de R6G sobre o substrato NB3: (a) forma assintótica, (b) forma linear.

O q_{\max} (mmol/g) pode ser obtido a partir do modelo de Langmuir. De acordo com gráfico da Figura 44(a), a capacidade máxima de adsorção calculada, considerando uma monocamada, é de $1,12 \pm 0,12$ mmol/g.

Em processos absorptivos, a determinação dos parâmetros termodinâmicos pode auxiliar na interpretação dos fenômenos físico-químicos inerentes ao sistema. A exemplo disso, valores negativos de ΔG° indicam que o processo de adsorção pelos nanoadsorventes é de natureza espontânea. Quanto mais negativo for o valor de ΔG° , mais favorável será o processo de adsorção [141].

Assim, no que se refere ao ajuste feito para a forma linear da isoterma de Langmuir (Figura 46(b)), o coeficiente angular obtido foi de 0,98, gerando uma $K_{\text{ads}} = 23,81 \pm 0,02$ e $\Delta G^\circ_{\text{ads}}$ de $-77,25$ kJ/mol ($\Delta G^\circ_{\text{ads}} = -RT \ln K_{\text{ads}}$).

Os valores de $\Delta G^\circ_{\text{ads}}$ obtidos indicam que a R6G adsorve no substrato NB3 por meio de uma adsorção física e que a adsorção é de natureza espontânea.

6.1.2.3.6.2 Isotermas de Frumkin

A Figura 44 representa a variação do recobrimento superficial (θ) em função da concentração de R6G adsorvida em NB3 com o ajuste da isoterma de Frumkin, utilizando como referência a intensidade SERS em 612 cm^{-1} .

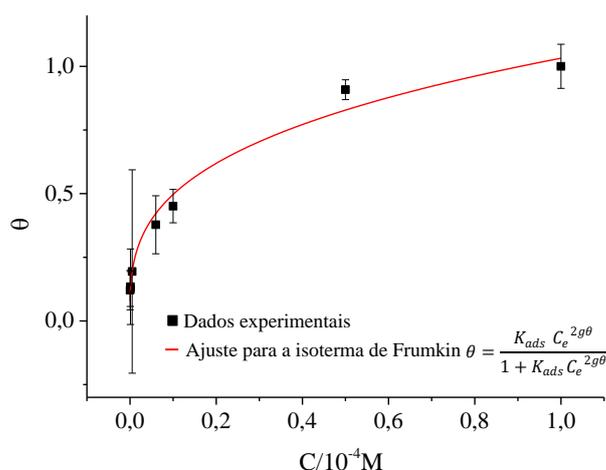


Figura 44. Isoterma de Frumkin para R6G adsorvida em NB3.

Os ajustes pela isoterma de Frumkin trouxeram valores de $g > 0$, conforme Tabela 8, tornando possível concluir como atrativa o tipo de interação entre as moléculas de R6G e o substrato NB3.

6.1.2.3.6.3 Isotermas de Freundlich

Por se basear em parâmetros empíricos, os valores de K obtidos para as isotermas de Freundlich não são relevantes para a discussão. Assim, para os sistemas serão considerados apenas os valores de n como forma de avaliar o favorecimento ou não do processo de adsorção [84] [89].

Os ajustes realizados pela isoterma de Freundlich (Figura 45) para o sistema demonstraram um valor de $n = 3,70 \pm 0,24$, permitindo concluir o favorecimento da adsorção da molécula de R6G pelo sistema NB3.

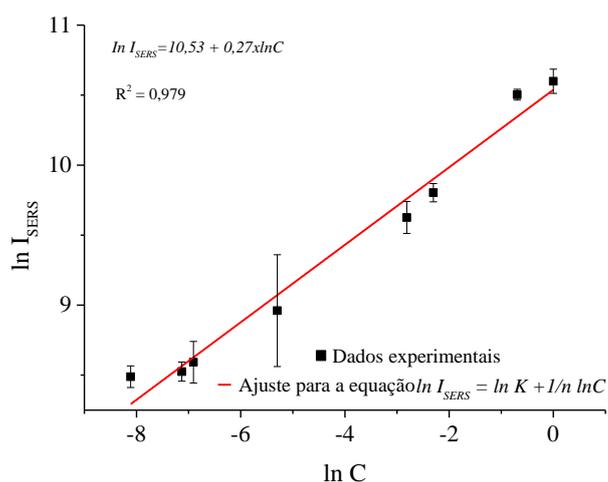


Figura 45. Representação linear da isoterma de Freundlich para a R6G adsorvida em NB3.

A Tabela 8 apresenta os parâmetros consolidados do sistema estudado, obtidos por meio de diferentes modelos de isotermas de adsorção.

Tabela 8. Constantes de adsorção e demais parâmetros das isotermas para o sistema R6G/NB3.

| Isoterma | Equação | $K_{ads}/\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ | Outros parâmetros | R^2 | Chi^2 | $\Delta G_{ads}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ |
|--------------|--|--|---------------------|-------|----------------|--|
| Langmuir(1) | $\theta = \frac{K_{ads}}{1 + K_{ads}}$ | $(8,05 \pm 3,3) \times 10^4$ | | 0,909 | 0,011 | |
| Langmuir (2) | $\frac{C}{\theta} = 0,93C + \frac{1}{K_{ads}}$ | $(2,34 \pm 0,02) \times 10^5$ | | 0,978 | | -77,25 |
| Frumkin | $\theta = \frac{K_{ads}\exp(2g\theta)}{1 + K_{ads}\exp(2g\theta)}$ | $(5,1 \pm 0,01) \times 10^3$ | $g = 0,15 \pm 0,02$ | 0,981 | 0,002 | |
| Freundlich | $\ln I_{SERS} = \ln K + \frac{1}{n} \log C$ | $(2,35 \pm 0,03) \times 10^4$ | $n = 3,7$ | 0,976 | | |

* O valor de K na equação de Freundlich não guarda relação com a constante de adsorção.

Considerando os valores de K_{ads} encontrados, observa-se que a interação entre a R6G e os NB3 não é tão forte, quando comparada com a adsorção de R6G sobre AgNPs, onde se observou um valor de K_{ads} da ordem de 10^6 , para um sistema que seguiu um modelo de adsorção de Langmuir [142].

6.1.2.3.7. Espectroscopia Raman e SERS da Cocaína

Foram obtidos espectros SERS de soluções de COC com concentrações variando de 5×10^{-2} a 1×10^{-9} mol/L, com o substrato SERS de AuNBs, conforme metodologia descrita para a obtenção dos espectros SERS e Raman da R6G. Os espectros SERS obtidos, bem como o espectro Raman da COC em pó podem ser observados na Figura 46.

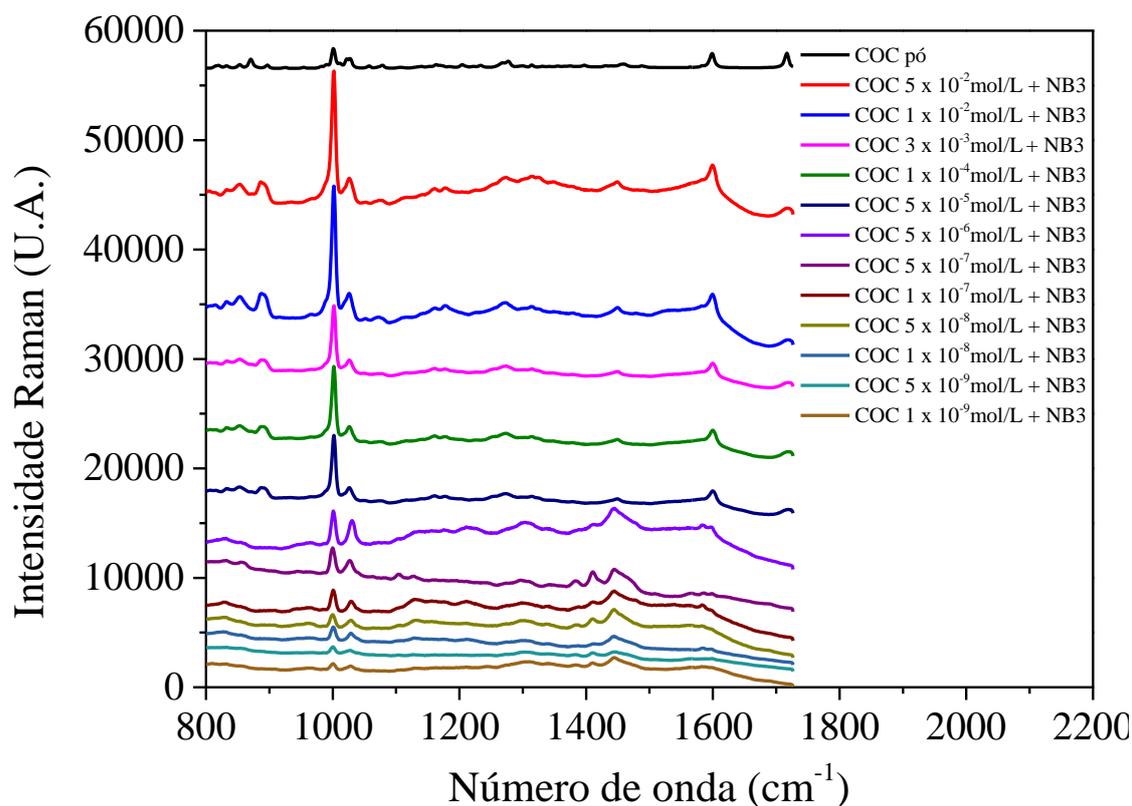


Figura 46. Espectros SERS da COC em pó e com substrato NB3 em diferentes concentrações (5×10^{-2} a 1×10^{-9} mol/L).

A variação proporcional da intensidade da banda em 1004 cm^{-1} , usada como referência, em função da concentração pode ser observada por meio dos espectros SERS da COC em diferentes concentrações. O espectro Raman da COC em pó foi utilizado como parâmetro para as atribuições vibracionais para as amostras em solução, e podem ser consultadas na Tabela 6.

6.1.2.3.8. Estudo da adsorção da cocaína no substrato SERS NB3

Foram utilizadas as isotermas de Langmuir, Frumkin e Freundlich para a investigar a interação entre a molécula de COC e o substrato SERS-ativo NB3. Assim, foi verificada a variação da intensidade SERS da molécula de COC adsorvida em função de sua concentração, foi possível observar que a partir de uma determinada concentração (alta) a intensidade tende a não variar e, avaliados os melhores ajustes.

6.1.2.3.8.1 Isotermas de Langmuir

Os resultados apresentados na Figura 47(a) demonstram a variação do recobrimento superficial (θ) em função da concentração de COC adsorvida em NB3 e, em (b), a representação linear da isoterma de Langmuir para a COC adsorvida nesse substrato, utilizando como referência a intensidade SERS em 1004 cm^{-1} .

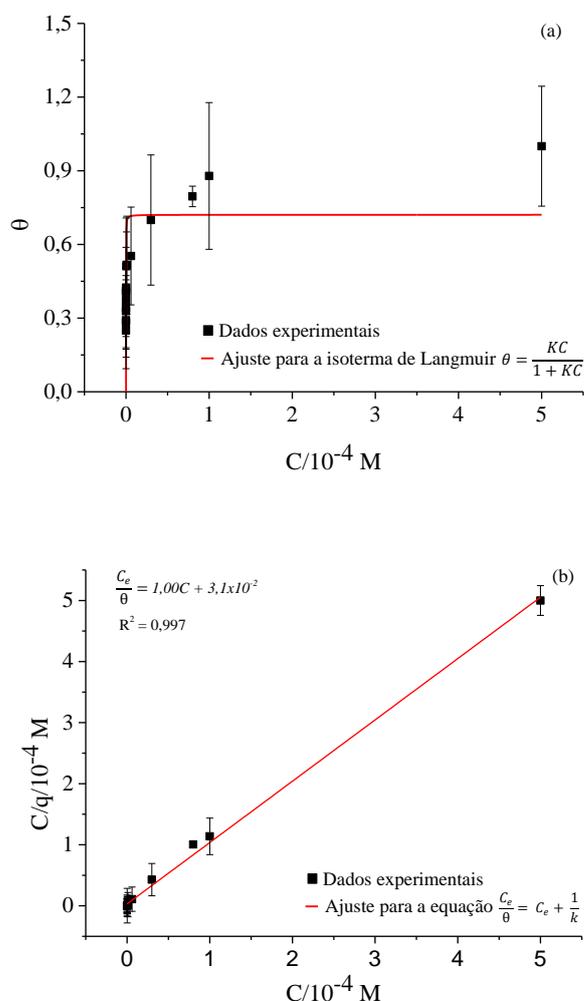


Figura 47. Isotermas de Langmuir para adsorção da COC em NB3: (a) representação assintótica, (b) representação linear.

De acordo com gráfico da Figura 48(a), a capacidade máxima de adsorção calculada, considerando uma monocamada, é de $0,72 \pm 0,09$ mmol/g.

No que se refere ao ajuste feito para a forma linear da isoterma de Langmuir (Figura 46(b)), o coeficiente angular obtido foi de 0,997, gerando uma $K_{ads} = (31,56 \pm 0,02)$ M e ΔG_{ads} de -84,12 kJ/mol ($\Delta G_{ads} = -RT \ln K_{ads}$).

Os valores de ΔG_{ads} obtidos indicam que a COC adsorve no substrato NB3 por meio de uma adsorção física e que a adsorção é de natureza espontânea, sendo que, de acordo com os resultados obtidos para a R6G neste trabalho, constata-se uma adsorção ligeiramente mais intensa para a COC.

6.1.2.3.8.2 Isothermas de Frumkin

A Figura 48 representa a variação do recobrimento superficial (θ) em função da concentração de COC adsorvida em NB3 com o ajuste da isoterma de Frumkin, utilizando como referência a intensidade SERS em 1004 cm^{-1} .

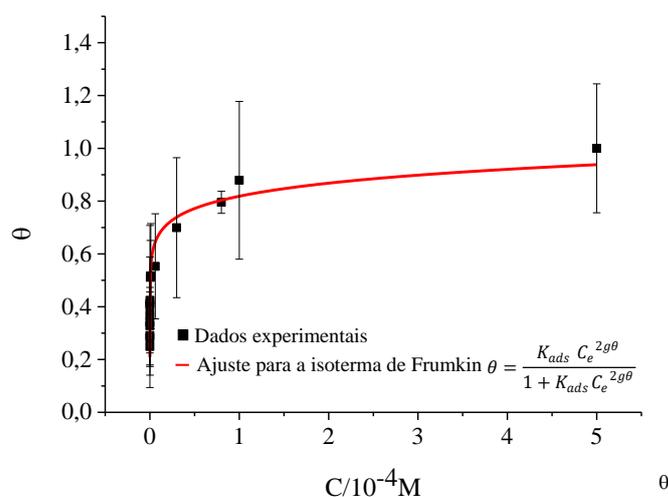


Figura 48. Recobrimento superficial (θ) em função da concentração de COC adsorvida em NB3.

Os ajustes pela isoterma de Frumkin trouxeram valores de $g > 0$, conforme Tabela 49, tornando possível concluir como atrativa o tipo de interação entre as moléculas de COC.

6.1.2.3.8.3 Isotermas de Freundlich

Assim como feito nas discussões da isoterma de Freundlich para a R6G, serão considerados os valores de n como forma de avaliar o favorecimento ou não do processo de adsorção da COC [84] [89].

Os ajustes realizados pela isoterma de Freundlich (Figura 49) para o sistema demonstraram um valor de $n = 1,42 \pm 0,03$, permitindo inferir que a adsorção da molécula de COC pelo sistema NB3 é favorável.

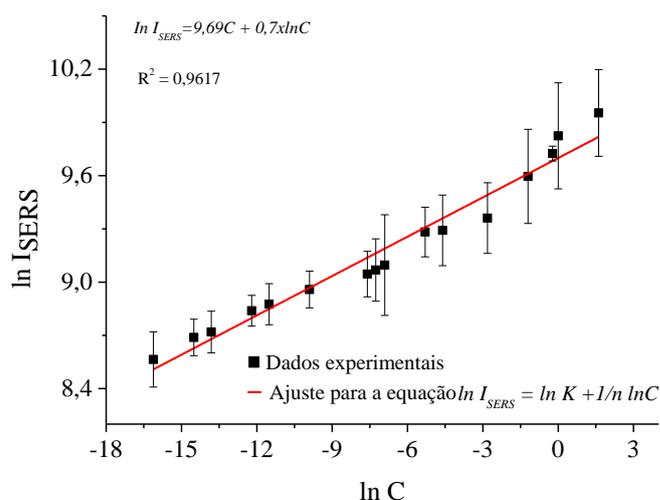


Figura 49. Ajustes realizados pela isoterma de Freundlich para a adsorção da molécula de COC pelo sistema NB3.

A Tabela 10 apresenta os parâmetros consolidados do sistema estudado.

Tabela 9. Constantes de adsorção e demais parâmetros das isotermas para o sistema COC/NB3.

| Isoterma | Equação | $K_{ads}/\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}$ | Outros parâmetros | R^2 | Chi^2 | $\Delta G_{ads}/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ |
|--------------|--|--|----------------------|-------|----------------|--|
| Langmuir(1) | $\theta = \frac{K_{ads}}{1 + K_{ads}}$ | $(2,31 \pm 1,4) \times 10^6$ | | 0,716 | 0,051 | |
| Langmuir (2) | $\frac{C}{\theta} = 0,93C + \frac{1}{K_{ads}}$ | $(3,17 \pm 0,02) \times 10^5$ | | 0,997 | | -84,12 |
| Frumkin | $\theta = \frac{K_{ads}\exp(2g\theta)}{1 + K_{ads}\exp(2g\theta)}$ | $(4,1 \pm 0,01) \times 10^3$ | $g = 0,08 \pm 0,005$ | 0,959 | 0,002 | |
| Freundlich | $\ln I_{SERS} = \ln K + \frac{1}{n} \log C$ | $(2,7 \pm 0,02) \times 10^5$ | $n = 1,42$ | 0,962 | | |

* O valor de K na equação de Freundlich não guarda relação com a constante de adsorção.

6.1.2.3.9. Medidas SERS das IDLs contaminadas com COC

A Figura 50 mostra uma IDL masculina dopada com uma solução de COC $5,0 \times 10^{-2}$ mol/L e depositada sobre a superfície de uma lâmina de alumínio de dimensão 25×25 mm.



Figura 50. Imagem de impressão digital dopada com solução de MA $5,0 \times 10^{-2}$ mol/L depositada sobre uma lâmina de Alumínio de 25×25 mm.

Os espectros SERS obtidos para as amostras masculina e femininas são apresentados na Figura 51.

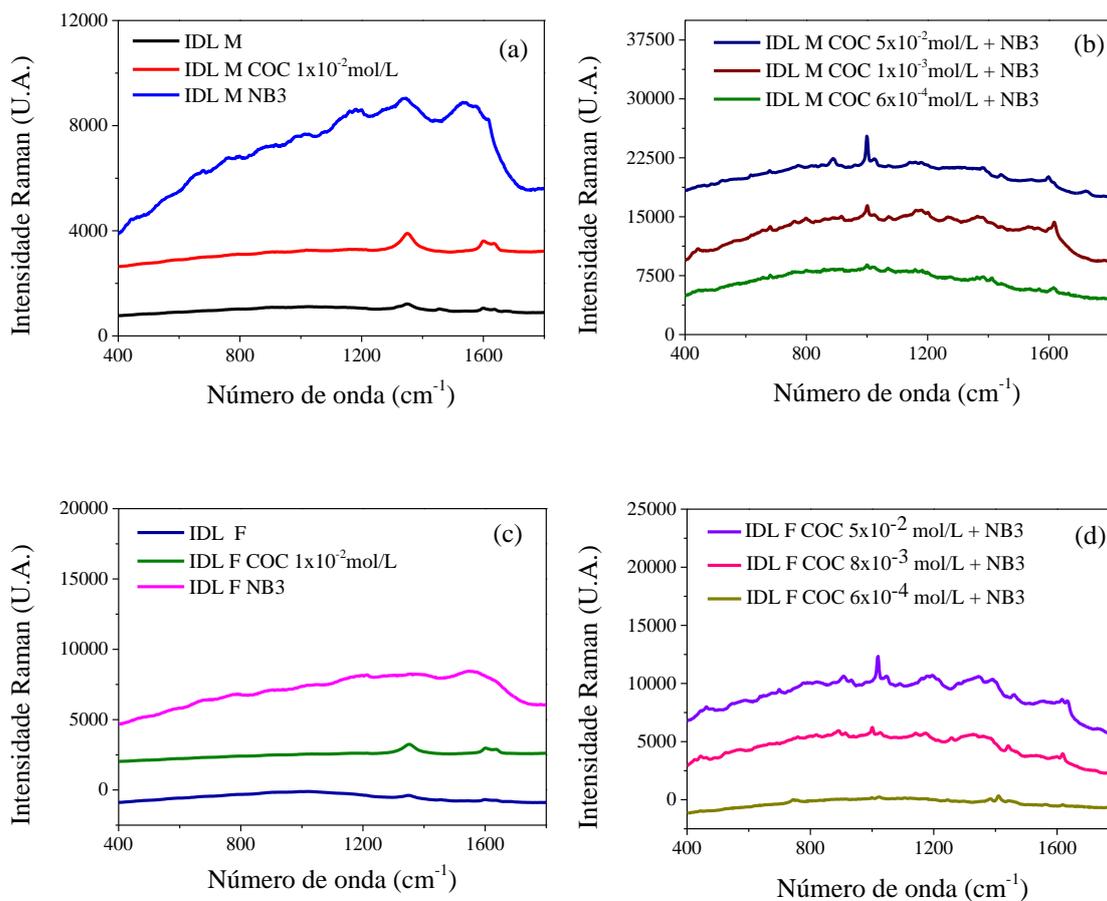


Figura 51. Espectros Raman, medido em 633 nm, da IDL masculina medido sem contaminação; contaminada com COC 1×10^{-2} mol/L; e com o substrato NB3 aplicado (a); Espectros SERS, medido em 633 nm, da IDL masculina contaminada com COC 5×10^{-2} mol/L, COC 8×10^{-3} mol/L e COC 6×10^{-4} mol/L e com o substrato NB3 aplicado; (b); Espectros Raman, medido em 633 nm, da IDL feminina sem contaminação; contaminada com COC 1×10^{-2} mol/L; e com o substrato NB3 aplicado (c); Espectros SERS, medido em 633 nm, da IDL feminina contaminada com COC 5×10^{-2} mol/L, COC 8×10^{-3} mol/L e COC 6×10^{-4} mol/L e com o substrato NB3 aplicado (d).

Para as medidas realizadas com o laser em 633 nm, os espectros Raman da IDL, IDL COC e IDL NB3 apresentados nas Figuras 51(a) e (c) não apresentaram nenhuma banda relacionada a amostra de COC, apenas bandas relacionadas as próprias lâminas e à impressão digital. Já em (b) e (d), que se referem às amostra de IDL contaminada com COC em diferentes concentrações, é possível observar bandas características da droga em 1004 cm^{-1} (Modo de respiração do anel aromático- estiramento simétrico), 1026 cm^{-1} (estiramento assimétrico do anel aromático), 1462 cm^{-1} (deformação assimétrica CH₃), 1601 cm^{-1} (estiramento C=C) e 1706 cm^{-1} (estiramento simétrico C=O) [134]. Observa-se ainda a diminuição da intensidade SERS em 1004 cm^{-1} , com a diminuição da concentração. Comportamento similar foi observado para as demais medidas para as

amostras dos voluntários, em 785 nm, sendo que as medidas se encontram nas Figuras 52(a)-(d). É possível portanto observar, que o método foi capaz de detectar drogas em impressão digital, até uma concentração da ordem de 10^{-4} M. Cabe ressaltar que as medidas obtidas em 785 nm apresentaram menos fluorescência, o que se deve ao fato de que esta radiação é menos energética, não favorecendo processos eletrônicos. A massa que pode ser verificada, considerando os 15 μ L de solução utilizados, foi de 273 ng.

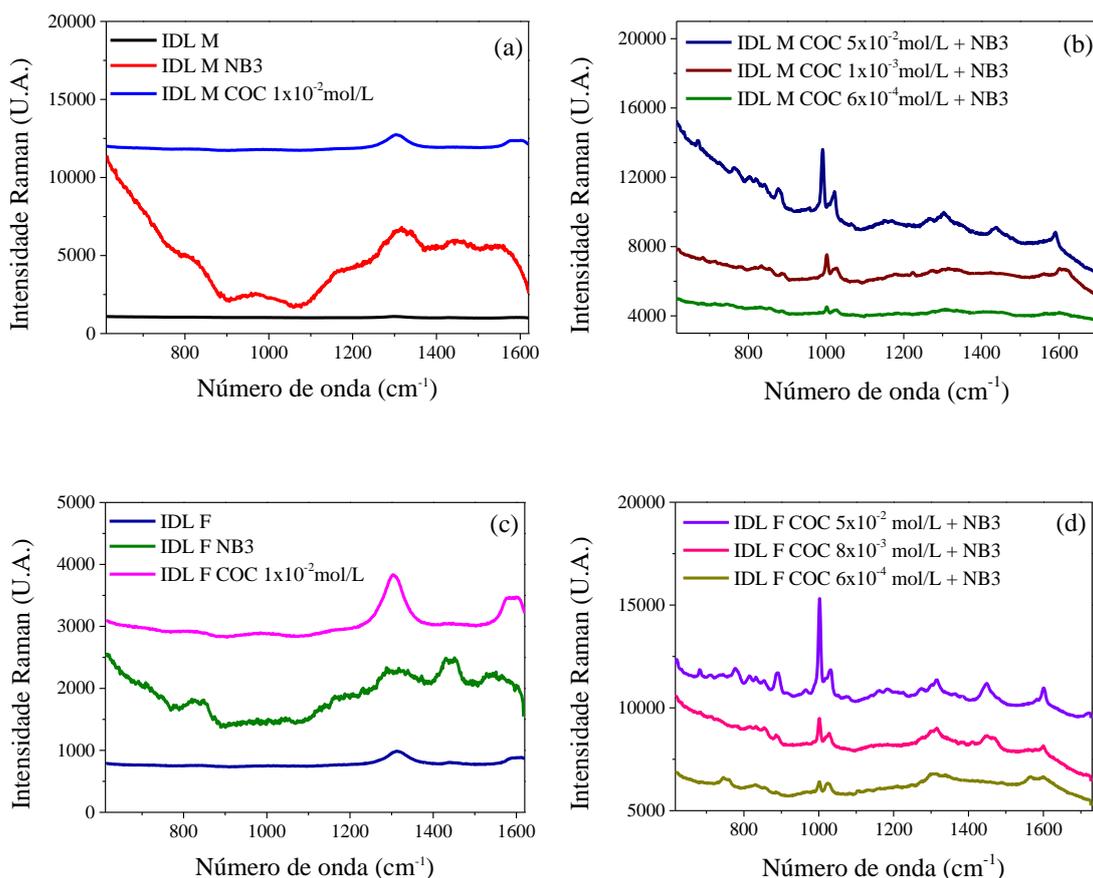


Figura 52. Espectros Raman, medido em 785 nm, da IDL masculina medido sem contaminação; contaminada com COC 1×10^{-2} mol/L; e com o substrato NB3 aplicado (a); Espectros SERS, medido em 785 nm, da IDL masculina contaminada com COC 5×10^{-2} mol/L, COC 8×10^{-3} mol/L e COC 6×10^{-4} mol/L e com o substrato NB3 aplicado (b); Espectros Raman, medido em 785 nm, da IDL feminina sem contaminação; contaminada com COC 1×10^{-2} mol/L; e com o substrato NB3 aplicado (c); Espectros SERS, medido em 785 nm, da IDL feminina contaminada com COC 5×10^{-2} mol/L, COC 8×10^{-3} mol/L e COC 6×10^{-4} mol/L e com o substrato NB3 aplicado (d).

Dentre as metodologias estudadas para fins comparativos, essa foi a que mais se aproximou dos ideais inspiradores para a realização do presente trabalho, por ser um método simples e direto. De fato, os dados apresentados são promissores e indicam que a abordagem proposta pode ser melhorada e empregada na solução de um problema real

enfrentado pela polícia nas regiões de fronteira e imigração; onde viajantes nacionais e internacionais tentam atravessar com drogas.

7. Determinação do sexo a partir das impressões digitais utilizando espectroscopia vibracional e modelos quimiométricos

7.1. Modelos quimiométricos baseados em Microespectroscopia Raman

7.1.1. Avaliação da influência do tempo e armazenamento nos modelos quimiométricos

. Uma micrografia óptica da região oleosa de uma impressão digital (gota) de uma doadora é apresentada na Figura 53 e regiões semelhantes foram usadas para as medidas dos compostos químicos mostrados no espectro de Raman.

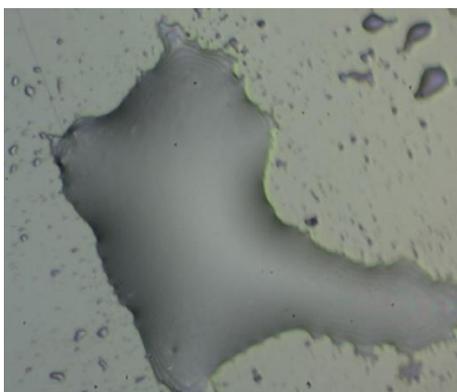


Figura 53. Micrografia óptica de uma gota de óleo de impressão digital depositado em lâmina de vidro revestida de alumínio medida com sistema de microscópio Raman com ampliação de 50x.

Foram obtidos 252 espectros Raman das amostras coletadas em D0 (126 espectros do sexo masculino e 126 de amostras femininas). A Figura 54 apresenta o espectro Raman obtido de cada amostra, nas mesmas condições e sem nenhum tipo de pré-processamento. É possível observar um fundo de fluorescência significativa, ruído e variação nas intensidades de pico entre diferentes grupos de gênero.

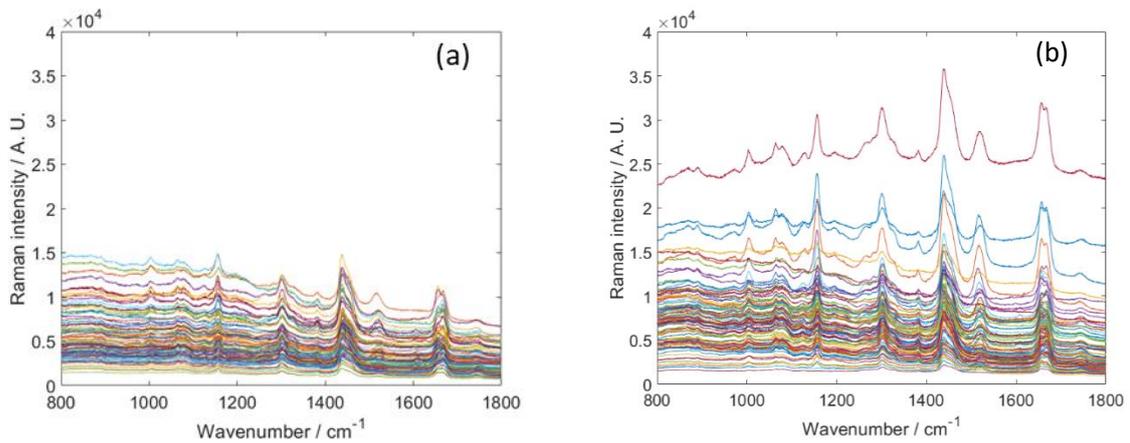


Figura 54. Espectros Raman obtidos de cada amostra de impressão digital, nas mesmas condições e sem nenhum tipo de pré-processamento do grupo feminino (a) e do grupo masculino (b).

O pré-processamento utilizando *absolute value*, *baseline* e *normalize* foi o que apresentou a melhor comparação espectral entre os grupos masculino e feminino, como demonstrado na Figura 55 (a) e (b). A linha pontilhada (Figura 55 (a)) refere-se a faixa espectral onde foi possível observar diferenças mais evidentes entre os picos dos espectros médios femininos e masculinos, quando comparados e que foram, conseqüentemente, utilizados no modelo de calibração. O vetor de projeções de maior importância (VIP) do modelo PLS-DA desenvolvido com o conjunto de dados D0 de treinamento é apresentado na Figura 55(c).

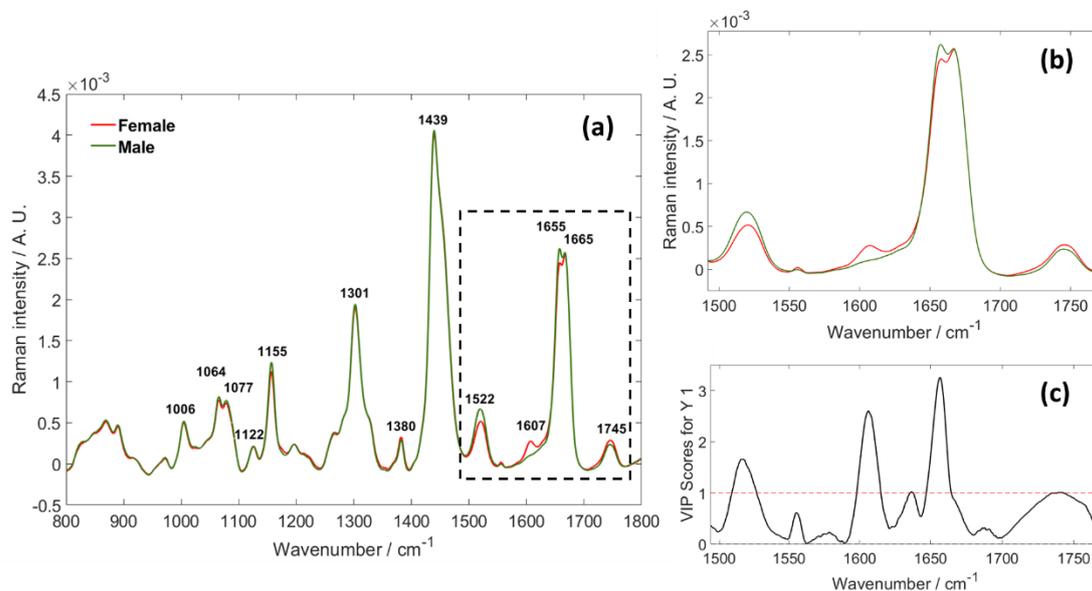


Figura 55. (a) Comparação das médias dos espectro Raman feminino (vermelho) e o masculino (verde), com destaque para a região com maior variação das intensidades Raman entre o grupo feminino e o masculino; (b) Ampliação da região com maior variação de intensidades; (c) Vetor de projeções de maior importância (VIP) do modelo PLS-DA desenvolvido com o conjunto de dados D0 de treinamento.

Os espectros raman da gota da impressão digital mostram características de bandas de lipídios, carotenoides e proteínas. As cadeias de hidrocarbonetos de lipídios são encontradas em 1301, 1439, 1655, 1665 e 1734 cm^{-1} , que são atribuídas aos modos de tesoura e torção CH_2 , modos de estiramento $\text{C}=\text{C}$ e modos de estiramento do éster $\text{C}=\text{O}$, respectivamente. O pico estreito observado em 1382 cm^{-1} é devido ao modo ν ($\text{C}-\text{C}$) do esqualeno. A vibração ν ($\text{C}=\text{C}$) observada na região de 1525 cm^{-1} , os modos ν ($\text{C}-\text{C}$) a 1155 cm^{-1} e os modos ρ ($\text{C}-\text{CH}_3$) em torno de 1006 cm^{-1} são atribuídos geralmente à presença de carotenoide [143] [144]. Além disso, bandas fracas associadas às proteínas também são observadas em 1210 cm^{-1} (tirosina) e 1558 cm^{-1} (triptofano). Outras bandas vibracionais contribuintes são atribuídas a amida I (1600 – 1900 cm^{-1}) e amida III (1230 – 1300 cm^{-1}) [37].

Um resumo dos números de ondas e suas atribuições é fornecido na Tabela 11. Interpretações mais detalhadas dos componentes químicos no espectro Raman de impressões digitais foram previamente discutidas [143].

Tabela 10. Atribuições vibracionais das bandas Raman observadas nas impressões digitais.

| Número de onda (cm^{-1}) | Atribuição tentativa |
|-------------------------------------|--|
| 1004 | $\nu(\text{C}-\text{C})$ |
| 1064 | $\nu(\text{C}-\text{C})$, |
| 1077 | $\nu(\text{C}-\text{C})$ |
| 1125 | $\nu(\text{C}-\text{C})$, $\nu(\text{C}-\text{N})$ |
| 1155 | $\nu(\text{C}-\text{C})$ |
| 1265 | <i>cis</i> $\delta(-\text{CH})$ |
| 1301 | $\delta_r(\text{CH}_2)$ |
| 1380 | $\delta(\text{CH}_3)$, $\delta(\text{CH})$, $\nu(\text{C}-\text{C})$ |
| 1439 | $\delta(\text{CH}_2/\text{CH}_3)$ |
| 1522 | $\nu(\text{C}=\text{C})$ |
| 1607 | Trp, Tyr, Phe |
| 1655 | $\nu(\text{C}=\text{C})$ |
| 1665 | $\nu(\text{C}=\text{C})$ |
| 1745 | $\nu(\text{C}=\text{O})$ Fosfolipídeos [K. Czamara] |

Adaptado de [143].

Abreviações: ν -estiramento; δ -deformação angular, Trp-Triptofano, Tyr-Tirosina, Phe-fenilalanina.

Os espectros médios das amostras masculinas e femininas armazenadas em condições escuras ou claras (para D0, D7 e D30) são mostrados na Figura 56(a)-(d) e, indicam a presença de características no espectro Raman específicas para um determinado sexo. Estas características são observadas principalmente nos números de ondas em 1522, 1607, 1655 e 1665 cm^{-1} , que são associados a carotenoides, aminoácidos aromáticos (Trp, Tyr, Phe), ácidos graxos insaturados, como ácidos palmitoléico e oleóicos e esqualeno, respectivamente [143] [145] [146]. As bandas em 1655 e 1665 cm^{-1} podem ser atribuídas a conformação cis e trans de ácidos graxos insaturados [147] [148].

As diferenças de intensidade relativa observadas para essas bandas são resultantes dos processos químicos, biológicos ou físicos que ocorrem ao longo do tempo na composição inicial das impressões digitais envolvendo grande número de fenômenos como degradação, secagem, oxidação ou polimerização. Como se pode observar, as intensidades relativas se alteram ao longo do tempo, especialmente nas bandas atribuídas aos carotenóides (1155, 1522 cm^{-1}), esqualeno (1665 cm^{-1} – processos de oxidação em condições de acondicionamento na luz) e ácidos graxos insaturados (1655 cm^{-1}). Por outro lado, as bandas atribuídas às proteínas apresentaram um comportamento mais estável. Em geral, as taxas de decomposição observadas para as amostras armazenadas sob condições de luz são maiores do que as amostras armazenadas no escuro. A degradação dessas bandas também foi relatada por Andersson e colaboradores [143]. Para avaliar a influência da decomposição da impressão digital ao longo do tempo, os modelos multivariados PLS-DA e SVM-DA foram obtidos em diferentes regiões espectrais: 1591-1768 cm^{-1} (modelo 1) e 1494-1768 cm^{-1} (modelo 2). É importante ressaltar que o modelo 2 inclui o sinal Raman em 1522 cm^{-1} , que diminui de intensidade com o tempo de exposição à luz, indicando que a substância que dá origem a esse sinal se decompõe com o tempo, ou pela ação da luz ou pelo oxigênio do ar.

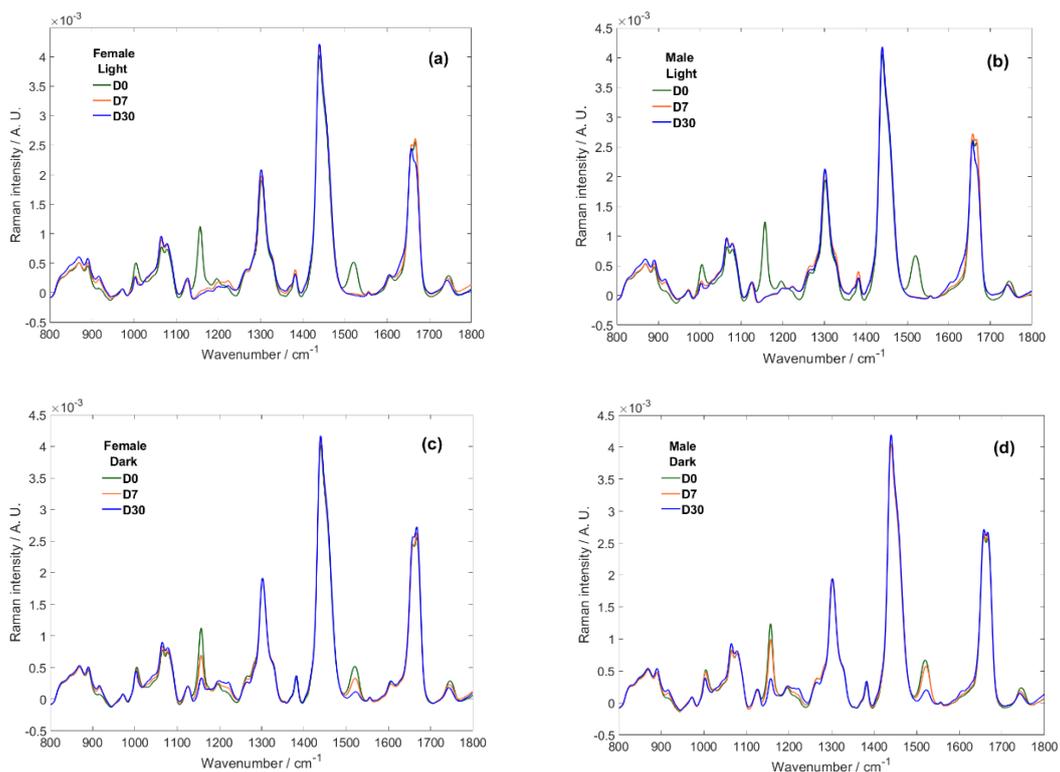


Figura 56 Espectros Raman de impressões digitais armazenadas em ausência de luz e presença de luz. (a) e (c) para mulheres e (b) e (d) para homens. D0, D7 e D30 correspondem a amostras recém coletadas, após 7 dias e após 30 dias, respectivamente.

O PCA foi utilizada como a primeira etapa da análise quimiométrica e aplicado como estratégia exploratória dos dados e para identificar *outliers* mais evidentes. Conforme detalhado anteriormente, o modelo PCA foi desenvolvido com 126 espectros Raman das impressões digitais de cada gênero, do dia da coleta (D0) e usando o espectro completo. O pré-processamento utilizado no PCA foi a correção multiplicativa de sinal (Extended Multiplicative Signal Correction- EMSC) e os espectros foram centrados na média. Após a análise dos *outliers* foram excluídos 27 espectros femininos e 24 espectros masculinos, que correspondem a aproximadamente 4 amostras para cada sexo. A projeção do PCA da matriz de dados contendo as amostras remanescentes de ambos os sexos (Figura 57), no primeiro escore dos três componentes, permite a observação da distribuição das amostras e a análise qualitativa de seu agrupamento. É possível observar uma forte sobreposição entre os dados femininos e masculinos.

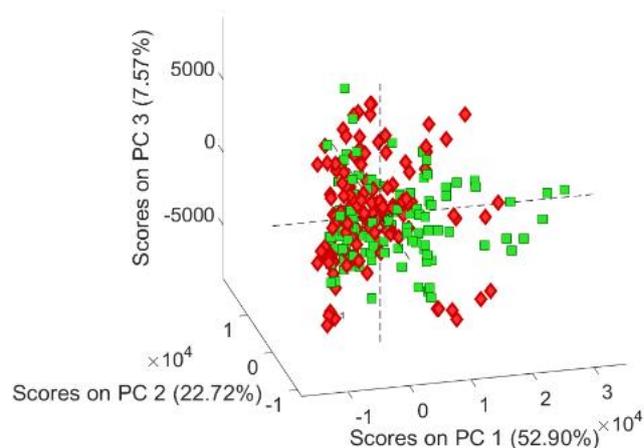


Figura 57. PCA de espectros femininos (vermelhos) e masculinos (verdes) obtido com três componentes principais. Cada ponto representa um espectro raman individual.

Após a exclusão dos *outliers*, o conjunto de treinamento D0 utilizado para a construção de modelos foi composto por 67 espectros do grupo feminino e 71 do grupo masculino (total:138).

Foram avaliados cerca de 418 modelos baseados em PLS-DA e SVM-DA, obtidos pela combinação de diferentes pré-processamentos.

Para os métodos com melhores resultados, os pré-processamentos utilizados foram: *absolute value*, *baseline (Automatic Weighted Least Squares, order=5)*, *normalize (1-Norm, Área = 1)*, *smoothing (order: 0, window: 15 pt, tails: polyinterp)* e *mean center*.

Os resultados das estatísticas de T^2 e Q para identificação dos valores de classe estimados e limite de discriminação com o modelo PLS-DA desenvolvido com o conjunto de treinamento D0, para todos os conjuntos de teste, são mostrados na Figura 58 (a). Conforme pode ser observado, alguns espectros apresentaram valores de resíduos T^2 e Q maiores do que seus limites de confiança de 99%. No entanto, considerando o tempo de coleta da impressão dos conjuntos de teste de D7 e D30, o número de outliers foi consideravelmente baixo, indicando que a mudança nas bandas de carotenoides e ácidos graxos insaturados tiveram pouca influência nesses parâmetros.

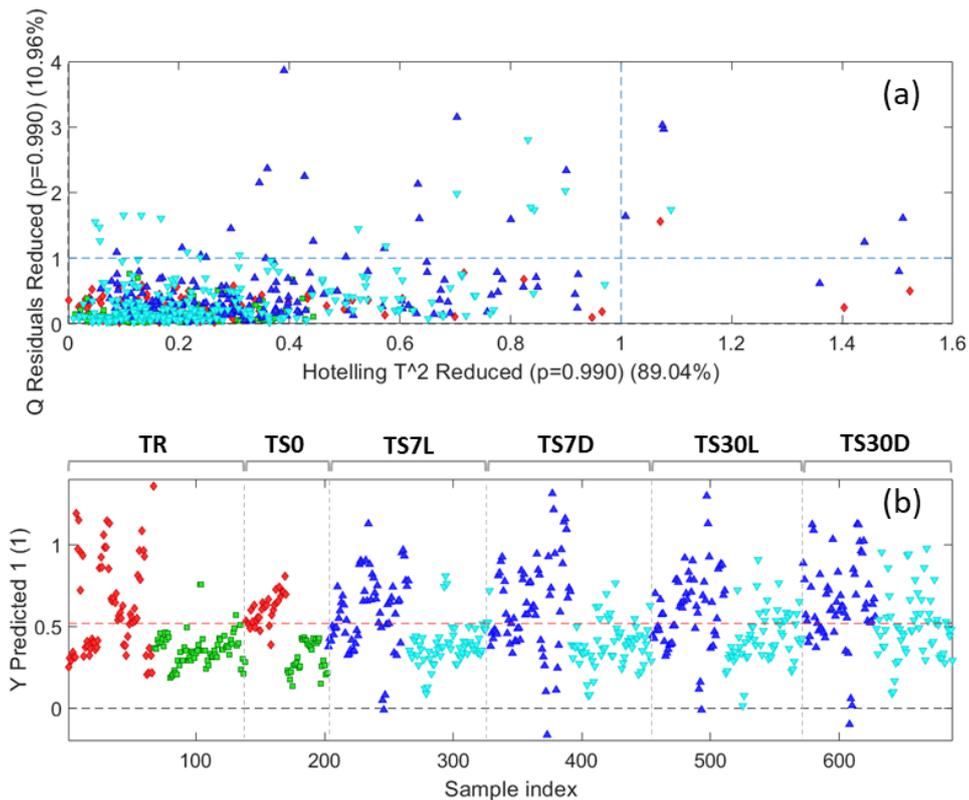


Figura 58. (a) $Hotelling T^2 \times$ Resíduos Q (b) valores de classe estimados para o grupo de treinamento D0 e para todos os grupos de teste do modelo 2 de PLS-DA (região de 1494-1768 cm^{-1}). (---) limite de confiança 99%, (♦) grupo de treinamento feminino, (■) grupo de treinamento masculino, (▲) grupo de teste feminino (▼) grupo de teste masculino.

A distribuição dos valores de classe obtidos com o modelo PLS-DA é apresentada na Figura 58 (b). A dispersão desses valores foi considerável, confirmando a análise por PCA de que a separação por gênero é um problema complexo. No entanto, o desempenho do modelo pode ser melhor avaliado por suas figuras de mérito apresentadas na Tabela 12. Conforme pode ser observado, os resultados da taxa de eficiência (EFR) dos grupos de treinamento e teste não apresentam diferença significativa, indicando que não ocorreu *overfitting*. A EFR combina a contribuição dos parâmetros sensibilidade, especificidade e as taxas falsas positivas e negativas, sendo o melhor parâmetro para julgar o desempenho global do método.

Apesar da dispersão significativa dos valores estimados da classe, foram obtidos bons valores de EFR para os conjuntos de testes. O EFR no conjunto de testes, considerando o modelo 1, foi de 91,3% para D0, 67,3% para D7 luz, 76,8% para D07 escuro, 63,2% para D30 luz e 79,3% para D30 escuro. Para o modelo 2 foi de 91,3% para D0, 74,8% para D7 luz, 71,9% para D07 escuro, 69,2% para D30 luz e 65,9% para D30 escuro. Como já era esperado, as melhores EFRs foram obtidas para o conjunto de testes

D0, que contém as amostras na mesma condição do conjunto de treinamento. Merece destaque que as amostras armazenadas sob condições de luz tendem a apresentar EFRs mais baixas. Curiosamente, no PLS-DA, mesmo com a inclusão da banda de absorção 1522 cm^{-1} no modelo 2, a diferença entre os modelos 1 e 2 não foi tão evidente nos conjuntos de teste D0, D7 e D30.

Observou-se então que o efeito da mudança no espectro Raman ao longo do tempo apresentou pequena influência tanto para a identificação de outliers quanto para EFRs, que indica maior peso das bandas 1607 , 1655 e 1665 cm^{-1} nos escores VIP (Figura 56 (b)). Além disso, o sexo feminino apresentou maior número de erros (falso negativo, considerando a notação utilizada para a construção de modelos). Até o momento, os dados não permitem uma explicação conclusiva para a maior variação das amostras femininas, mas possíveis fatores que podem influenciar os resultados femininos podem incluir a variação hormonal mensal e o uso regular de cosméticos.

Tabela 11. Resultados obtidos pelos dois melhores modelos PLS-DA na separação das amostras femininas ($y=1$, positivo) das amostras masculinas ($y=0$, negativo) para o grupo de treino e grupos de teste. O número de variáveis latentes é indicado entre parênteses.

| PLS-DA modelo 1 (6) | | | | | | | |
|-----------------------------|----------|-------|-------|------|------|-------|-------|
| Região (cm^{-1}) | | TR | TS0 | TS7L | TS7D | TS30L | TS30D |
| 1591-1767 | FN | 1 | 1 | 11 | 8 | 11 | 7 |
| | FP | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | TP | 10 | 5 | 10 | 13 | 8 | 14 |
| | TN | 11 | 7 | 20 | 20 | 19 | 17 |
| | I | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | SEN/TPR | 90,9 | 83,3 | 47,6 | 61,9 | 42,1 | 66,7 |
| | SPEC/TN | 100,0 | 100,0 | 95,2 | 95,2 | 95,0 | 94,4 |
| | FNR | 9,1 | 16,7 | 52,4 | 38,1 | 57,9 | 33,3 |
| | FPR | 0,0 | 0,0 | 4,8 | 4,8 | 5,0 | 5,6 |
| | EFR | 95,3 | 91,3 | 67,3 | 76,8 | 63,2 | 79,3 |
| PLS-DA modelo 2 (3) | | | | | | | |
| Região (cm^{-1}) | | TR | TS0 | TS7L | TS7D | TS30L | TS30D |
| 1494-1768 | FN | 5 | 1 | 8 | 9 | 5 | 8 |
| | FP | 1 | 0 | 2 | 2 | 7 | 5 |
| | TP | 7 | 5 | 13 | 12 | 14 | 11 |
| | TN | 10 | 7 | 19 | 19 | 13 | 15 |
| | I | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | SEN/TPR | 58,3 | 83,3 | 61,9 | 57,1 | 73,7 | 57,9 |
| | SPEC/TNR | 90,9 | 100,0 | 90,5 | 90,5 | 65,0 | 75,0 |
| | FNR | 41,7 | 16,7 | 38,1 | 42,9 | 26,3 | 42,1 |
| | FPR | 9,1 | 0,0 | 9,5 | 9,5 | 35,0 | 25,0 |
| | EFR | 72,8 | 91,3 | 74,8 | 71,9 | 69,2 | 65,9 |

Abreviações: FN – Falso negativo; FP-Falso Positivo; TP-Verdadeiro Positivo; TN – Verdadeiro Negativo; I-Indefinido; SEN/TPR-Sensibilidade/Taxa de verdadeiro positivo; SPEC/TNR-Especificidade/Taxa de verdadeiro negativo; FNR-Taxa de falso negativo; FPR-Taxa de falso positivo; EFR-Taxa de Eficiência.

O mesmo conjunto de treinamento foi utilizado para construir o modelo SVM-DAs e os resultados são apresentados na Tabela 13. Após a otimização, ambos os modelos 1 e 2 classificaram 100% dos espectros de treinamento no gênero correto e após a aplicação do grupo de teste, resultaram em uma EFR de 92,6%, onde apenas um erro foi observado para uma amostra masculina. Os outros conjuntos de teste aplicados ao modelo 1 apresentaram EFR: 80,4% para D7 luz, 80,8% para D07 escuro, 58,0% para D30 luz e 74,3% para D30 escuro e para o modelo 2 foi de 92,6% para D0, 72,8% para D7 luz, 78,2% para D07 escuro, 64,1% para D30 luz e 71,1% para D30 escuro. Os resultados mostram uma clara tendência de diminuição das EFRs de TS0 para TS7 e TS30.

Além disso, a diminuição entre os conjuntos de teste do escuro para a luz e a diferença entre os modelos 1 e 2 são mais claras em relação aos modelos PLS-DA, sendo os melhores resultados obtidos na condição escura e modelo 1. No entanto, apesar do EFR

mais baixo, o modelo SVM-DA 1 também apresentou alta eficiência no TS7D e TS7L, uma vez que foram obtidos 80% de eficiência. Os EFRs elevados obtidos com SVM-DA podem ser atribuídos à capacidade de modelar não linearidades associadas à complexidade do problema de gênero e à decomposição de impressões digitais descrita anteriormente.

Tabela 12. Resultados obtidos pelos modelos SVM-DA para a separação das amostras femininas (positivo) e amostras masculinas (negativo) no grupo de treino e em todos os grupos de teste.

| SVM-DA modelo 1 | | | | | | | |
|----------------------------|---------|-------|-------|------|------|-------|-------|
| Região (cm ⁻¹) | | TR | TS0 | TS7L | TS7D | TS30L | TS30D |
| 1591-1767 | FN | 0 | 0 | 6 | 5 | 3 | 5 |
| | FP | 0 | 1 | 2 | 3 | 12 | 5 |
| | TP | 12 | 6 | 15 | 16 | 16 | 14 |
| | TN | 13 | 6 | 19 | 18 | 8 | 15 |
| | I | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | SEN/TPR | 100,0 | 100,0 | 71,4 | 76,2 | 84,2 | 73,7 |
| | SPEC/TN | 100,0 | 85,7 | 90,5 | 85,7 | 40,0 | 75,0 |
| | FNR | 0,0 | 0,0 | 28,6 | 23,8 | 15,8 | 26,3 |
| | FPR | 0,0 | 14,3 | 9,5 | 14,3 | 60,0 | 25,0 |
| | EFR | 100,0 | 92,6 | 80,4 | 80,8 | 58,0 | 74,3 |
| SVM-DA modelo 2 | | | | | | | |
| Região (cm ⁻¹) | | TR | TS0 | TS7L | TS7D | TS30L | TS30D |
| 1494-1768 | FN | 0 | | 8 | 6 | 6 | 7 |
| | FP | 0 | 1 | 3 | 3 | 8 | 4 |
| | TP | 12 | 5 | 13 | 15 | 13 | 12 |
| | TN | 13 | 6 | 18 | 18 | 12 | 16 |
| | I | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | SEN/TPR | 100,0 | 100,0 | 61,9 | 71,4 | 68,4 | 63,2 |
| | SPEC/TN | 100,0 | 85,7 | 85,7 | 85,7 | 60,0 | 80,0 |
| | FNR | 0,0 | 0,0 | 38,1 | 28,6 | 31,6 | 36,8 |
| | FPR | 0,0 | 14,3 | 14,3 | 14,3 | 40,0 | 20,0 |
| | EFR | 100,0 | 92,6 | 72,8 | 78,2 | 64,1 | 71,1 |

Abreviações: FN – Falso negativo; FP-Falso Positivo; TP-Verdadeiro Positivo; I-Indefinido; SEN/TPR-Sensibilidade/Taxa de verdadeiro positivo; SPEC/TNR-Especificidade/Taxa de verdadeiro negativo; FNR-Taxa de falso negativo; FPR-Taxa de falso positivo; EFR-Taxa de Eficiência.

7.2. Modelo Raman com as médias das amostras

O desempenho do modelo pode ser avaliado por suas figuras de mérito apresentadas na Tabela 14.

Tabela 13. Figuras de mérito para o modelo Raman PLS-DA.

| PLS-DA | Raman (16) | |
|----------|------------|------|
| | TR | VAL |
| FN | 1 | 10 |
| FP | 4 | 2 |
| TP | 80 | 20 |
| TN | 77 | 31 |
| SEN/TPR | 98,8 | 66,7 |
| SPEC/TNR | 95,1 | 93,9 |
| FNR | 1,2 | 33,3 |
| FPR | 4,9 | 6,1 |
| EFR | 96,9 | 79,1 |

Após a otimização do modelo, 96,9% das amostras de treinamento foram classificadas no gênero correto e após a aplicação do grupo de teste, foi obtida uma EFR de 79,1%, demonstrando, desta forma, resultados compatíveis aos observados no grupo de treinamento na análise dos espectros individuais apresentados da Tabela 14, quando o grupo de treinamento foi composto somente com espectros medidos em D0. A partir dos resultados observados, é possível inferir que a inclusão no grupo de treinamento das médias dos espectros de D0, D7 e D30, nas condições de armazenamento no claro e no escuro, aprimora a representatividade das amostras e a acurácia dos modelos, uma vez que a degradação observada nos espectros são consideradas. O gênero feminino também apresentou maior número de erros (falso negativo) e, assim como na análise de resultados no item 7.1.1, não foi possível avaliar, de forma conclusiva, o motivo da maior variação observada nas amostras femininas.

As mesmas condições usadas para a construção dos modelos quimiométricos de PLS-DA testadas para SVM-DA. No entanto os resultados obtidos foram inferiores a 50% de classificações corretas e, por este motivo, optou-se por não serem explorados.

7.3. Modelos quimiométricos baseados em FTIR

Os espectros de FTIR utilizados para o treinamento do modelo, após a correção e normalização da linha de base, são apresentados na Figura 59(a). Mesmo após o pré-

processamento, esses espectros revelam variação significativa de ruído e intensidade no início (500 a 400 cm^{-1}) e no final da região do IR médio (4000 a 3500 cm^{-1}). No entanto, algumas diferenças nas intensidades de pico entre os dois grupos (feminino e masculino) podem ser observadas de 3000 a 2800 cm^{-1} e 1790 a 1150 cm^{-1} , que são mais visíveis nos espectros médios apresentados na Figura 59(b) e uma ampliação da região entre 1790 a 1150 cm^{-1} pode ser observada na Figura 59(c).

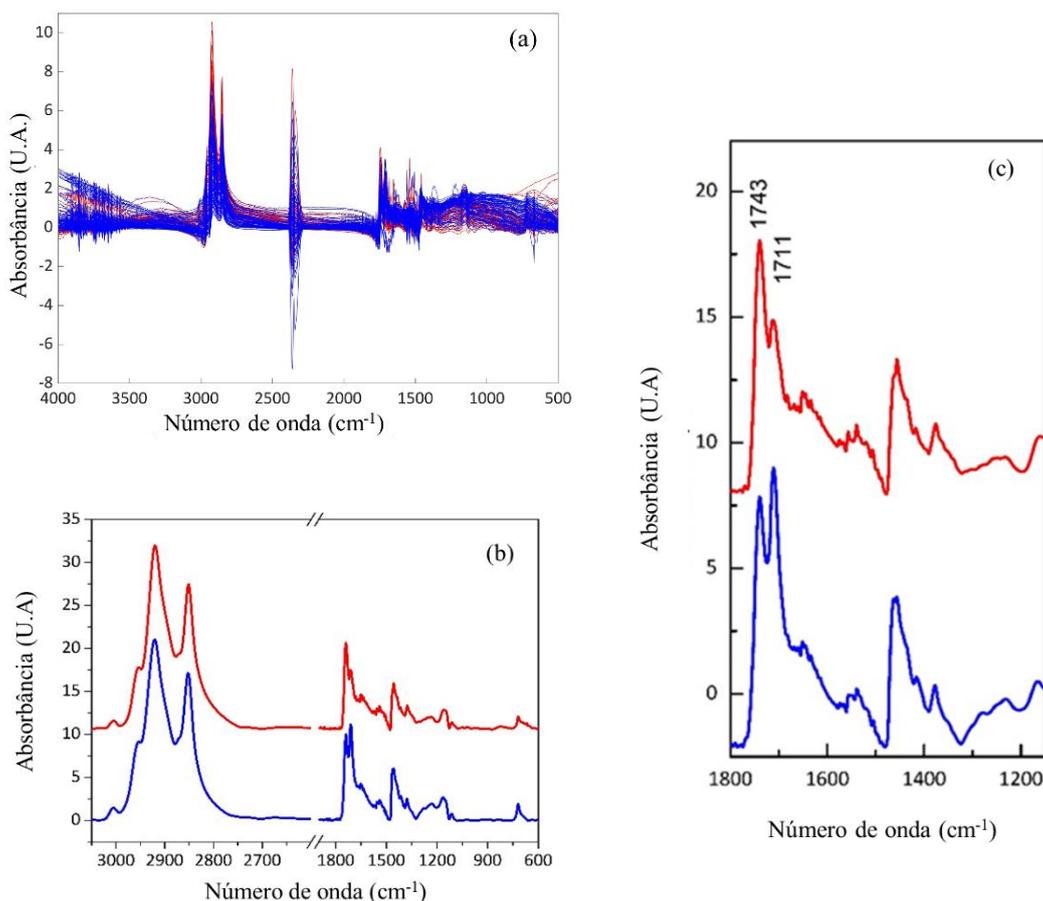


Figura 59. Espectros de FTIR pré-processados de amostras de IDL usadas no conjunto de treinamento (a); espectro médio de marcas de IDL das classes feminina (vermelha) e masculina (azul) (b); recorte dos espectros médios feminino e masculino de 1150 a 1800 cm^{-1} , onde a principal diferença espectral entre eles (1711 e 1743 cm^{-1}) é destacada (c).

Os espectros de FTIR da IDL apresentados na Figura 59 (b) mostram características de bandas de lipídios, carotenóides e proteínas. As regiões espectrais 1000–1850 cm^{-1} e 2700–3600 cm^{-1} foram identificadas como as que mais possuem informação e corresponderam às vibrações moleculares do material écrino e sebáceo (Tabela 15). As cadeias de hidrocarbonetos são encontradas em 3000 cm^{-1} , atribuídas ao modo de estiramento C-H. Em 1739 cm^{-1} há uma banda de absorção correspondente a um

modo de estiramento de carbonila e o ombro em 1711 cm^{-1} é atribuído à presença de um segundo estiramento de carbonila; associados à presença de triglicerídeos e/ou fosfolipídios e ácidos graxos, respectivamente. Além disso, bandas associadas às proteínas (amida secundária) também são observadas em 1645 , 1536 e 1229 cm^{-1} [149] [150].

Tabela 14. Principais bandas vibracionais obtidas de uma partícula no depósito de impressão digital [21], [150], [151].

| cm^{-1} | Atribuição vibracional |
|------------------|--|
| 2915 | CH_3 estiramento simétrico (cadeias longas de C alifático) |
| 2847 | CH_2 estiramento simétrico (cadeias longas de C alifático) |
| 1739 | C=O estiramento (ésteres saturados) |
| 1711 | C=O estiramento (ácidos graxos) |
| 1645 | C=O estiramento (amida secundária) |
| 1536 | N-H deformação angular no plano e C-N estiramento (amida secundária) |
| 1451 | CH_3 deformação angular assimétrica e CH_2 simétrica (cadeia de C alifático) |
| 1375 | CH_3 deformação angular simétrica (cadeia de C alifático) |
| 1229 | C-N estiramento (amida secundária) |
| 1152 | C-C-O estiramento (éster saturado) |
| 1108 | O-C-C estiramento (éster saturado) |

Os espectros médios indicam a presença de pequenas características espectrais de FTIR específicas para a classificação do sexo, que são observadas, principalmente, nos números de onda em 1739 cm^{-1} e 1711 cm^{-1} . As diferenças de intensidades relativas observadas para essas bandas podem resultar de processos químicos, biológicos ou físicos que ocorrem ao longo do tempo na composição inicial das impressões digitais envolvendo um grande número de fenômenos como degradação, secagem, oxidação ou polimerização. Alguns estudos apresentaram diferenças na composição química das impressões digitais masculinas e femininas, especialmente em ácidos graxos [34] [152].

Em alguns casos criminais, a IDL não é coletada no mesmo dia em que ocorre o crime e, por esse motivo, as amostras utilizadas para construir os modelos foram coletadas de 42 doadores e os espectros foram obtidos no mesmo dia, sete e trinta dias depois. A região entre 1150 e 1790 cm^{-1} foi selecionada devido à grande variação nas características espectrais do FTIR. Após a avaliação do pré-processamento utilizando a ferramenta de otimização de modelos, os métodos de pré-processamento selecionados para o

desenvolvimento do modelo foram *Baseline (Automatic Weighted Least Squares, order=5)*, *Normalize (1-Norm, Area = 1)* e *Mean Center*.

Um modelo foi calculado para o conjunto de treinamento e os escores VIP foram usados para seleção das regiões (Figura 61). Os escores VIP mostram que as regiões de 3000 a 2800 cm^{-1} e 1790 a 1150 cm^{-1} podem ser as mais adequadas para a estimativa do sexo. Modelos independentes foram avaliados, onde a região de 1790 a 1150 cm^{-1} , destacada na Figura 60, apresentou os melhores resultados.

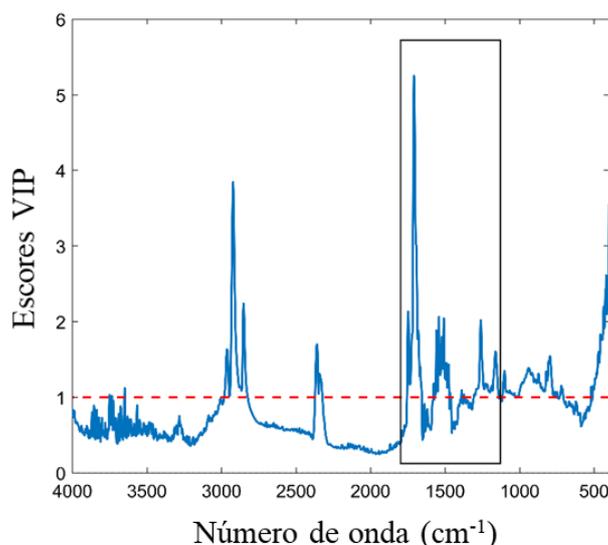


Figura 60. Escores de projeção de importância vetorial (VIP) para o modelo PLS-DA desenvolvido com 14 variáveis latentes e os espectros FTIR completos. A área delimitada corresponde à região do espectro utilizada para o modelo PLS-DA.

Os resultados do conjunto de treinamento e teste para a discriminação da classe para o modelo PLS-DA com 14 variáveis latentes, são mostrados na Figura 62. Alguns espectros ainda apresentam valores dos resíduos *Hotelling T²* e *Q* maiores do que seus limites de confiança de 99% (Figura 61(a)). No entanto, como apenas uma etapa de exclusão foi realizada durante o desenvolvimento e validação do modelo, essas amostras não foram removidas dos conjuntos de dados. A decisão de apenas uma etapa de exclusão de *outliers* foi tomada devido ao número restrito de amostras disponíveis para este estudo. Acredita-se que as amostras discrepantes presentes na Figura 61(b) podem ser um reflexo do pequeno número de amostras usadas para modelar as diferenças entre a exposição à luz e a aquisição em dias diferentes.

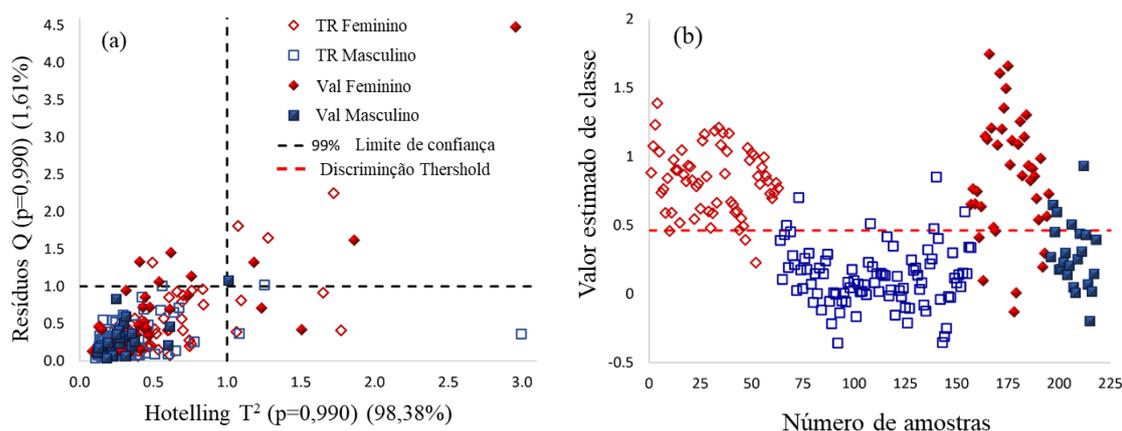


Figura 61. FTIR *Hotelling* $T^2 \times$ Resíduos Q (a); valores de classe para conjunto de treinamento D0 e todos os conjuntos de teste com o modelo PLS-DA desenvolvido com a região de 1494-1768 cm^{-1} . (---) 99% de limite de confiança, (\diamond) grupo de treinamento feminino (TR feminino), (\square) grupo de treinamento masculino (TR masculino), (\blacklozenge) grupo de teste feminino (VAL feminino), (\blacksquare) grupo de teste masculino (VAL masculino) (b).

A distribuição dos valores de classe obtidos com o modelo PLS-DA é apresentada na Figura 61(b). A dispersão desses valores foi considerável, mostrando que a determinação do sexo é um problema difícil. No entanto, o desempenho do modelo foi melhor avaliado por suas figuras de mérito apresentadas na Tabela 16.

Tabela 15. Figuras de mérito para o modelo FTIR PLS-DA.

| PLS-DA | FTIR (5) | |
|----------|----------|------|
| | TR | VAL |
| FN | 3 | 7 |
| FP | 3 | 4 |
| TP | 60 | 32 |
| TN | 91 | 19 |
| SEN/TPR | 95.2 | 82.1 |
| SPEC/TNR | 96.8 | 82.6 |
| FNR | 4.8 | 17.9 |
| FPR | 3.2 | 17.4 |
| EFR | 96.0 | 82.3 |

Abreviaturas: FN – Falso Negativo; FP-Falso Positivo; TP-verdadeiro Positivo; I-Indefinido; SEN/TPR-Sensibilidade/Taxa Verdadeira Positiva; ESPECIFICAÇÃO/ESPECIFICAÇÃO SPEC/TNR/Taxa Negativa Verdadeira; FNR-Falsa Taxa Negativa; FPR- Falsa taxa positiva; Taxa de Eficiência EFR. O número de variáveis latentes em cada modelo PLS-DA é indicado entre parênteses.

Os valores de sensibilidade (SEN) e especificidade (SPEC) mostraram que o modelo apresentou aproximadamente a mesma taxa de discriminação para amostras femininas e masculinas, em que aproximadamente 95% e 82% foram obtidos para os conjuntos de treinamento e teste, respectivamente.

Apesar da significativa dispersão dos valores estimados das classes, foram obtidos bons índices de EFR que, no conjunto de teste, foi de 82,3%. Os dados não permitem uma explicação conclusiva para a maior variação na estimativa dos valores de classe para as amostras femininas, mas possíveis fatores que podem influenciar os resultados femininos podem incluir a variação hormonal mensal e o uso regular de cosméticos .

É importante destacar que este estudo teve como um dos seus objetivos avaliar o uso de IDLs para determinação do sexo do doador, uma vez que se trata de uma informação de importância forense, que pode ser utilizada como uma ferramenta para reduzir o universo de busca por suspeitos.

8. Conclusões

Primeiramente, é importante destacar que com a pandemia de COVID-19, não foi possível seguir o planejamento original do trabalho, uma vez que o acesso aos laboratórios foi restrito em por um período significativo da realização desse trabalho.

As impressões digitais são vestígios de grande importância para a ciência forense, por contribuem para identificação da autoria de um crime. No entanto, as condições técnicas nem sempre são boas o suficiente para permitir a comparação com padrões de impressões digitais em um banco de dados sujeito a pesquisa no Sistema Automatizado de Identificação Biométrica (ABIS). Nessas situações, muitas vezes essas evidências são descartadas ou então analisadas por outros métodos como o DNA. Foi demonstrado nesta Tese, que a espectroscopia vibracional pode ser uma ferramenta poderosa para se extrair outras informações forenses valiosas desse vestígio.

Este trabalho buscou uma abordagem forense ao aplicar diversos substratos SERS ativos de nanomateriais de ouro para determinação de cocaína em impressões digitais. Os dados experimentais foram ajustados às isotermas de Langmuir, Frumkin e Freundlich, sendo a de Langmuir a que melhor se ajustou aos dados experimentais para COC e, de acordo com seu ΔG_{ads} de $-84,12$ kJ/mol, pôde-se constatar que a adsorção física e espontânea. Os resultados demonstraram ser possível detectar traços de COC, a partir de uma solução de concentração de 6×10^{-4} mol/L, o que corresponde a 273 ng dispersa na área da impressão digital medida.

Embora existam apenas diferenças muito sutis entre as impressões digitais masculinas e femininas, o uso de espectroscopia Raman combinada com métodos de análise supervisionados (PLS-DA ou SVM-DA) podem ser ferramentas valiosas para estimar o sexo do indivíduo humano. A degradação da impressão digital em função do tempo e da fotossensibilidade revelaram-se fatores importantes para a determinação do sexo. No entanto, considerando um período de até sete dias a partir da coleta da impressão digital, foram obtidos índices de discriminação de acertos variando de aproximadamente 80 a 93%, mostrando que os métodos propostos podem estimar a identificação do sexo com alta probabilidade de acerto. Os modelos SVM-DA apresentaram os maiores EFRs para espectroscopia Raman, o que sugere a presença de não linearidades no sistema.

Embora o número de amostras utilizadas no conjunto de treinamento possa ser considerado relativamente pequeno, o método proposto demonstrou a possibilidade de determinação do sexo utilizando as informações químicas fornecidas pelos espectros Raman obtidos em impressões digitais.

Foi demonstrado ainda neste trabalho que o uso da espectroscopia FTIR combinado com o PLS-DA pode também ser utilizada para classificar o sexo de um indivíduo. Considerando um período de até 30 dias, a partir da coleta da impressão digital, foram obtidos índices de discriminação superiores a 80%, mostrando que o método proposto pode fornecer identificação do sexo com alta probabilidade de acerto.

Além disso, é possível pensar em outros desafios relacionados à discriminação de classes com base na análise de impressões digitais latentes, como etnia e faixas etárias, que ainda podem ser explorados com estas técnicas, resultando em novas metodologias para aplicações forenses.

9. Referências Bibliográficas

- [1] UNODC, *World Drug Report 2016*. United Nations Publication, Vienna, 2016.
- [2] A. T. Bruni and V. e M. F. D. Oliveira, *Fundamentos de Química Forense - uma análise prática da química que soluciona crimes*. Millennium editora, 2012.
- [3] J. C. Maxwell and B. Rutkowski, “The prevalence of methamphetamine and amphetamine abuse in North America: a review of the indicators, 1992 - 2007,” *Drug Alcohol Rev.*, vol. 27, no. 3, pp. 229–235, May 2008, doi: 10.1080/09595230801919460.
- [4] A. A. Chasin and M. C. Salvadori, “Estimulantes do Sistema Nervoso Central,” in *Atheneu*, 3rd ed., S. Oga, M. M. A. Camargo, and O. Batistuzzo, J. A, Eds. São Paulo, 1996, pp. 353–374.
- [5] M. Passagli, *Toxicologia Forense: Teoria e Prática*. Campinas: Millennium Editora, 2011.
- [6] “GDS 2018 - Key Findings Report.” .
- [7] F. Martinhago and ... M. F., “O uso de drogas e a prática de delitos: Um estudo com os detentos do Presídio Regional de Blumenau [Drugs use and petty crimes: A study with prisoners of,” *Saúde Transform. Soc.*, vol. 2, pp. 38–44, 2011, Accessed: Jul. 24, 2019. [Online]. Available: <http://stat.cbsm.incubadora.ufsc.br/index.php/saudeettransformacao/article/view/1072>.
- [8] N. Takayama, R. Iio, S. Tanaka, S. Chinaka, and K. Hayakawa, “Analysis of methamphetamine and its metabolites in hair,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 17, no. 2–3, pp. 74–82, Mar. 2003, doi: 10.1002/bmc.225.
- [9] “LEI N° 13.546,” 2017. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2015-2018/2017/Lei/L13546.htm.
- [10] R. Kanyama, “TJ-PF - ACR: 2850471 PR Apelação Crime - 0285047-1,” 2005.
- [11] “LEI No 11.343,” 2006. .
- [12] M. Burns and R. C. Baselt, “Monitoring drug use with a sweat patch: An experiment with cocaine,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 19, no. 1, pp. 41–48, 1995, doi: 10.1093/jat/19.1.41.
- [13] H. H. Jr., L. O. Robinson, and J. Slowikowski, *The fingerprint sourcebook*. US Department of Justice Office of Justice Programs, 2012.
- [14] M. R. Hawthorne, *Fingerprints Analysis and Understanding*. Boca Raton, FL, 2009.

- [15] P. Hazarika and D. A. Russell, "Advances in fingerprint analysis," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 51, no. 15, pp. 3524–3531, 2012, doi: 10.1002/anie.201104313.
- [16] A. Girod, R. Ramotowski, and C. Weyermann, "Composition of fingermark residue: A qualitative and quantitative review," *Forensic Science International*, vol. 223, no. 1–3, pp. 10–24, Nov. 30, 2012, doi: 10.1016/j.forsciint.2012.05.018.
- [17] M. Choi, A. McDonagh, P. Maynard, and C. Roux, "Metal-containing nanoparticles and nano-structured particles in fingermark detection," *Forensic Sci. Int.*, vol. 179, pp. 87–97, 2008, Accessed: Jul. 24, 2019. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037907380800203X>.
- [18] R. Leggett, E. E. Lee-Smith, S. M. Jickells, and D. A. Russell, "'Intelligent' Fingerprinting: Simultaneous Identification of Drug Metabolites and Individuals by Using Antibody-Functionalized Nanoparticles," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 46, no. 22, pp. 4100–4103, May 2007, doi: 10.1002/anie.200700217.
- [19] T. Zhang, X. Chen, R. Yang, and Y. Xu, "Detection of methamphetamine and its main metabolite in fingermarks by liquid chromatography–mass spectrometry," *Forensic Sci. Int.*, vol. 248, pp. 10–14, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.forsciint.2014.12.013.
- [20] A. Bécue, H. Eldridge, and C. Champod, "Interpol review of fingermarks and other body impressions 2016–2019," *Forensic Sci. Int. Synerg.*, no. xxxx, 2020, doi: 10.1016/j.fsisyn.2020.01.013.
- [21] D. K. Williams, R. L. Schwartz, and E. G. Bartick, "Analysis of Latent Fingerprint Deposits by Infrared Microspectroscopy," *Appl. Spectrosc.*, vol. 58, no. 3, pp. 313–316, 2004, doi: 10.1366/000370204322886663.
- [22] D. K. Williams, C. J. Brown, and J. Bruker, "Characterization of children's latent fingerprint residues by infrared microspectroscopy: Forensic implications," *Forensic Sci. Int.*, vol. 206, no. 1–3, pp. 161–165, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.forsciint.2010.07.033.
- [23] T. Chen, Z. D. Schultz, and I. W. Levin, "Infrared spectroscopic imaging of latent fingerprints and associated forensic evidence," *Analyst*, vol. 134, no. 9, p. 1902, 2009, doi: 10.1039/b908228j.
- [24] B. Figueroa, Y. Chen, K. Berry, A. Francis, and D. Fu, "Label-Free Chemical Imaging of Latent Fingerprints with Stimulated Raman Scattering Microscopy," *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 8, pp. 4468–4473, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b04213.

- [25] P. H. R. Ng, S. Walker, M. Tahtouh, and B. Reedy, "Detection of illicit substances in fingerprints by infrared spectral imaging," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 394, no. 8, pp. 2039–2048, Aug. 2009, doi: 10.1007/s00216-009-2806-9.
- [26] C. Muehlethaler, M. Leona, and J. R. Lombardi, "Review of Surface Enhanced Raman Scattering Applications in Forensic Science," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 1, pp. 152–169, Jan. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b04131.
- [27] J. Day, H. Edwards, and ... S. D., "The detection of drugs of abuse in fingerprints using Raman spectroscopy I: latent fingerprints," *Spectrochim. Acta Part A Molecular Biomol. Spectrosc.*, vol. 60, pp. 563–568, 2004, Accessed: Jul. 24, 2019. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386142503002634>.
- [28] M. J. West and M. J. Went, "The spectroscopic detection of drugs of abuse in fingerprints after development with powders and recovery with adhesive lifters," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 71, no. 5, pp. 1984–1988, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.saa.2008.07.024.
- [29] D. L. de Faria, M. L. Temperini, and O. Sala, "Twenty years of SERS," *Quim. Nova*, vol. 22, pp. 541–552, 1999.
- [30] T. Yang, X. Guo, H. Wang, S. Fu, and H. Yang, "Magnetically optimized SERS assay for rapid detection of trace drug-related biomarkers in saliva and fingerprints," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 68, pp. 350–357, 2015, Accessed: Jul. 24, 2019. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566315000226>.
- [31] Z. Gong, H. Du, F. Cheng, C. Wang, C. Wang, and M. Fan, "Fabrication of SERS swab for direct detection of trace explosives in fingerprints," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 24, pp. 21931–21937, 2014, doi: 10.1021/am507424v.
- [32] J. Leonard *et al.*, "SERS, Raman, and DFT analyses of fentanyl and carfentanyl: Toward detection of trace samples," no. June, pp. 1–7, 2017, doi: 10.1002/jrs.5220.
- [33] M. Souza, K. de Oliveira, F. Oliveira, and ... L. S., "The adsorption of methamphetamine on Ag nanoparticles dispersed in agarose gel—Detection of methamphetamine in fingerprints by SERS," *Vib. Spectrosc.*, vol. 98, pp. 152–157, 2018, Accessed: Jul. 24, 2019. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924203118301103>.
- [34] C. Huynh, E. Brunelle, L. Halámková, J. Agudelo, and J. Halánek, "Forensic Identification of Gender from Fingerprints," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 22, pp.

- 11531–11536, 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b03323.
- [35] E. Brunelle, C. Huynh, A. M. Le, L. Halámková, J. Agudelo, and J. Halámek, “New Horizons for Ninhydrin: Colorimetric Determination of Gender from Fingerprints,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 4, pp. 2413–2420, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b04473.
- [36] D. da S. Carvalho *et al.*, *Determinação do sexo a partir da densidade de linhas distal e proximal das impressões digitais de brasileiros*, vol. 11, no. 5. 2022.
- [37] E. Widjaja, G. H. Lim, and A. An, “A novel method for human gender classification using Raman spectroscopy of fingernail clippings,” *Analyst*, vol. 133, no. 4, pp. 493–498, 2008, doi: 10.1039/b712389b.
- [38] C. K. Muro, L. De Souza Fernandes, and I. K. Lednev, “Sex determination based on Raman spectroscopy of saliva traces for forensic purposes,” *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 24, pp. 12489–12493, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b03988.
- [39] A. Sikirzhyskaya, V. Sikirzhyski, and I. K. Lednev, “Determining Gender by Raman Spectroscopy of a Bloodstain,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 3, pp. 1486–1492, 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b02986.
- [40] A. Sharma, R. Verma, R. Kumar, R. Chauhan, and V. Sharma, “Chemometric analysis of ATR-FTIR spectra of fingernail clippings for classification and prediction of sex in forensic context,” *Microchem. J.*, vol. 159, no. September, p. 105504, 2020, doi: 10.1016/j.microc.2020.105504.
- [41] L. V. Bel’skaya, E. A. Sarf, and D. V. Solomatin, “Age and Gender Characteristics of the Infrared Spectra of Normal Human Saliva,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 74, no. 5, pp. 536–543, 2020, doi: 10.1177/0003702819885958.
- [42] “UNODC,” 2020. <https://www.unodc.org/lpo-brazil/pt/drogas/marco-legal.html>.
- [43] BRASIL, “Lei nº 11.343.” [Online]. Available: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/111343.htm.
- [44] N. I. of Justice, “NIJ Standard-0604.01.” .
- [45] United Nations Office on Drugs and Crime, “World Drug Report 2015 (United Nations publication, Sales No. E. 15. XI. 6),” 2015. Accessed: Jul. 24, 2019. [Online]. Available: https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=UNODC%2C+“World+Drug+Report+2016%2C”+United+Nations+publication%2C+Vienna%2C+2016.&btnG=.
- [46] SWGDRUG, “Scientific Working Group for the Analysis of Seized Drugs.” .
- [47] E. L. Izake, “Forensic and homeland security applications of modern portable

- Raman spectroscopy,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 202, no. 1–3, pp. 1–8, 2010, doi: 10.1016/j.forsciint.2010.03.020.
- [48] J. M. Chalmers, H. G. M. Edwards, and M. D. Hargreaves, *Infrared and Raman Spectroscopy in Forensic Science*. A John Wiley & Sons, Ltd, Publication, 2012.
- [49] M. D. Hargreaves, K. Page, T. Munshi, R. Tomsett, G. Lynch, and H. G. M. Edwards, “Analysis of seized drugs using portable Raman spectroscopy in an airport environment - a proof of principle study,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 39, no. 7, pp. 873–880, 2008, doi: 10.1002/jrs.1926.
- [50] B. A. Eckenrode, E. G. Bartick, S. D. Harvey, M. E. Vucilick, B. W. Wright, and R. A. Huff, “Portable Raman Spectroscopy Systems for Field Analysis,” 2001.
- [51] US Department of Justice, “Forensic Sciences : Review of Status ISSUES AND,” 1999.
- [52] “MEC e Ministério da Justiça e Segurança Pública estimulam pesquisas científicas para enfrentamento de crimes,” 2020. http://portal.mec.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=84161:mec-e-ministerio-da-justica-e-seguranca-publica-estimulam-pesquisas-cientificas-para-enfrentamento-de-crimes&catid=12.
- [53] M. Hudson *et al.*, “Drug screening using the sweat of a fingerprint: Lateral flow detection of ' ' 9 -tetrahydrocannabinol, cocaine, opiates and amphetamine,” *J. Anal. Toxicol.*, vol. 43, no. 2, pp. 88–95, 2019, doi: 10.1093/jat/bky068.
- [54] V. Cunha and Jaqueline Costa, “Detran-DF testa novo tipo de drogômetro,” 2019.
- [55] K. C. Doty, C. K. Muro, J. Bueno, L. Halámková, and I. K. Lednev, “What can Raman spectroscopy do for criminalistics?,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 47, no. 1, pp. 39–50, 2016, doi: 10.1002/jrs.4826.
- [56] N.R.C., “Commitee on Identifying the Needs of the Forensic Sciences Community,” 2009.
- [57] R. M. Connatser *et al.*, “Toward surface-enhanced raman imaging of latent fingerprints,” *J. Forensic Sci.*, vol. 55, no. 6, pp. 1462–1470, 2010, doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01484.x.
- [58] U.S. Department of Justice, *The Fingerprint - Sourcebook*. Washington, D.C.: National Institute of Justice, 2011.
- [59] D. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, and A. Timothy, *Princípios de Análise Instrumental*. São Paulo: Bookman, 2009.
- [60] R. Łobiński and Z. Marczenko, “Recent Advances in Ultraviolet-Visible

- Spectrophotometry,” *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 23, no. 1–2, pp. 55–111, 1992, doi: 10.1080/10408349208051647.
- [61] W. Callister and D. Rethwisch, *Materials Science and Engineering, an Introduction*. Utah: Jogn Wiley & Sons, Inc, 2011.
- [62] B. J. Inkson, *Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization*. Sheffield: Elsevier Ltd, 2016.
- [63] W. F. Smith and J. Hashemi, *Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais*. AMGH Editora, 2013.
- [64] B. A. Dedavid, C. I. Gomes, and G. Machado, *MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores*. 2007.
- [65] M. KNOLL, “Aufladepotential und Sekundäremission elektronenstrahlter Körper,” *Z Tech. Phys.*, vol. 16, pp. 467–475, 1935.
- [66] P. Magudapathy, P. Gangopadhyay, B. K. Panigrahi, K. G. M. Nair, and S. Dhara, “Electrical transport studies of Ag nanoclusters embedded in glass matrix,” *Phys. B Condens. Matter*, vol. 299, no. 1–2, pp. 142–146, 2001, doi: 10.1016/S0921-4526(00)00580-9.
- [67] J. Goldstein *et al.*, *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, 3rd ed. Springer International Publishing, 2003.
- [68] O. Sala, *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. São Paulo: Unesp, 1996.
- [69] C. G. Turrell, *The raman effect: Raman Microscopy. Developments and Applicatons*. Elsevier Academic Press, 1996.
- [70] R. S. Krishnan and R. K. Shankar, “Raman effect: History of the discovery,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 10, pp. 1–8, 1981.
- [71] W. A. L. de Santana and O. Freire Junior, “Contribuição do físico brasileiro Sergio Porto para as aplicações do laser e sua introdução no Brasil,” *Rev. Bras. Ensino Fis.*, vol. 32, no. 3, 2010, doi: 10.1590/s1806-11172010000300015.
- [72] R. D. O. Andrade, “O físico que olhava as luzes,” 1979.
- [73] H. Kogelnik and S. P. S. Porto, “Continuous Helium–Neon Red Laser as a Raman Source,” *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 53, no. 12, p. 1446, 1963, doi: 10.1364/josa.53.001446.
- [74] UNIPAMPA, “No Title,” 2018. <http://porteiros.s.unipampa.edu.br/espectroscopia/espectroscopia-esimulacao/>

(accessed Dec. 15, 2017).

- [75] Q. Nova, “I2 : uma molécula didática,” pp. 914–920, 2008.
- [76] L. Jensen and G. C. Schatz, “Resonance Raman Scattering of Rhodamine 6G as Calculated Using Time-Dependent Density Functional Theory,” *J. Phys. Chem. a Lett.*, vol. 110, pp. 5973–5977, 2006, doi: 10.1021/jp0610867.
- [77] O. Sala, “Uma molécula didática,” *Quim. Nova*, vol. 31, no. 4, pp. 914–920, 2008, [Online]. Available: http://static.sites.s bq.org.br/quimicanova.s bq.org.br/pdf/Vol31No4_914_32-ED07289.pdf.
- [78] R. F. Aroca, “Plasmon Enhanced Spectroscopy,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, no. 207890, pp. 14369–14636, 2010, doi: 10.1039/C3CP44103B.
- [79] R. Taylor *et al.*, “Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids,” *J. Appl. Phys.*, vol. 113, no. 1, 2013, doi: 10.1063/1.4754271.
- [80] M. Fleischmann and P. J. H. and A. J. McQuillan, “Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode,” *Top.*, vol. 26, no. 2. pp. 163–166, 1974, doi: 10.1007/bf02578984.
- [81] D. L. Jeanmaire and R. P. VAN Duyne, “Surface Raman Spectroelectrochemistry Part1. Heterocyclic,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 84, p. 1, 1977.
- [82] J. C. Rubim, “Surface-enhanced Raman scattering (SERS) on silver electrodes as a technical tool in the study of the electrochemical reduction of cyanopyridines and in quantitative analysis,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 220, no. 2, pp. 339–350, 1987, doi: 10.1016/0022-0728(87)85120-3.
- [83] D. L. A. de Faria, M. L. A. Temperini, and O. Sala, “Vinte anos de efeito SERS,” *Quim. Nova*, vol. 22, no. 4, pp. 541–552, Jul. 1999, doi: 10.1590/S0100-40421999000400013.
- [84] A. Otto, I. Mrozek, H. Grabhorn, and W. Akemann, “Surface-enhanced Raman scattering,” vol. 1143, 1992.
- [85] H. Ueba, “Surface Science 129 (1983) L267-L270 North-Holland Publishing Company,” vol. 129, pp. 0–3, 1983.
- [86] J. C. Rubim, P. Corio, M. C. C. Ribeiro, and M. Matz, “Contribution of resonance Raman scattering to the surface-enhanced Raman effect on electrode surfaces. A description using the time dependent formalism,” *J. Phys. Chem.*, vol. 99, no. 43, pp. 15765–15774, 1995, doi: 10.1021/j100043a013.
- [87] J. Olson, S. Dominguez-Medina, A. Hoggard, L.-Y. Wang, W.-S. Chang, and S.

- Link, "Optical characterization of single plasmonic nanoparticles," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 1, pp. 40–57, 2015, doi: 10.1039/C4CS00131A.
- [88] K. Kneipp *et al.*, "Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 78, no. 9, pp. 1667–1670, Mar. 1997, doi: 10.1103/PhysRevLett.78.1667.
- [89] S. Grésillon *et al.*, "Experimental Observation of Localized Optical Excitations in Random Metal-Dielectric Films," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 82, no. 22, pp. 4520–4523, May 1999, doi: 10.1103/PhysRevLett.82.4520.
- [90] D. P. dos Santos, M. L. A. Temperini, and A. G. Brolo, "Mapping the Energy Distribution of SERRS Hot Spots from Anti-Stokes to Stokes Intensity Ratios," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 32, pp. 13492–13500, Aug. 2012, doi: 10.1021/ja305580t.
- [91] K. Wang, S. Li, M. Petersen, S. Wang, and X. Lu, "Detection and characterization of antibiotic-resistant bacteria using surface-enhanced raman spectroscopy," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 10, 2018, doi: 10.3390/nano8100762.
- [92] S. Albert, K. K. Albert, and M. Quack, *Handbook of High-resolution Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, 2011.
- [93] C. B. Vidal, A. C. D. Lima, R. F. D. Nascimento, G. S. C. Raulino, and D. D. Q. Melo, *Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais*. Fortaleza: Imprensa Universitária UFC, 2014.
- [94] T. Y. F. Vale, "Desenvolvimento de tensoativos e sistemas microemulsionados para recuperação de petróleo," Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.
- [95] B. Linhares, "Preparação de carvão ativado a partir de resíduos de erva-mate e seu uso como adsorvente na remoção de poluente orgânico em solução aquosa." Universidade Federal de Santa Maria, 2013.
- [96] C. S. Fugivara, "Cinética de adsorção do n-propanol sobre eletrodo de prata platinizada em solução de ácido sulfúrico," Universidade de São Paulo, 2009.
- [97] F. H. M. F., "Über die adsorption in lasungen," *Phys. Chem.*, vol. 57A, pp. 385–470, 1906.
- [98] M. M. C. Ferreira, *Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações*, 1st ed. Campinas, SP, 2015.
- [99] B. de B. Neto, I. S. Scarminio, and R. E. Bruns, *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 4th ed. Porto Alegre, RS: Bookman,

2010.

- [100] L. F. Soares, D. C. Da Silva, M. C. J. Bergo, V. T. R. Coradin, J. W. B. Braga, and T. C. M. Pastore, “Avaliação de espectrômetro nir portátil e pls-da para a discriminação de seis espécies similares de madeiras Amazônicas,” *Quim. Nova*, vol. 40, no. 4, pp. 418–426, 2017, doi: 10.21577/0100-4042.20170014.
- [101] A. C. Lorena and A. C. P. L. F. De Carvalho, “Uma Introdução às Support Vector Machines,” *Rev. Informática Teórica e Apl.*, vol. 14, no. 2, pp. 43–67, 2007.
- [102] S. Amarappa and S. V Sathyanarayana, “Data classification using Support vector Machine (SVM), a simplified approach,” *Int. J. Electron. Comput. Sci. Eng.*, vol. 3, pp. 435–445, 2011, [Online]. Available: www.ijecse.org.
- [103] M. A. Hearst, “Support vector machines,” *IEEE Intell. Syst. their Appl.*, vol. 13, no. 4, pp. 18–28, 1998.
- [104] M. Awad and R. Khanna, *Efficient Learning Machines: theories, concepts, and applications for engineers and system designers*. Springer nature, 2015.
- [105] J. Mercer, P. Trans, and R. S. Lond, “XVI. Functions of positive and negative type, and their connection the theory of integral equations,” *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A, Contain. Pap. a Math. or Phys. Character*, vol. 209, no. 441–458, pp. 415–446, 1909, doi: 10.1098/rsta.1909.0016.
- [106] R. G. Brereton and G. R. Lloyd, “Partial least squares discriminant analysis: Taking the magic away,” *J. Chemom.*, vol. 28, no. 4, pp. 213–225, 2014, doi: 10.1002/cem.2609.
- [107] A. Borin, M. F. Ferrão, C. Mello, D. A. Maretto, and R. J. Poppi, “Least-squares support vector machines and near infrared spectroscopy for quantification of common adulterants in powdered milk,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 579, no. 1, pp. 25–32, 2006, doi: 10.1016/j.aca.2006.07.008.
- [108] V. Vapnik, *Nonlinear Modeling*. Boston: Springer, 1998.
- [109] S. Zomer, R. G. Brereton, J. F. Carter, and C. Eckers, “Support vector machines for the discrimination of analytical chemical data: Application to the determination of tablet production by pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry,” *Analyst*, vol. 129, no. 2, pp. 175–181, 2004, doi: 10.1039/b312982a.
- [110] B. G. Botelho, N. Reis, L. S. Oliveira, and M. M. Sena, “Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA,” *Food Chem.*, vol. 181, pp. 31–37, Aug. 2015, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.077.

- [111] L. de O. Magalhães, L. C. Arantes, and J. W. B. Braga, “Identification of NBOMe and NBOH in blotter papers using a handheld NIR spectrometer and chemometric methods,” *Microchem. J.*, vol. 144, pp. 151–158, 2019, doi: 10.1016/j.microc.2018.08.051.
- [112] A. R. Martins, M. Talhavini, M. L. Vieira, J. J. Zacca, and J. W. B. Braga, “Discrimination of whisky brands and counterfeit identification by UV–Vis spectroscopy and multivariate data analysis,” *Food Chem.*, vol. 229, pp. 142–151, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.024.
- [113] M. Custódio, L. Magalhães, L. Arantes, and J. Braga, “Identification of Synthetic Drugs on Seized Blotter Papers Using ATR-FTIR and PLS-DA: Routine Application in a Forensic Laboratory,” *J. Braz. Chem. Soc.*, 2021, doi: 10.21577/0103-5053.20200205.
- [114] M. Grzelczak and L. M. Liz-Marzán, “The relevance of light in the formation of colloidal metal nanoparticles,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 43, no. 7, pp. 2089–2097, 2014, doi: 10.1039/c3cs60256g.
- [115] K. D. Demadis, M. Paspalaki, and J. Theodorou, “Controlled Release of Bis (phosphonate) Pharmaceuticals from,” pp. 5873–5876, 2011.
- [116] S. J. E. D. Vieira and V. E. O., “Grafeno: Uma Revisão Sobre Propriedades, Mecanismos de Produção e Potenciais Aplicações em Sistemas Energéticos,” *Rev. Eletrônica Mater. e Process.*, vol. 11, no. 2, pp. 54–57, 2016.
- [117] G. L. Cordeiro, “Síntese e processamento de óxido de grafeno reduzido: abordagens no desenvolvimento de eletrocatalisadores suportados para oxidação de etanol,” Universidade de São Paulo, 2018.
- [118] D. R. Dreyer, S. Park, C. W. Bielawski, and R. S. Ruoff, “The chemistry of graphene oxide,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 1, pp. 228–240, 2010, doi: 10.1039/b917103g.
- [119] A. J. Caires, R. P. Vaz, C. Fantini, and L. O. Ladeira, “Highly sensitive and simple SERS substrate based on photochemically generated carbon nanotubes-gold nanorods hybrids,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 455, pp. 78–82, 2015, doi: 10.1016/j.jcis.2015.04.071.
- [120] M. Ahmed and R. Narain, “Rapid synthesis of gold nanorods using a one-step photochemical strategy,” *Langmuir*, vol. 26, no. 23, pp. 18392–18399, 2010, doi: 10.1021/la103339g.
- [121] A. J. Caires, D. C. B. Alves, C. Fantini, A. S. Ferlauto, and L. O. Ladeira, “One-

- pot in situ photochemical synthesis of graphene oxide/gold nanorod nanocomposites for surface-enhanced Raman spectroscopy,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 58, pp. 46552–46557, 2015, doi: 10.1039/c4ra17207h.
- [122] J. Zuloaga, E. Prodan, and P. Nordlander, “Quantum plasmonics: Optical properties and tunability of metallic nanorods,” *ACS Nano*, vol. 4, no. 9, pp. 5269–5276, 2010, doi: 10.1021/nn101589n.
- [123] B. Nikoobakht and M. A. El-Sayed, “Surface-enhanced Raman scattering studies on aggregated gold nanorods,” *J. Phys. Chem. A*, vol. 107, no. 18, pp. 3372–3378, 2003, doi: 10.1021/jp026770+.
- [124] R. Parveen, “Síntese de nanopartículas de ouro com forma e tamanho controlados utilizando glicerol como agente de redução e estabilização ecológico de baixo custo,” 2017.
- [125] S. Link and M. A. El-Sayed, “Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant (Journal of Physical Chemistry B (1999) 103B),” *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 20, pp. 10531–10532, 2005, doi: 10.1021/jp058091f.
- [126] X. Huang and M. A. El-Sayed, “Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy,” *J. Adv. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 13–28, 2010, doi: 10.1016/j.jare.2010.02.002.
- [127] Z. L. Wang, M. B. Mohamed, S. Link, and M. A. El-Sayed, “Crystallographic facets and shapes of gold nanorods of different aspect ratios,” *Surf. Sci.*, vol. 440, no. 1–2, 1999, doi: 10.1016/S0039-6028(99)00865-1.
- [128] G. N. Abdelrasoul, R. Cingolani, A. Diaspro, A. Athanassiou, and F. Pignatelli, “Photochemical synthesis: Effect of UV irradiation on gold nanorods morphology,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 275, pp. 7–11, 2014, doi: 10.1016/j.jphotochem.2013.10.008.
- [129] P. R. Teixeira *et al.*, “Photochemically-assisted synthesis of non-toxic and biocompatible gold nanoparticles,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 148, pp. 317–323, 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.09.002.
- [130] R. C. Maher *et al.*, “Physics of single molecule fluctuations in surface enhanced Raman spectroscopy active liquids,” *J. Chem. Phys.*, vol. 121, no. 18, pp. 8901–8910, 2004, doi: 10.1063/1.1804178.
- [131] A. Martyna *et al.*, “Improving discrimination of Raman spectra by optimising preprocessing strategies on the basis of the ability to refine the relationship

- between variance components,” *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 202, no. April, 2020, doi: 10.1016/j.chemolab.2020.104029.
- [132] P. Oliveri and G. Downey, “Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 35, pp. 74–86, May 2012, doi: 10.1016/j.trac.2012.02.005.
- [133] M. A. Souza, A. S. Santos, S. W. da Silva, J. W. B. Braga, and M. H. Sousa, “Raman spectroscopy of fingerprints and chemometric analysis for forensic sex determination in humans,” *Forensic Chemistry*, vol. 27, 2022, doi: 10.1016/j.forc.2021.100395.
- [134] C. A. F. De Oliveira Penido, M. T. T. Pacheco, I. K. Lednev, and L. Silveira, “Raman spectroscopy in forensic analysis: Identification of cocaine and other illegal drugs of abuse,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 47, no. 1, pp. 28–38, 2016, doi: 10.1002/jrs.4864.
- [135] F. J. Muhtadi and A. Al-Badr, “Cocaine Hydrochloride,” *Anal. Profiles Drug Subst.*, vol. 15, pp. 151–231, 1986.
- [136] K. V. de Oliveira and J. C. Rubim, “Surface-enhanced Raman spectroscopy of molecules adsorbed on silver nanoparticles dispersed in agarose gel and their adsorption isotherms,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 86, pp. 290–301, 2016, doi: 10.1016/j.vibspec.2016.08.006.
- [137] S. Link and M. A. El-Sayed, “Size and temperature dependence of the plasmon absorption of colloidal gold nanoparticles,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 103, no. 21, pp. 4212–4217, 1999, doi: 10.1021/jp984796o.
- [138] Í. A. Costa, A. P. Maciel, M. J. A. Sales, S. G. C. Moreira, and L. G. Paterno, “The Role Played by Graphene Oxide in the Photodeposition and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Plasmonic Ag Nanoparticle Substrates,” *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.*, vol. 217, no. 5, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1002/pssa.201900965.
- [139] R. Xing, Y. Li, and H. Yu, “Preparation of fluoro-functionalized graphene oxide via the Hunsdiecker reaction,” *Chem. Commun.*, vol. 52, no. 2, pp. 390–393, 2016, doi: 10.1039/c5cc08252h.
- [140] D. L. A. de Faria, M. L. A. Temperini, and O. Sala, “Vinte anos de efeito SERS,” *Quim. Nova*, vol. 22, no. 4, pp. 541–552, Jul. 1999, doi: 10.1590/S0100-40421999000400013.
- [141] Y. Liu, “Is the free energy change of adsorption correctly calculated?,” *J. Chem.*

- Eng. Data*, vol. 54, no. 7, pp. 1981–1985, 2009, doi: 10.1021/je800661q.
- [142] K. V. de Oliveira and J. C. Rubim, “Surface-enhanced Raman spectroscopy of molecules adsorbed on silver nanoparticles dispersed in agarose gel and their adsorption isotherms,” *Vib. Spectrosc.*, vol. 86, pp. 290–301, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.vibspec.2016.08.006.
- [143] P. O. Andersson, C. Lejon, T. Mikaelsson, and L. Landström, “Towards Fingermark Dating: A Raman Spectroscopy Proof-of-Concept Study,” *ChemistryOpen*, vol. 6, no. 6, pp. 706–709, 2017, doi: 10.1002/open.201700129.
- [144] T. R. Hata *et al.*, “Non-invasive Raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin,” *J. Invest. Dermatol.*, vol. 115, no. 3, pp. 441–448, 2000, doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00060.x.
- [145] L. Lu, L. Shi, J. Secor, and R. Alfano, “Resonance Raman scattering of β -carotene solution excited by visible laser beams into second singlet state,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 179, no. December 2017, pp. 18–22, 2018, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.12.022.
- [146] N. E. Archer, Y. Charles, J. A. Elliott, and S. Jickells, “Changes in the lipid composition of latent fingerprint residue with time after deposition on a surface,” *Forensic Sci. Int.*, vol. 154, no. 2–3, pp. 224–239, 2005, doi: 10.1016/j.forsciint.2004.09.120.
- [147] J. L. Lippert and W. L. Peticolas, “Raman active vibrations in long-chain fatty acids and phospholipid sonicates,” vol. 282, pp. 8–17, 1972.
- [148] K. Czamara, K. Majzner, M. Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor, and M. Baranska, “Raman spectroscopy of lipids: A review,” *J. Raman Spectrosc.*, vol. 46, no. 1, pp. 4–20, 2015, doi: 10.1002/jrs.4607.
- [149] D. K. Williams, R. L. Schwartz, and E. G. Bartick, “Analysis of Latent Fingerprint Deposits by Infrared Microspectroscopy,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 58, no. 3, pp. 313–316, 2004, doi: 10.1366/000370204322886663.
- [150] C. Ricci, P. Phiriyavityopas, N. Curum, K. L. A. Chan, S. Jickells, and S. G. Kazarian, “Chemical imaging of latent fingerprint residues,” *Appl. Spectrosc.*, vol. 61, no. 5, pp. 514–522, 2007, doi: 10.1366/000370207780807849.
- [151] B. N. Dorakumbura *et al.*, “Revealing the spatial distribution of chemical species within latent fingermarks using vibrational spectroscopy,” *Analyst*, vol. 143, no. 17, pp. 4027–4039, 2018, doi: 10.1039/c7an01615h.
- [152] A. van Dam, F. T. van Beek, M. C. G. Aalders, T. G. van Leeuwen, and S. A. G.

Lambrechts, “Techniques that acquire donor profiling information from fingerprints - A review,” *Sci. Justice*, vol. 56, no. 2, pp. 143–154, 2016, doi: 10.1016/j.scijus.2015.12.002.