

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E
INFORMÁTICA INDUSTRIAL

FELIPE HORNUNG

**METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANALITOS EM ÁGUA COM
TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ÓTICA EM SUBSTRATO SÓLIDO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA

2019

FELIPE HORNING

**METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANALITOS EM ÁGUA COM
TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ÓTICA EM SUBSTRATO SÓLIDO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências” – Área de Concentração: Fotônica em Engenharia.

Orientador: Prof. Dr. José Luís Fabris

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Muller

CURITIBA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Hornung, Felipe

Metodologia para detecção de analitos em água com técnicas de espectroscopia ótica em substrato sólido [recurso eletrônico] / Felipe Hornung. -- 2019.

1 arquivo eletrônico (68 f.) : PDF ; 2,20 MB.

Modo de acesso: World Wide Web.

Texto em português com resumo em inglês.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. Área de Concentração: Fotônica em Engenharia. Linha de Pesquisa: Estruturas e Dispositivos Fotônicos, Curitiba, 2019.

Bibliografia: f. 62-67.

1. Engenharia elétrica - Dissertações. 2. Água potável - Contaminação - Testes. 3. Espectroscopia ótica. 4. Raman, Espectroscopia de. 5. Efeito Raman, Superfície aprimorada. 6. Corantes fluorescentes. 7. Glifosato. 8. Nanopartículas. 9. Detectores. 10. Análise espectral. 11. Nanotecnologia. 12. Controle de qualidade da água. 13. Fotônica. I. Fabris, José Luís, orient. II. Muller, Márcia, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial. IV. Título.

CDD: Ed. 23 -- 621.3

Biblioteca Central do Câmpus Curitiba - UTFPR
Bibliotecária: Luiza Aquemi Matsumoto CRB-9/794

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO

A Dissertação de Mestrado intitulada “**Metodologia para detecção de analitos em água com técnicas de espectroscopia ótica em substrato sólido**” defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Felipe Hornung**, no dia **13 de fevereiro de 2020**, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração **FOTÔNICA EM ENGENHARIA**, Linha de Pesquisa **ESTRUTURAS E DISPOSITIVOS FOTÔNICOS**, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Luis Fabris - Presidente – UTFPR

Prof. Dr. Carlos Itsuo Yamamoto – UFPR

Profa. Dra. Renata Danielle Adati - UTFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 13 de Fevereiro de 2020.

Carimbo e Assinatura do(a) Coordenador(a) do Programa

RESUMO

HORNUNG, Felipe. METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE ANALITOS EM ÁGUA COM TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ÓTICA EM SUBSTRATO SÓLIDO. 67p. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Este trabalho apresenta uma técnica para o desenvolvimento de um substrato sólido para a realização de espectroscopia Raman, aliada ao efeito SERS (Espalhamento Raman Intensificado pela Superfície), utilizando como analito o corante rodamina 6G. Ao longo do trabalho foi apresentada uma metodologia de síntese de nanopartículas de prata, estas utilizadas com o objetivo de amplificar o sinal do espalhamento Raman através do fenômeno conhecido como SERS, no qual nanopartículas metálicas em contato com o analito de prova causam uma intensificação do campo eletromagnético. Além disso foram estudados diversos parâmetros envolvidos no processo de análise em substrato sólido, como a membrana filtrante, as objetivas do microscópio, o processo de secagem, o tempo de integração, o pH da solução coloidal e a concentração de analito, a fim de se desenvolver uma metodologia eficiente. Para essas análises, além da espectroscopia SERS em substrato sólido, foram utilizadas técnicas de espectroscopia ultravioleta-visível e SERS em substrato líquido. Os resultados mostram que os espectros SERS obtidos em substrato sólido apresentaram intensificações em torno de 15x maiores que as intensificações obtidas em substrato líquido para uma mesma amostra. Além dos testes envolvendo a rodamina 6G como analito de prova foram também realizados testes com o herbicida glifosato. Para ambos analitos, as relações sinal/ruído nos espectros foram de 11,2 para 0,0021 mg/L de rodamina 6G e 3,8 para 3 mg/L de glifosato, evidenciando que tais concentrações estão acima do limite de detecção da técnica (relação sinal/ruído maior que 3) e podem ser efetivamente mensuradas.

Palavras-chave: Espectroscopia ótica, substrato sólido, rodamina, glifosato, nanotecnologia.

ABSTRACT

HORNUNG, Felipe. Methodology for the detection of analytes in water using optical spectroscopy techniques on solid substrate. 67p. Masters dissertation – Graduate Program in Electrical and Computer Engineering, Federal University of Technology - Paraná. Curitiba, 2019.

This work presents a technique for the development of a solid substrate for Raman spectroscopy, coupled with the SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*) effect, using rhodamine 6G as a probe analyte. Throughout the work, a silver nanoparticles synthesis methodology was presented, which are used to amplify the Raman scattering signal through the phenomenon known as SERS, in which metallic nanoparticles in contact with the analyte cause an intensification of the electromagnetic field. Besides, several parameters involved in the solid substrate analysis process were studied, such as the filtering membrane, the microscope objectives, the drying process, the integration time, the colloidal solution pH and the analyte concentration, in order to develop an efficient methodology. For these analysis, besides the solid substrate SERS spectroscopy, ultraviolet-visible spectroscopy and liquid substrate SERS techniques were used. The results show that the SERS spectra obtained in solid substrate presented enhancements about 15x higher than the enhancements obtained in liquid substrate for the same sample. In addition to tests involving rhodamine 6G as a probe analyte, tests were also performed with glyphosate herbicide. For both analytes, the signal to noise ratios in the spectra were 11.2 for 0.0021 mg/L of 6G rhodamine and 3.8 for 3 mg/L of glyphosate, showing that such concentrations are above the detection limit of the technique (signal to noise ratio greater than 3) and can be effectively measured.

Keywords: Optic spectroscopy, solid substrate, rhodamine, glyphosate, nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espectro SERS para a rodamina 6G em diferentes concentrações.....	23
Figura 2: Comportamento da molécula de glifosato em diferentes pHs.	25
Figura 3: Espectro SERS para o glifosato em diferentes concentrações.	26
Figura 4: Laser New Wave Tempest 20	27
Figura 5: Montagem experimental para obtenção dos espectros de extinção.....	28
Figura 6: Montagem experimental para obtenção dos espectros Raman.	28
Figura 7: Balança Shimadzu 220D.....	29
Figura 8: Estufa.	29
Figura 9: Membrana filtrante.	30
Figura 10: Agitador magnético.	30
Figura 11: Espectros de extinção do colóide de AgNP's, da rodamina 6G e do colóide com rodamina 6G (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. <i>Box car</i> : 5x).	33
Figura 12: Espectros SERS em substrato líquido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G e com água deionizada (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3).	34
Figura 13: Espectros SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G e com água deionizada (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).	35
Figura 14: Espectros SERS em substrato líquido e sólido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).	36
Figura 15: Espectro SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G (Tempo de integração: 5000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).	37
Figura 16: Espectros Raman dos lados liso e rugoso da membrana filtrante (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).	38
Figura 17: Espectros SERS para as 3 objetivas diferentes (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3.	39
Figura 18: Espectros SERS para diferentes processos de secagem (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).	41
Figura 19: Espectros SERS para os diferentes tempos de integração (Médias: 3. Objetiva: 10x).	42

Figura 20: Espectros UV-Vis da solução coloidal de AgNP's para diferentes pHs (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. <i>Box car</i> : 5x).....	43
Figura 21: Espectros UV-Vis da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G para diferentes pHs (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. <i>Box car</i> : 5x).....	44
Figura 22: Espectros SERS em substrato líquido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G para diferentes pHs (Tempo de interação: 3000 ms. Médias: 3).	45
Figura 23: Espectros SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G para diferentes pHs (Tempo de interação: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).....	46
Figura 24: Espectros UV-Vis da solução coloidal de AgNP's (pH 4) com rodamina 6G para diferentes quantidades de rodamina 6G (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. <i>Box car</i> : 5x).....	47
Figura 25: Espectros SERS da solução coloidal de AgNP's (pH 4) com rodamina 6G para diferentes quantidades de rodamina 6G (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).....	48
Figura 26: Comparação focalização objetiva de 4x e 10x.	49
Figura 27: Espectros SERS da solução coloidal de AgNP's (pH 4) com rodamina 6G para diferentes quantidades de rodamina 6G (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 4x).....	50
Figura 28: Curva de calibração para as soluções coloidais de AgNP's (pH 4) com diferentes quantidades de rodamina.	51
Figura 29: Curva de calibração para as soluções coloidais de AgNP's (pH 4) com diferentes quantidades de rodamina.	52
Figura 30: Espectros UV-Vis da solução coloidal de AgNP's com glifosato para diferentes quantidades de glifosato (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. <i>Box car</i> : 5x).	53
Figura 31: Espectros SERS em substrato sólido da solução coloidal de apenas AgNP's e de AgNP's com glifosato 35 μ M (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).	54
Figura 32: Cálculo do limite de detecção e espectro SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com glifosato 35 μ M (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).....	55

Figura 33: Cálculo do limite de detecção e espectro SERS em substrato sólido da solução coloidal de apenas AgNP's (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).	56
Figura 34: Espectros SERS em substrato líquido e sólido da solução coloidal de AgNP's com glifosato (Tempo de interação: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x). ..	57
Figura 35: Espectros SERS em substrato sólido da solução coloidal de apenas AgNP's e de AgNP's com glifosato 17,5 µM (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).	58
Figura 36: Cálculo do limite de detecção e espectro SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com glifosato 17,5 µM (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Melhorias alcançadas durante o desenvolvimento do trabalho.	60
---	----

LISTA DE SIGLAS

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ACh	Neurotransmissor acetilcolina
AChE	Enzima acetil-colinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DL ₅₀	Dose Média Letal
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho)
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i> (Conferência Internacional de Harmonização)
ICS	<i>Ion Chromatography</i> (Cromatografia Iônica)
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i> (Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado)
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Limite de detecção)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NTE	<i>Neuropathy Target Esterase</i> (Esterase Neuropática Alvo)
OFs	Organofosforados
OMS	Organização Mundial da Saúde
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Scattering</i> (Espalhamento Raman Intensificado Pela Superfície)
SANEPAR	Companhia de Saneamento do Paraná
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
UV-Vis	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	micro
e^-	elétron

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 MOTIVAÇÕES.....	12
1.2 ESTADO DA ARTE	14
1.3 OBJETIVOS	15
1.4 ESTRUTURA DO TRABALHO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 ESPECTROSCOPIA ÓTICA	17
2.1.1 Espectroscopia UV-Vis.....	17
2.1.2 Espectroscopia Raman	18
2.1.2.1 Efeito SERS	19
2.1.2.2 Limite de Detecção (LOD)	20
2.2 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA	21
2.2.1 Colóides de nanopartículas	21
2.3 SUBSTRATO SÓLIDO PARA ESPECTROSCOPIA SERS.....	22
2.4 RODAMINA	22
2.5 AGROTÓXICOS.....	24
2.5.1 Glifosato	24
3 METODOLOGIA E RESULTADOS	27
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	27
3.2 REAGENTES	31
3.3 ABLAÇÃO A LASER DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	31
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM A RODAMINA 6G (AGNPS-R6G) POR ESPECTROSCOPIA.....	32
3.4.1 Caracterização da interação AgNPs-R6G por espectroscopia UV-Vis.....	32
3.4.2 Caracterização da interação AgNPs-R6G por espectroscopia SERS em substrato líquido	33
3.4.3 Secagem da solução em substrato sólido	34
3.4.4 Caracterização da interação AgNPs-R6G por espectroscopia SERS em substrato sólido	34
3.4.5 Análise da influência dos diferentes lados da membrana filtrante	36

3.4.6 Análise da influência das objetivas do microscópio.....	38
3.4.7 Análise da influência do processo de secagem.....	40
3.4.8 Análise da influência do tempo de integração	41
3.4.9 Análise da influência do pH.....	42
3.4.10 Análise da influência da concentração de rodamina 6G.....	46
3.5 DETECÇÃO DO GLIFOSATO UTILIZANDO O SUBSTRATO SÓLIDO DESENVOLVIDO: ANÁLISES PRELIMINARES.....	52
4 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	60
4.1 CONCLUSÕES	60
4.2 CONTINUIDADE DO TRABALHO	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE A - PUBLICAÇÃO RESULTANTE DESTE TRABALHO.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÕES

Todos os anos milhões de pessoas morrem através de doenças transmitidas através da água, e um número ainda maior sofre com patologias transmitidas pela mesma, principalmente crianças menores que cinco anos (FIOCRUZ, 2013). A água pode ser contaminada por uma grande variedade de produtos, e esses contaminantes podem ser divididos em três grupos: agentes químicos, físicos ou biológicos. Os agentes químicos são aqueles que alteram a composição da água e reagem com essa, podendo ser orgânicos ou inorgânicos. Já os agentes físicos não reagem com a água, mas afetam negativamente a vida do ecossistema. Por fim, os agentes biológicos são micro-organismos estranhos àquele ecossistema, que podem causar problemas à saúde humana. (SILVA, 2014).

Os contaminantes da água também podem ser classificados como emergentes, quando se tratam de produtos tóxicos que não são removidos ou eliminados pelos processos tradicionais de tratamento de água para o consumo humano. Dentre os contaminantes emergentes mais perigosos estão hormônios sintéticos, anticoncepcionais, nanomateriais, inseticidas, herbicidas, produtos de beleza, entre outros. Um agravante em relação a esses contaminantes é que têm sido gerados em grandes quantidades e têm como via principal a água (TORDIN, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou em 2011 a quarta edição das diretrizes sobre a qualidade da água para consumo humano. O objetivo principal dessas diretrizes é a proteção à saúde pública, fornecendo as recomendações da OMS para gerenciar o risco de perigos que possam comprometer a segurança da água potável.

Nesse mesmo sentido, visando controlar os contaminantes em água, no Brasil o Ministério da Saúde publicou a portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 que dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Essa portaria estabelece limites máximos para diversos tipos de contaminantes em água e é seguida pelas companhias de saneamento ao redor do Brasil, como por exemplo a Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR).

No Brasil, dentre os contaminantes em água controlados, existe uma preocupação especial com os agrotóxicos, visto que, em 2018, o Brasil completou o seu décimo ano na liderança do ranking de maior consumidor de agrotóxicos do planeta (REVISTA GALILEU, 2018), sendo responsável pela comercialização de 19% de todo agrotóxico do mundo (SILVA, 2018). Enquanto nos últimos 10 anos o mercado mundial desse setor cresceu 93%, no Brasil, esse crescimento foi de 190% (ROSSI, 2015).

Segundo o Censo Agropecuário de 2017, o uso de agrotóxicos aumentou 21,2% em 11 anos no Brasil. Além disso, na contramão de Europa e EUA, o Brasil caminha para liberar mais agrotóxicos (COSTA, C. 2018), visto que em junho de 2018 foi aprovado um projeto de lei que flexibiliza as regras para comercialização desses produtos no país (COSTA, D. 2018). Dentre outros pontos, o projeto rechaça a palavra agrotóxicos, adota o termo pesticida e prevê que esses produtos possam ser liberados pelo Ministério da Agricultura mesmo se outros órgãos reguladores, como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), não tiverem concluído análises sobre os eventuais riscos (MACHADO, OLIVEIRA, 2018).

Dentre os agrotóxicos mais utilizados do Brasil está o herbicida glifosato, sobre o qual existe um enorme debate científico e político, já que estudos mostram que essa substância está amplamente espalhada pelo ambiente contaminando não apenas a água, mas também, alimentos, atmosfera e solo, podendo causar intoxicação humana mesmo quando consumido em baixas doses. Além disso, novos estudos correlacionam o consumo de glifosato com o aparecimento de doenças, como diferentes tipos de câncer (CABRAL, 2018).

Uma técnica utilizada por órgãos públicos para verificar a presença de contaminantes em água, como por exemplo o glifosato, é conhecida como HPLC (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho). Esta técnica, que é regulamentada pela CRL 0541 (INMETRO, 2013a), possui um alto custo (R\$60,00 a R\$100,00 por amostra) e elevado tempo de análise. Dessa forma, não é uma técnica eficiente, visto a grande demanda de amostras a serem analisadas e o reduzido número de laboratórios habilitados a realizarem tal procedimento. Outra técnica utilizada para a verificação de contaminantes em água é a Cromatografia Iônica (ICS), regulamentada pela CRL 0309 (INMETRO, 2013b), porém esta técnica possui um custo ainda mais elevado, exigindo um equipamento de aproximadamente R\$10 milhões.

Este trabalho visa desenvolver uma metodologia para análises de água em substrato sólido, utilizando a espectroscopia ótica SERS e o corante rodamina 6G como analito de prova, que no futuro possa ser utilizada para análises com diversos contaminantes, dentre eles o glifosato. A vantagem de um procedimento de análise utilizando espectroscopia ótica está no custo e no tempo de análise, visto que o custo é estimado em cerca de R\$5,00 e o tempo de análise em cerca de 2 minutos. Outra vantagem está na portabilidade do equipamento usado para esse tipo de análise, que pode reduzir o tempo de detecção do analito contribuindo para a tomada de decisões corretivas que diminuam o impacto de sua presença na água. A desvantagem desse tipo análise está na sua baixa sensibilidade, porém isso pode ser resolvido por meio da nanotecnologia e do efeito SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*), onde nanopartículas metálicas em contato com o analito produzem um aumento nas vibrações moleculares, potencializando o sinal Raman.

1.2 ESTADO DA ARTE

Os métodos de tratamento utilizados no sistema de saneamento básico brasileiro são eficientes para remover contaminantes clássicos, mas não estão capacitados para fazer o mesmo em relação aos contaminantes emergentes (FILHO, 2015). Dessa forma, métodos alternativos para detectar e identificar esses novos contaminantes devem ser desenvolvidos, para que o sistema de saneamento básico possa então ser eficiente relativamente a eles.

Dentre os novos estudos realizados na área de detecção de contaminantes em água podemos citar técnicas envolvendo colorimetria via espectroscopia em substrato líquido, utilizando nanopartículas metálicas (GOÉS, 2018; COSTA, 2019). Além disso, buscando uma maior sensibilidade, existem estudos que desenvolvem substratos sólidos para a espectroscopia SERS.

A eficiência de substrato sólidos feitos para SERS já foi provada com estudos que compararam esse tipo de substrato com substratos planos, nos quais foi observada uma intensificação significativa para o substrato SERS desenvolvido com nanopartículas de prata. (DESCHAINES, WIEBOLDT, 2010). Além disso, existem estudos que desenvolvem técnicas para o desenvolvimento de substrato SERS com outras nanopartículas metálicas, como por exemplo, o ouro (MARTÍNEZ-TORRES *et al.*, 2015).

Outras pesquisas mostram que, além da prata e do ouro, nanopartículas de cobre também podem ser utilizadas para o desenvolvimento do substrato, já que todos esses tipos de nanopartículas apresentam eficiência adequada na espectroscopia SERS devido à elevada condutividade elétrica destes metais (NGUYEN *et al.*, 2012; MOSIER-BOSS, 2017).

A utilização de nanopartículas metálicas nos trabalhos citados se dá devido à interação das nanopartículas com o analito a ser estudado, através de ligações químicas ou interações eletromagnéticas, facilitando o processo de detecção. A melhoria na sensibilidade ocorre devido à Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR) das nanopartículas, que é sensível à composição, tamanho, forma, meio circundante e estado de agregação das mesmas (WEI, ABTAHI, VIKESLAND, 2015).

1.3 OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia para detecção de analitos em água via espectroscopia ótica SERS em substrato sólido.

Para isso os objetivos específicos são:

- a) verificar a viabilidade de usar a membrana filtrante de politetrafluoretileno (PTFE) hidrofóbico como substrato sólido.
- b) estabelecer uma metodologia de análise das amostras através da espectroscopia UV-Vis e Raman em substrato sólido para o analito rodamina 6G em solução aquosa.
- c) comparar e relacionar os resultados da espectroscopia Raman em substrato sólido com os resultados em substrato líquido e com os resultados da espectroscopia UV-Vis.
- d) analisar o efeito da membrana filtrante como substrato sólido, das objetivas do microscópio, do processo de secagem do coloide, do tempo de integração do espectrômetro, do pH do coloide e da concentração do analito durante o processo de espectroscopia Raman em substrato sólido.
- e) explorar a metodologia desenvolvida utilizando como analito o herbicida glifosato.

1.4 ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho está dividido em quatro capítulos. No primeiro deles são apresentadas as motivações, o estado da arte e os objetivos do trabalho. Nesse capítulo são abordados os motivos pelos quais é importante o desenvolvimento de uma metodologia para a utilização da espectroscopia SERS em substrato sólido, bem como, os trabalhos e pesquisas recentes acerca do assunto. No segundo capítulo são apresentados os fundamentos teóricos dos assuntos abordados no presente trabalho em 4 seções, são elas: espectroscopia ótica, nanociência e nanotecnologia, substrato sólido para espectroscopia SERS, rodamina e agrotóxicos. No terceiro capítulo é apresentada a metodologia desenvolvida e os resultados experimentais, mostrando todas as técnicas e etapas realizadas ao longo do processo e os resultados obtidos com a metodologia desenvolvida. E por fim, o quarto capítulo apresenta as considerações finais de acordo com os resultados obtidos e os futuros trabalhos a serem realizados.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ESPECTROSCOPIA ÓTICA

A espectroscopia é uma área da ciência que estuda a radiação absorvida, refletida, emitida ou espalhada por uma substância. Apesar do termo radiação se referir apenas à fótons (radiação eletromagnética), a espectroscopia também envolve interações de outros tipos de partículas, como nêutrons, elétrons e prótons, as quais são usadas para investigar a matéria. Existem diversas técnicas de espectroscopia, e cada dia são desenvolvidas mais, porém todas elas se baseiam no fenômeno da absorção, reflexão, emissão ou espalhamento de radiação pela matéria em uma determinada faixa de frequências e sob condições específicas. Quando a faixa de frequência do campo magnético estudado está na faixa do visível, entre 390 nm e 770 nm, a espectroscopia é chamada de ótica. (SOLÉ, BAUSÁ, JAQUE, 2005, p.1).

A espectroscopia ótica analisa a frequência e a intensidade dos feixes emitidos, refletidos e espalhados por um material, em função da frequência e intensidade do feixe incidente. Por meio da espectroscopia ótica, por exemplo, é que podemos diferenciar a cor de um objeto, pois essa cor depende dos processos de emissão, reflexão e transmissão da luz pelo objeto, de acordo com sensibilidade do olho humano à diferentes cores (SOLÉ, BAUSÁ, JAQUE, 2005, p.6).

2.1.1 Espectroscopia UV-Vis

A espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica de espectroscopia que utiliza o processo de absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta, entre 100 nm e 390 nm, e na região visível, entre 390 nm e 770 nm. Essa técnica consiste em comparar a intensidade de luz que é transmitida por um analito com a intensidade de luz à qual esse analito foi exposto, para cada comprimento de onda de uma determinada banda. Dessa forma, é possível mensurar a intensidade das interações entre o analito e a radiação eletromagnética. Esse processo é capaz de identificar informações sobre transições eletrônicas, que é quando um elétron é suficientemente excitado a ponto de ser

promovido para um estado eletrônico de mais energia através da incidência de radiação eletromagnética (HOLLAS, 2004).

O espectro resultante dessa técnica é chamado de espectro de extinção, pois é soma do espectro de absorção com o de espalhamento, já que na análise feita essas duas interações da matéria com a radiação eletromagnética estão combinadas (MIE, 1908).

2.1.2 Espectroscopia Raman

Quando uma onda eletromagnética atinge um objeto, uma parte dessa luz é refletida e outra parte transmitida para dentro do material. Dentro da parcela que foi transmitida, uma parte é absorvida e outra retransmitida na forma de luz espalhada. Essa luz espalhada é composta, em pequenas parcelas, por frequência de onda diferentes da inicial, fenômeno chamado de espalhamento Raman, em homenagem ao físico, que em 1928, observou esse fenômeno experimentalmente (RODRIGUES, GALZERANI, 2012). Dessa forma, a espectroscopia Raman é uma técnica de espectroscopia que se utiliza do espalhamento Raman para analisar determinado material.

O espalhamento Raman é classificado como um espalhamento inelástico, já que a frequência da radiação espalhada é diferente da frequência da radiação incidente. Quando a radiação espalhada tem a mesma frequência que a radiação inicial, o espalhamento é considerado elástico e é chamado de espalhamento Rayleigh (RODRIGUES, GALZERANI, 2012).

Os processos de espalhamento Raman podem ser divididos em dois tipos: Stokes e anti-Stokes. O espalhamento Raman Stokes ocorre quando o fóton incidente encontra a molécula em estado vibracional fundamental, nesse caso o processo de espalhamento absorve energia da radiação incidente, dessa forma o comprimento de onda da radiação espalhada é maior do que o comprimento de onda da radiação incidente. Já o espalhamento de Raman anti-Stokes ocorre quando o fóton incidente encontra a molécula em um estado vibracional previamente excitado, nesse caso o processo de espalhamento cede energia para a radiação inicial, dessa forma o comprimento de onda da radiação espalhada é menor do que o comprimento de onda da radiação incidente. (RAMAN, 1928).

Devido aos dois tipos de espalhamento Raman, o fóton resultante pode ser de menor energia (Stokes) e de maior energia (anti-Stokes). A diferença de energia entre o fóton incidente e o fóton espalhado corresponde à energia necessária para excitar esse nível vibracional (FARIA, SANTOS, GONÇALVES, 1997).

A espectroscopia Raman possui uma série de vantagens em comparação a espectroscopia de absorção, dentre elas o fato dela oferecer informações detalhadas sobre os níveis de energia do analito em estudo, podendo dessa forma representar uma “impressão digital” das moléculas através da espectroscopia vibracional. A grande desvantagem dessa técnica de espectroscopia é a baixa intensidade do sinal, devido à pequena quantidade de fótons que são espalhados inelasticamente, porém esse problema pode ser solucionado lançando mão de recursos especiais, como o efeito SERS, que aumenta a sensibilidade do procedimento (FARIA, SANTOS, GONÇALVES, 1997).

2.1.2.1 Efeito SERS

O efeito SERS (*Surface Enhanced Raman Scattering*), que pode ser traduzido como Espalhamento Raman Intensificado pela Superfície é utilizado para melhorar a sensibilidade da espectroscopia Raman e consiste na adsorção do analito em superfícies metálicas. Esse fenômeno foi observado pela primeira vez em 1974, porém sua descrição como um fenômeno plasmônico só foi feita em 1977. Já nas observações iniciais era possível perceber a melhora significativa do espectro Raman de moléculas adsorvidas em eletrodos de prata em comparação com moléculas livres (STROBBIA, LANGUIRAND, CULLUM, 2015).

O mecanismo responsável pela melhoria do sinal Raman pode ser dividido em dois processos, um aprimoramento químico e um aprimoramento eletromagnético. O aprimoramento químico depende da amostra e está associado às diferenças no estado da matéria quando em contato ou próximo a uma superfície metálica. Já o aprimoramento eletromagnético, que é responsável pela maior parte da melhoria do sinal, está relacionado às características plasmônicas e à estrutura do substrato utilizado (STROBBIA, LANGUIRAND, CULLUM, 2015).

O fenômeno relacionado à alta sensibilidade de técnicas que utilizam o efeito SERS, está no fato de existir uma concentração de luz em volume muito pequeno próximo a superfície de nanopartículas metálicas, devido à Ressonância de Plasmon

de Superfície Localizada (LSPR). Isso ocorre porque a nuvem eletrônica oscilante de uma nanopartícula está confinada a apenas alguns nanômetros acima de sua superfície, dessa forma o campo eletromagnético produzido é de 100 a 10000 vezes maior do que o da luz incidente. Entretanto, essas regiões com um campo eletromagnético intensificado não são uniformemente distribuídas pela superfície da nanopartícula, mas sim aparecem em regiões específicas (*hot-spots*) e dependem da forma da nanopartículas e da oscilação plasmônica. Dessa forma, moléculas nas proximidades dessas regiões de campo eletromagnético aprimorado são as que experimentam maiores intensificações de sinal Raman (LANGILLE, PERSONICK, MIRKIN, 2013).

A altíssima sensibilidade da técnica utilizando o efeito SERS já foi provada por muito estudos, entre eles, um estudo no qual foi feita a detecção de apenas uma molécula do corante rodamina 6G através de uma metodologia utilizando a espectroscopia Raman intensificada pela superfície (KNEIPP, 1995). Tais resultados garantem que a espectroscopia Raman aliada ao efeito SERS possa ser aplicada em campos medicinais e ambientais para detecção de substâncias, graças a sua alta sensibilidade.

2.1.2.2 Limite de Detecção (LOD)

Como forma de validar a capacidade da técnica desenvolvida de detectar determinada substância, é preciso calcular o limite de detecção. A *Internacional Conference on Harmonization* – ICH, estabelece 3 métodos para a determinação do LOD: por avaliação visual, baseado na relação sinal ruído para baixas concentrações de analito e baseado na relação sinal ruído utilizando uma curva de calibração (SHRIVASTAVA e GUPTA, 2011).

Nesse trabalho, o cálculo do LOD foi realizado determinando a relação sinal/ruído utilizando a amplitude do ruído (N) e a amplitude do sinal (S), medida a partir do valor médio do ruído até o topo do pico, excluindo eventuais picos de ruído. A relação sinal/ruído calculada é então multiplicada por 2. Se o valor obtido for superior a 3, indica que a concentração analisada está acima do LOD (pode ser detectada), e se for inferior a 3, indica que está abaixo do LOD (não pode ser detectada) (DESIMONI e BRUNETTI, 2015).

2.2 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

Nanociência é o ramo da ciência que estuda materiais e sistemas cujas estruturas e componentes apresentam propriedades e fenômenos físicos, químicos e biológicos significativamente modificados devido à sua escala nanométrica. Entretanto, a nanotecnologia é a habilidade de criar e manipular materiais na escala nanométrica para geração de produtos com propriedades específicas, podendo até criar estruturas maiores a partir das unidades nanométricas. Apesar da diferença entre ciência e tecnologia, o termo nanotecnologia e nanociência são empregados atualmente de forma indistinta (CAVALCANTE, 2009).

2.2.1 Colóides de nanopartículas

Nanopartículas dispersas em água são consideradas um sistema coloidal ou colóide. Em sua definição, colóides são misturas heterogêneas de pelo menos duas fases diferentes, com a matéria de uma das fases na forma finamente dividida, denominada forma dispersa, misturada com a fase contínua, denominada meio de dispersão. A ciência dos colóides está relacionada com o estudo de sistemas nos quais pelo menos um dos componentes da mistura apresenta uma dimensão nanométrica. No caso de nanopartículas dispersas em águas, as NP's são a forma dispersa e a água é o meio de dispersão (JAFELICCI JUNIOR, VARANDA, 1999).

Existem duas técnicas que podem ser utilizadas para a produção de nanopartículas: a chamada *bottom up*, baseada na combinação e crescimento controlado de átomos e moléculas e a *top down*, que consiste na quebra de partículas de dimensões maiores (MIRELA, 2009).

A vantagem da utilização de nanopartículas em determinado procedimento está no fato de que materiais de dimensões nanométricas apresentam alguns fenômenos que não são comumente observados em dimensões maiores. Essas propriedades que se manifestam em função do tamanho reduzido do material estão normalmente relacionadas a fenômenos quânticos e a alta relação área/volume do material (CAVALCANTE, 2009). Um exemplo disso são as Ressonâncias de Plasmon de Superfície Localizado (LSPR), que possibilitam às nanopartículas um grande potencial no desenvolvimento de biosensores altamente sensíveis (WEI, ABTAHI, VIKESLAND, 2015).

2.3 SUBSTRATO SÓLIDO PARA ESPECTROSCOPIA SERS

O desenvolvimento de substratos sólidos para a realização da espectroscopia SERS busca uma maior sensibilidade de detecção da que encontrada em meios líquidos. Apesar da utilização de um substrato líquido ser mais evidente para a análise de contaminantes em água, estudos mostram uma grande intensificação do sinal SERS em substratos sólidos (DESCHAINES, WIEBOLDT, 2010).

Muitas técnicas de desenvolvimento de substrato para SERS utilizam metodologia semelhantes, variando apenas o metal utilizado para a formação das nanopartículas. Essa metodologia consiste em realizar uma ablação a laser para se obter as nanopartículas metálicas em solução aquosa. Após a ablação essa solução coloidal de nanopartículas é depositada sobre um determinado substrato e deixada para secar. Só depois o analito específico é colocado sobre o substrato e são feitas as análises necessárias. A secagem da solução coloidal sobre o substrato garante uma maior concentração de nanopartículas, se comparada com a solução coloidal em si, dessa forma as análises tendem a apresentar maiores sensibilidades para a espectroscopia SERS (MARTÍNEZ-TORRES *et al.*, 2015; NGUYEN *et al.*, 2012).

Em contrapartida, existem técnicas, como a que será desenvolvida nesse trabalho, que se utilizam de uma metodologia um pouco diferentes da citada anteriormente. Alguns trabalhos, após a ablação, misturam o analito desejado com a solução coloidal de nanopartículas, e só então realizam a deposição da amostra sobre o substrato. Esse procedimento, garante uma maior homogeneização do analito com as nanopartículas, o que pode potencializar o resultado da espectroscopia SERS (MOSIER-BOSS, 2017).

2.4 RODAMINA

A rodamina 6G (R6G) é um corante altamente fluorescente normalmente utilizado como marcador para medida de traços que possui fórmula molecular $C_{28}H_{29}N_2O_3Cl$. Ela pertence à classe dos corantes xantenos, um dos mais antigos e mais utilizados corantes sintéticos, que tendem a ser fluorescentes (CASTRO, 2017).

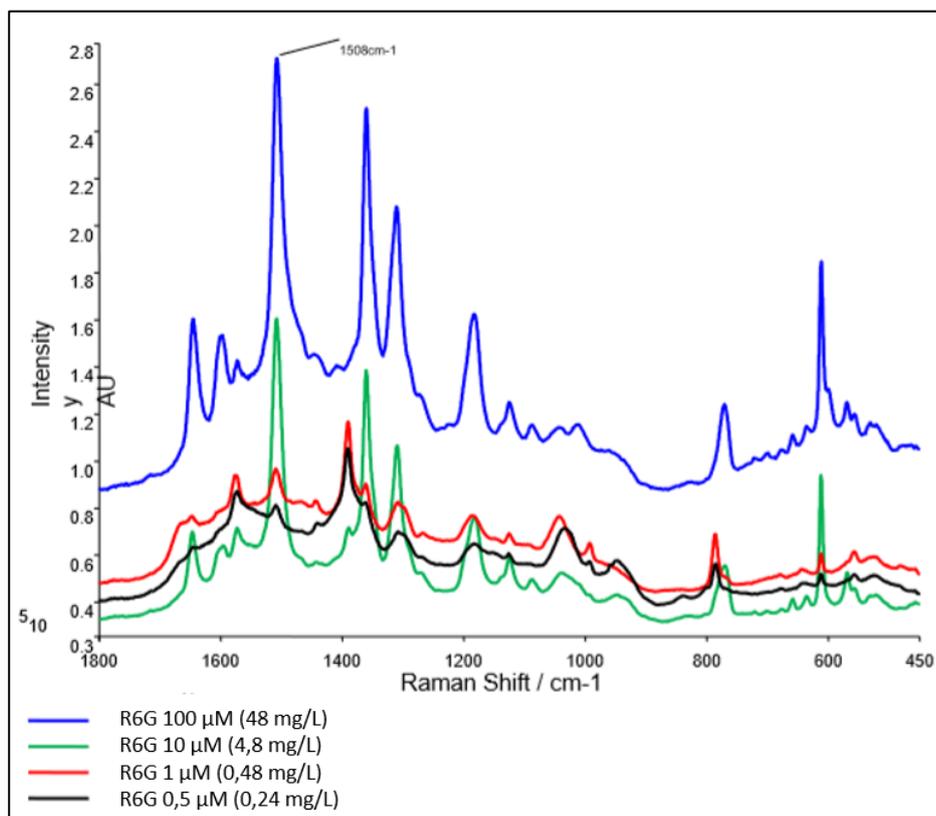
Ela se apresenta como um pó vermelho cuja massa molar é de 479,02 g/mol, é solúvel em água (20 g/L) e em diversos solventes orgânicos. Devido aos seus traços de espalhamento bem definidos, normalmente a R6G é usada para aferir o funcionamento de substratos, sejam eles em solução coloidal ou depositados em superfície (GÓES, 2018).

As propriedades óticas de corantes dependem do tipo de corante e do solvente utilizado, sendo suas características de absorção e emissão de luz determinadas pelos grupos funcionais da molécula, os cromóforos, que no caso da rodamina 6G são aminas (SOUZA, 2013).

Devido às suas propriedades óticas e espectroscópicas e aos diversos estudos envolvendo essa molécula, o corante rodamina 6G foi utilizado como molécula de prova para testar a metodologia de espectroscopia Raman associada ao efeito SERS em substrato sólido.

A Figura 1 mostra o resultado característico da espectroscopia Raman intensificada pela superfície, utilizando nanopartículas de prata depositadas sobre uma grade de cobre, para o corante rodamina 6G, em diferentes concentrações.

Figura 1: Espectro SERS para a rodamina 6G em diferentes concentrações.



Fonte: adaptado de Sharma, Carmichael e McCall (2016).

Diversos trabalhos que utilizaram nanopartículas aliadas à técnica de colorimetria via espectroscopia se mostraram muito eficientes na detecção do corante rodamina 6G, alcançando uma intensificação de 500 vezes, comparando amostras com e sem nanopartículas, mantendo a concentração do analito constante (GÓES, 2018). Outros testes para a detecção de rodamina 6G existentes na literatura corroboram a eficiência do efeito SERS na detecção desse corante (KNEIPP *et al.*, 1995; QIU *et al.*, 2008; LING, *et al.*, 2010; NGUYEN *et al.*, 2012).

2.5 AGROTÓXICOS

Dentre os contaminantes da água mais perigosos estão os agrotóxicos. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), agrotóxicos são produtos e agente de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados em diversos setores visando alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

A ampla utilização desses produtos, o desconhecimento dos riscos associados à sua utilização, o consequente desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização, a grande pressão comercial por parte das empresas distribuidoras e produtoras e os problemas sociais encontrados no meio rural constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental observados no Brasil (PERES, MOREIRA, 1999, p.348).

Mesmo que alguns dos ingredientes ativos dos agrotóxicos possam ser considerados pouco tóxicos devido aos seus efeitos agudos, não se pode esquecer dos efeitos crônicos associados à contaminação por agrotóxicos, que podem ocorrer muito tempo após a exposição. (CARNEIRO *et al.*, 2015, p. 58).

2.5.1 Glifosato

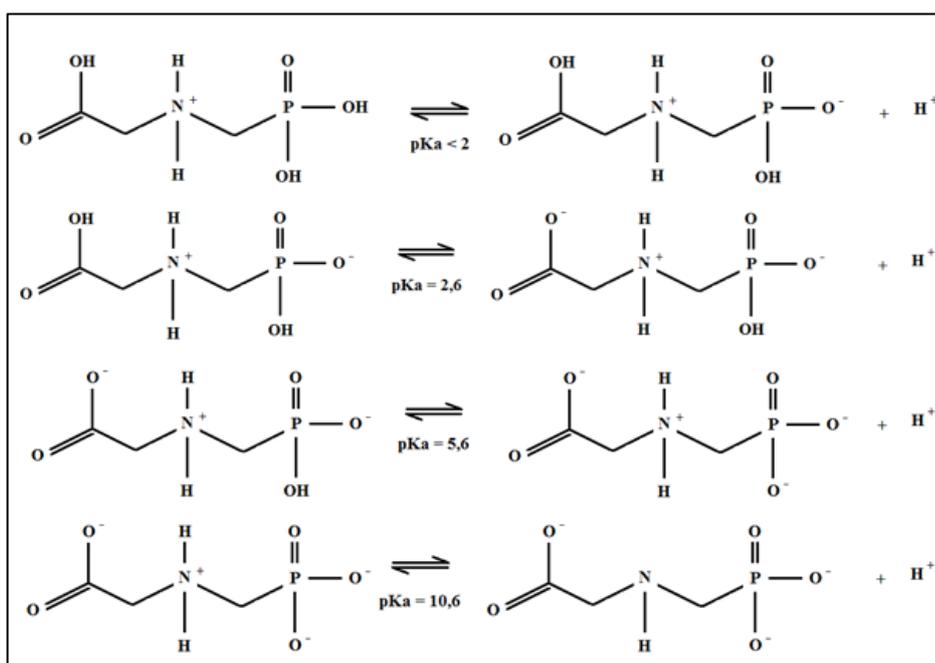
Dentre os agrotóxicos mais comercializados e utilizados no Brasil, está o glifosato. Ele é um composto organofosforado, considerado um herbicida sistêmico, pós-emergência, de amplo espectro e é amplamente utilizado para o controle de ervas daninhas na produção agrícola, bem como em áreas urbanas e industriais (BARBOZA *et al.*, 2018). Sua forma molecular é $C_3H_8NO_6P$, sua massa molar de

169,1 g/mol e pode ser encontrado em sais. Esse composto possui alta solubilidade em água (12 g/L) e é quase insolúvel em solventes orgânicos comuns, como a acetona (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

Este herbicida representa sozinho cerca de 40% de todo consumo de agrotóxicos no Brasil. Mesmo ocupando essa posição de destaque, este componente está sendo reavaliado pela Anvisa, com vista à proibição ou restrição, devido aos seus efeitos de contaminação e intoxicação (CARNEIRO *et al.*, 2015).

Em meio aquoso, o glifosato apresenta diferentes comportamentos, o que confere a molécula do herbicida diferentes cargas de acordo com o pH do meio (COUTINHO, MAZO, 2005). A Figura 2 apresenta os valores de pKa e as dissociações da molécula do glifosato.

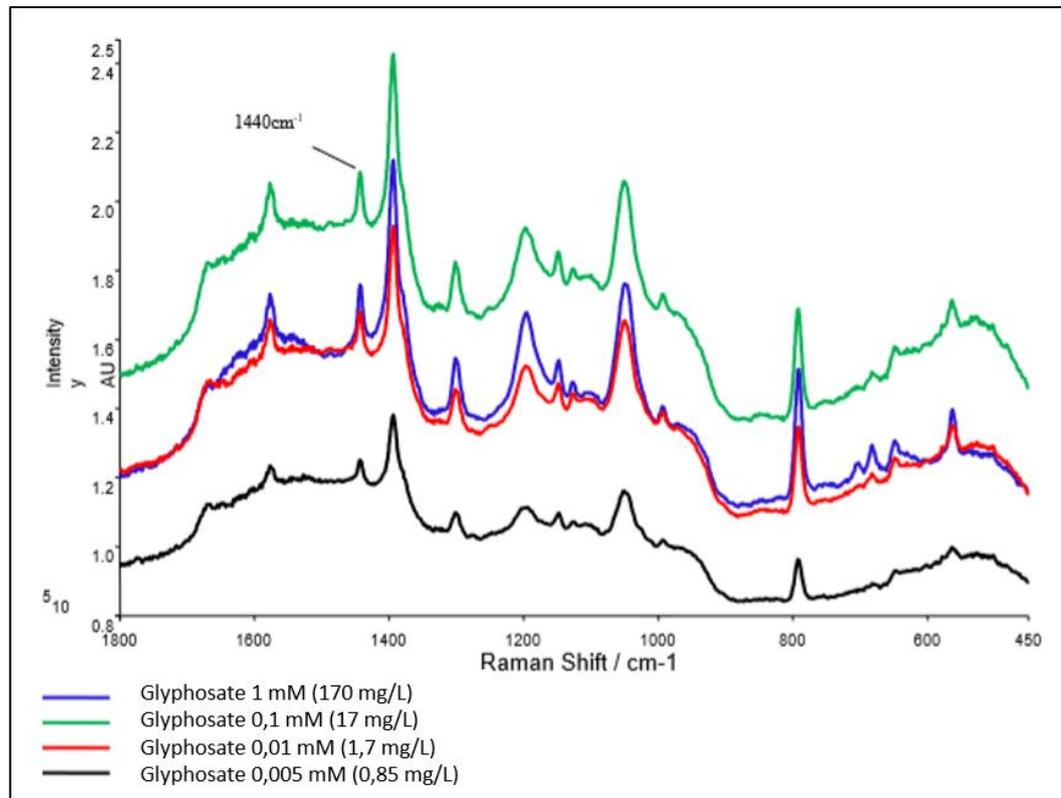
Figura 2: Comportamento da molécula de glifosato em diferentes pHs.



Fonte: Adaptado de Coutinho, Mazo (2005).

A Figura 3 mostra o resultado característico da espectroscopia Raman intensificada pela superfície, utilizando nanopartículas de prata depositadas sobre uma grade de cobre, para o herbicida glifosato, em diferentes concentrações.

Figura 3: Espectro SERS para o glifosato em diferentes concentrações.



Fonte: adaptado de Sharma, Carmichael e McCall (2016).

3 METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

As nanopartículas de prata utilizadas nos experimentos foram produzidas através da técnica *top down*, utilizando um laser Nd:YAG 532 nm pulsado New Wave Tempest 20 (Figura 4), com pulsos de duração de 3-5 ns.

Figura 4: Laser New Wave Tempest 20



Fonte: o autor, 2019.

Para a obtenção dos espectros eletrônicos de extinção foram utilizados um espectrofotômetro UV/Vis Ocean Optics HR4000 e uma fonte de luz de banda larga Ocean Optics LS-01 (lâmpada halógena de filamento de tungstênio), que permitem a obtenção de espectros óticos de extinção na região entre 200 nm e 1100 nm. Para a transmissão da luz, foi utilizada uma fibra ótica Ocean Optics com 200 μm de diâmetro de núcleo (modelo P200-2-UV-Vis), saindo da fonte de luz, e uma fibra ótica também com 200 μm de diâmetro, chegando ao espectrofotômetro, resultando em uma resolução de 6,6 nm para o espectrofotômetro. Além disso, foi utilizado um suporte de cubetas, modelo CUV-ALL-UV, ao qual foram conectadas as duas fibras óticas (Figura 5). As cubetas utilizadas durante os testes são de poliestireno da Olen (modelo K42-045) com 4,5 mL de volume.

Figura 5: Montagem experimental para obtenção dos espectros de extinção.



Fonte: o autor, 2019.

Os espectros Raman foram obtidos através de um espectrômetro da StellarNet Raman-HR-TEC-X2 (resolução de 4 cm^{-1}), laser 638 nm, 50mW, 200-3900 cm^{-1} , ao qual pode ser acoplado tanto um microscópio ótico Olympus CX31 (com objetivas de 4x, 10x ou 40x) para medir amostras sólidas, quanto um suporte de cubeta/frasco para amostras líquidas, via ponta de prova da StellarNet Raman-Probe-638 (Figura 6). Os frascos utilizados durante os testes são de borosilicato da Flow Supply (modelo 13-2200) com 4 mL de volume.

Figura 6: Montagem experimental para obtenção dos espectros Raman.



Fonte: o autor, 2019.

Todas as massas dos reagentes sólidos utilizados durante os experimentos foram medidas utilizando uma balança analítica Shimadzu AUW 220D, com resolução de 0,01 mg (Figura 7).

Figura 7: Balança Shimadzu 220D.



Fonte: o autor, 2019.

Para a realização da secagem das gotas de amostra no substrato sólido foi utilizada uma estufa feita com uma caixa de papelão (21 cm x 25 cm x 23 cm) e uma lâmpada incandescente de 70 W. A estufa era ligada 20 minutos antes de começar o processo de secagem para a sua temperatura estabilizar em torno dos 60 °C (Figura 8).

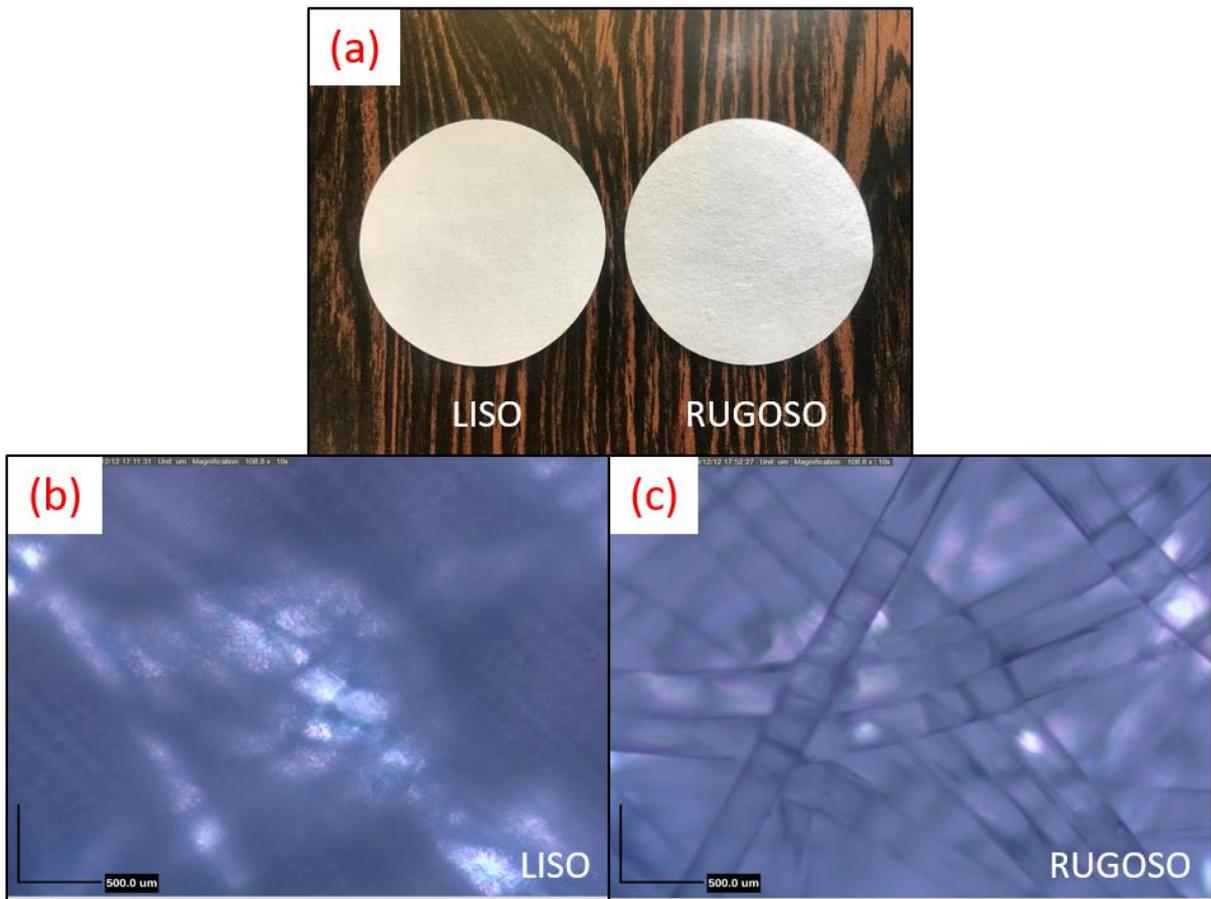
Figura 8: Estufa.



Fonte: o autor, 2019.

Como substrato sólido foi utilizada uma membrana filtrante composta por politetrafluoretileno (PTFE) hidrofóbico, com poros de 22 μm , que possuía dois lados diferentes, um liso e um rugoso. Essa membrana era cortada em frações menores com o auxílio de uma tesoura (Figura 9).

Figura 9: Membrana filtrante.



Fonte: o autor, 2019.

(a) fotografia do lado liso e do lado rugoso da membrana filtrante. (b) microfotografia do lado liso da membrana filtrante. (c) microfotografia do lado rugoso da membrana filtrante.

Para os testes envolvendo o herbicida glifosato foi utilizado um agitador magnético com aquecimento Kasvi K40-1820H para homogeneizar as amostras antes da deposição das gotas sobre o substrato sólido (Figura 10).

Figura 10: Agitador magnético.



Fonte: o autor, 2019.

3.2 REAGENTES

A ablação a laser foi realizada em uma lâmina de prata (99,9%) CAS: 6440-22, Sigma Aldrich®, submersa em uma solução de água deionizada de condutividade elétrica a 25 °C: 2,75 μ S/cm, Cloroquímica®, LOTE: 30137 e citrato de sódio 10 mM (0,147 g/50mL) dihidratado P.A. (99%), Biotec®, LOTE: 40128, com as concentrações dos componentes indicados em cada experimento.

Nos testes envolvendo mudança de pH foram adicionadas alíquotas indicadas em cada experimento de uma solução aquosa de ácido sulfúrico 300 mM (800 μ L/50 mL), Biotec®, e uma solução aquosa de hidróxido de sódio 500 mM (200 mg/10 mL), Biotec®. Além disso, foi utilizada uma solução tampão de pH 4, que foi preparada com água deionizada adicionando-se 2,9 mL de ácido acético glacial (99,7%), Biotec®, LOTE: 42383, e 1,237 g de acetato de sódio (99%), Biotec®, em um balão volumétrico classe B com 50 mL de capacidade.

Como substância de prova para a realização dos testes foi utilizada uma solução de rodamina 6G (99%), Sigma Aldrich®, com uma concentração de 10^{-3} mM. A rodamina 6G foi escolhida devido à vasta quantidade de estudos existentes na literatura que tratam do efeito SERS dessa substância, pelo baixo custo e pela sua alta fotoestabilidade.

3.3 ABLAÇÃO A LASER DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A energia de pulso utilizada para a ablação das nanopartículas de prata foi de 17 nJ, com uma taxa de repetição de 10 Hz e um tempo total de ablação de 20 minutos. Esses parâmetros foram mantidos para todas as sínteses de nanopartículas realizadas. Além disso, a temperatura do laboratório era mantida constante em 22 °C durante todos os procedimentos. A vantagem da utilização da ablação a laser está no fato desta ser uma técnica de produção de nanopartículas por rota física, dessa forma possui menor complexidade que uma técnica por rota química, já que para esta última existem novos elementos e variáveis.

A lâmina de prata estava submersa em um Becker contendo uma solução de 10 mL, sendo 9,9 mL de água deionizada e 0,1 mL de citrato de sódio 10 mM. A concentração de citrato de sódio foi escolhida de acordo com a literatura e foi mantida constante para todos os testes realizados (COSTA, 2019). Para o alvo não

se movimentar durante o processo de ablação foi utilizada uma lâmina de vidro para calçar o alvo no fundo do Becker. Foi utilizado também uma lente convergente com 15 cm de distância focal, para focalizar o laser e um espelho para direcionar o feixe para o fundo do Becker.

A produção de nanopartículas dessa maneira, com a presença do citrato de sódio durante a ablação, induz com que a carga superficial das nanopartículas seja negativa. Em um processo de ablação sem o citrato de sódio, por exemplo, íons oxigênio presentes na solução aquosa são atraídos para a superfície das nanopartículas, resultando em uma mudança de carga, que prejudica a agregação dos átomos e varia as características de absorção e espalhamento da luz (TSUJI, TSUJI, HASHIMOTO, 2011).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM A RODAMINA 6G (AGNPS-R6G) POR ESPECTROSCOPIA

3.4.1 Caracterização da interação AgNPs-R6G por espectroscopia UV-Vis

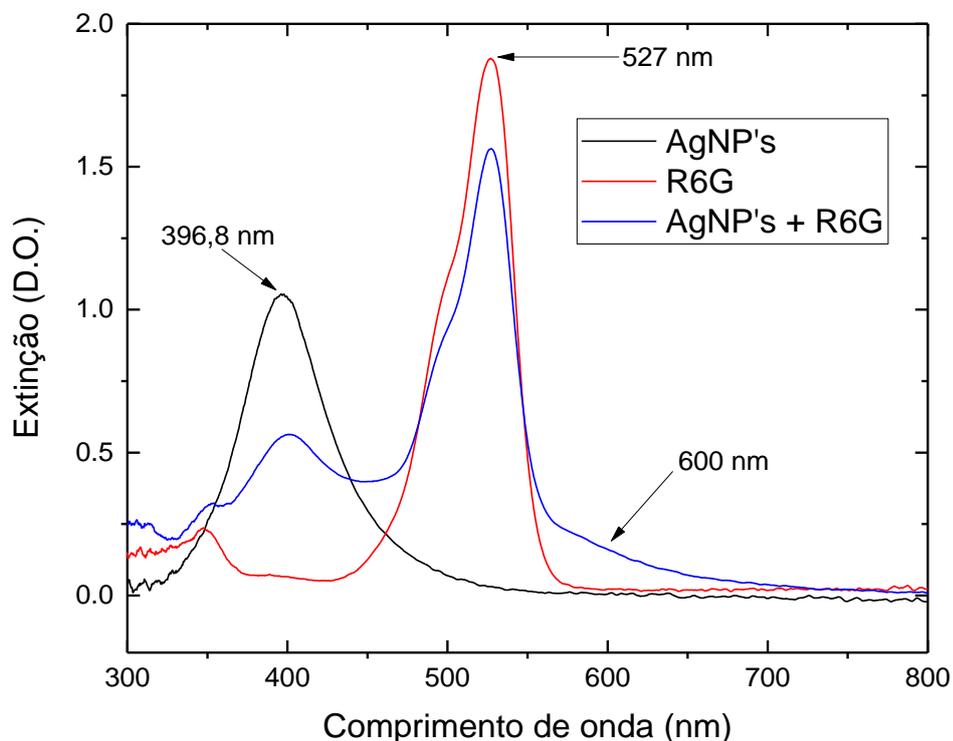
Após o processo de ablação, foi retirada uma alíquota de 1,95 mL da solução coloidal de nanopartículas, colocada em uma cubeta com capacidade para 4,5 mL e obtido o espectro de extinção da amostra. Nesse processo foi utilizado um tempo de integração de 5 ms, com 100 médias e um *box car* de 5 x.

Para esses parâmetros o espectro de extinção para a solução coloidal de AgNP's obtida apresentou comprimento de onda de pico da ressonância de plasmon de 396,8 nm, o que caracteriza as nanopartículas como nanoesferas de prata com diâmetro aproximado de 8 nm (JIN *et al*, 2001).

Já o espectro de extinção da rodamina 6G, apresentou um comprimento de onda de absorção ótica de 527 nm e uma densidade ótica de 1,9. Para a amostra da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G ocorreu uma banda de interação AgNPs-R6G por volta de 600 nm. O surgimento dessa banda se dá à custa da redução do LSPR (396,8 nm), bem como da redução da intensidade da banda associada à rodamina (527 nm).

Os resultados citados podem ser observados na Figura 11.

Figura 11: Espectros de extinção do colóide de AgNP's, da rodamina 6G e do colóide com rodamina 6G (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. Box car: 5x).



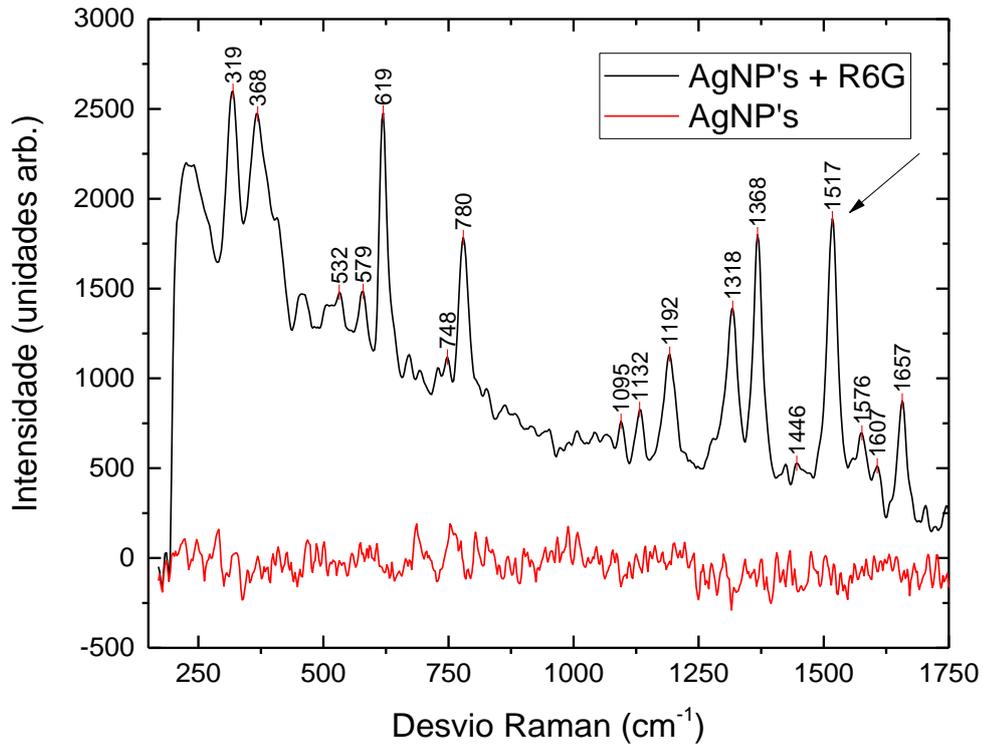
3.4.2 Caracterização da interação AgNPs-R6G por espectroscopia SERS em substrato líquido

Para a obtenção do espectro SERS, foi adicionado à mesma cubeta contendo 1,95 mL de AgNP's utilizada anteriormente 50 μ L de rodamina 6G com concentração 10^{-3} mM e foi realizada então a espectroscopia SERS dessa amostra. O tempo de integração e as médias utilizadas nesse procedimento foram, respectivamente, 3000 ms e 3 médias.

A Figura 12 mostra os espectros SERS em substrato líquido, onde, comparando com a Figura 1, é possível observar a formação de diversos picos na amostra com rodamina 6G, os quais são característicos da mesma quando interagindo com as AgNPs em questão. Na Figura 1 o teste realizado foi para AgNP's em grade metálica (processo mais complexo), porém os picos observados para a rodamina 6G são semelhantes com os obtidos na Figura 12, apresentando pequenas variações em suas posições. Para as análises de intensificação será utilizado o pico por volta de 1510 cm^{-1} , para efeito de comparação com diversos

trabalhos da literatura. Além disso, a Figura 12 apresenta um espectro SERS apenas de AgNP's, no qual não é possível observar nenhum pico evidente.

Figura 12: Espectros SERS em substrato líquido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G e com água deionizada (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3).



Fonte: o autor, 2019.

3.4.3 Secagem da solução em substrato sólido

Na realização do processo de secagem foram retiradas gotas de 7 μL da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G e colocadas sobre pequenas frações da membrana filtrante composta por PTFE hidrofóbico. Em seguida, as frações da membrana foram reservadas por 3 horas até que o processo de secagem natural estivesse completo. Na continuidade do trabalho foram feitos testes para que o processo de secagem pudesse ser otimizado através do uso de uma estufa.

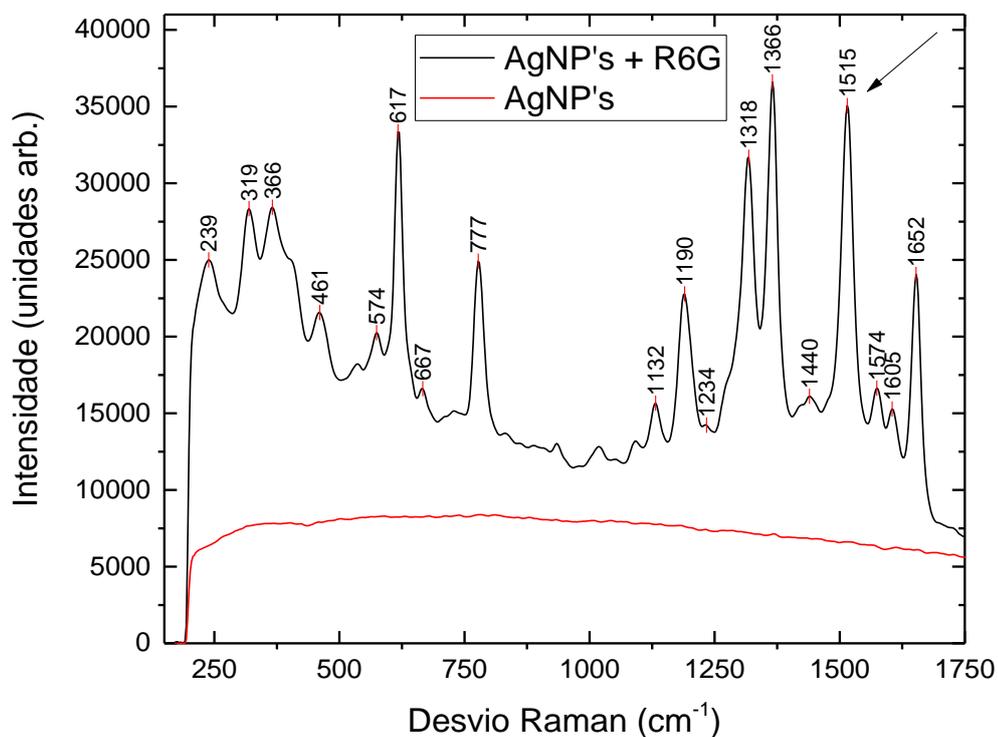
3.4.4 Caracterização da interação AgNPs-R6G por espectroscopia SERS em substrato sólido

Com as gotas da amostra secas sobre a membrana foi feita a espectroscopia SERS para substrato sólido. Para isso as membranas com as gotas

secas foram colocadas no microscópio ótico, e este acoplado ao espectrômetro da StellarNet que realizou a espectroscopia. Para esse processo a objetiva do microscópio utilizada tinha uma objetiva de 10x, o tempo de integração foi 3000 ms e o número de médias igual a 3.

A Figura 13 mostra o espectro SERS em substrato sólido para a amostra de AgNP's com rodamina, na qual é possível observar, comparando com a Figura 1, assim como no teste anterior, os picos característicos da rodamina 6G. Além disso, mostra o espectro SERS apenas com AgNP's, no qual não é possível observar nenhum pico evidente, assim como ocorreu em substrato líquido.

Figura 13: Espectros SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G e com água deionizada (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).

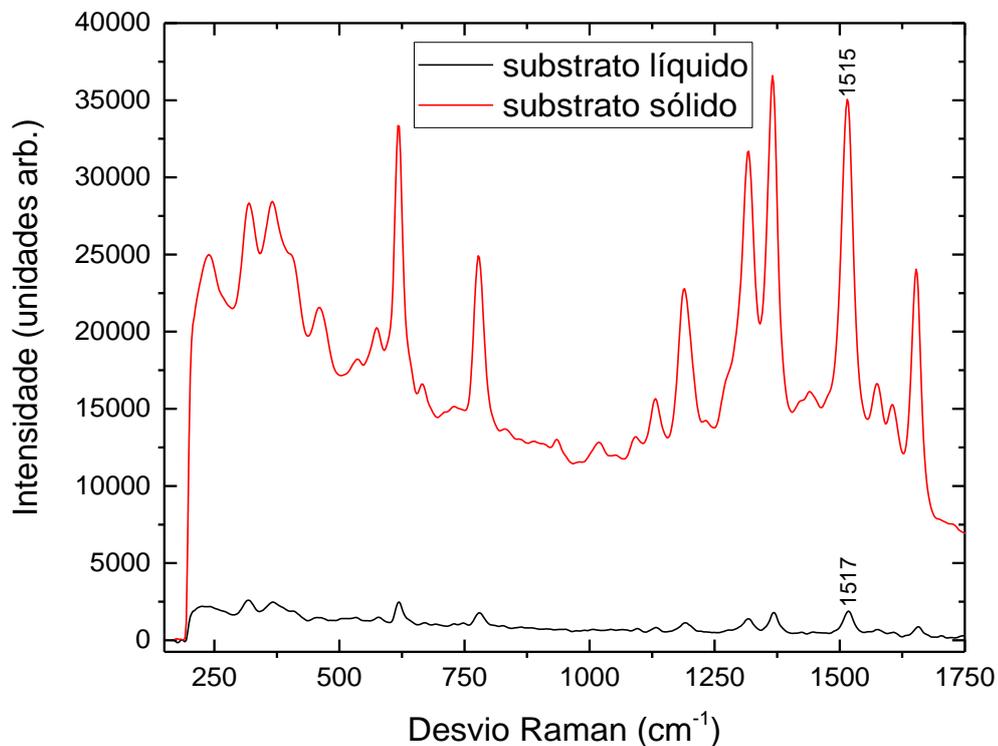


Fonte: o autor, 2019.

A Figura 14 apresenta a comparação entre os dois espectros SERS com rodamina 6G mostrados anteriormente, onde é possível notar que as amplitudes dos picos foram visivelmente intensificadas para a espectroscopia SERS realizada em substrato sólido. Para o pico localizado em torno de 1510 cm^{-1} (1517 cm^{-1} para o substrato líquido e 1515 cm^{-1} para o substrato sólido) a intensificação observada do substrato líquido para o substrato sólido foi de 15x. Esse valor de intensificação foi

obtido a partir da subtração da linha de base dos dois espectros e posterior cálculo da razão entre os valores das amplitudes dos dois picos.

Figura 14: Espectros SERS em substrato líquido e sólido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).



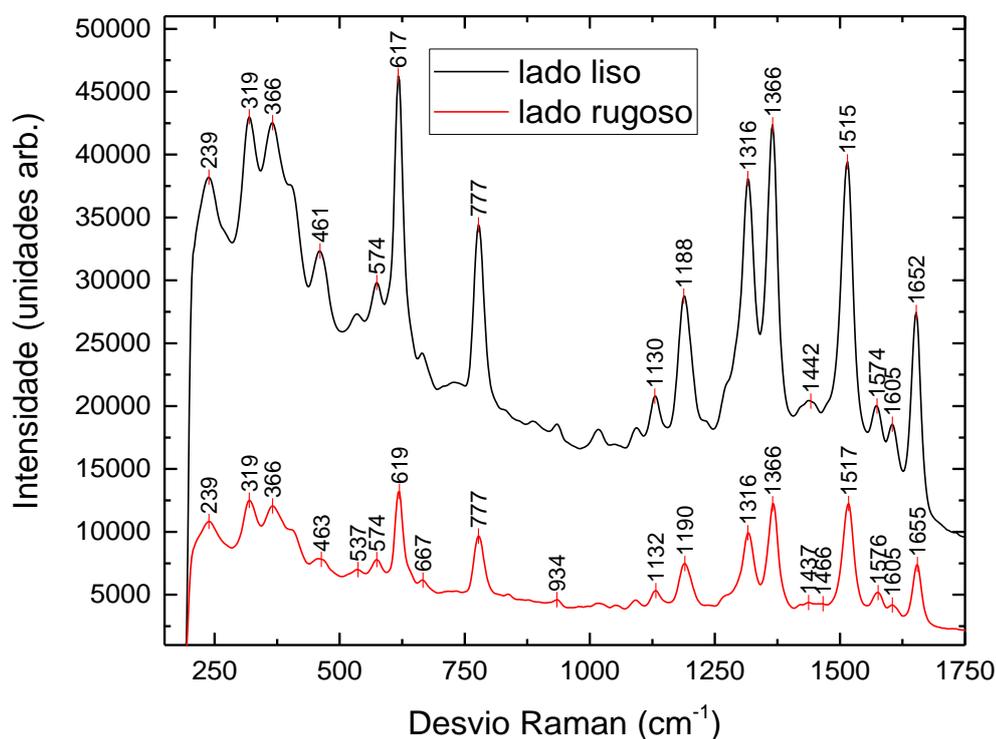
Fonte: o autor, 2019.

3.4.5 Análise da influência dos diferentes lados da membrana filtrante

A membrana filtrante utilizada possuía diferença entre seus lados, sendo um liso e um rugoso. Dessa forma, foi feita uma análise para averiguar se os resultados da espectroscopia SERS seriam diferentes entre os lados. Para isso, foi colocado em uma cubeta 1,95 mL de nanopartículas de prata e 50 μL de rodamina 6G 10^{-3} mM. Dessa solução foram retiradas alíquotas de 7 μL que foram colocadas sobre diferentes frações da membrana filtrante, algumas sobre o lado liso e outras sobre o lado rugoso. Com as gotas sobre os diferentes lados da membrana, iniciou-se o processo de secagem (natural), como descrito anteriormente. Após a secagem foi realizada a espectroscopia SERS, com o auxílio do microscópio, nas amostras. Para esse teste foi utilizada a objetiva de 10x no microscópio. O tempo de integração usado foi de 5000 ms com 3 médias.

A Figura 15 mostra os espectros SERS para gotas colocadas sobre lados diferentes da membrana filtrante. As gotas que haviam sido colocadas sobre o lado liso tiveram amplitudes de pico maiores do que as gotas colocadas sobre o lado rugoso. Para a banda em torno de 1510 cm^{-1} ocorreu uma intensificação de 2,8x do espectro SERS do lado liso relativamente ao lado rugoso.

Figura 15: Espectro SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G (Tempo de integração: 5000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).



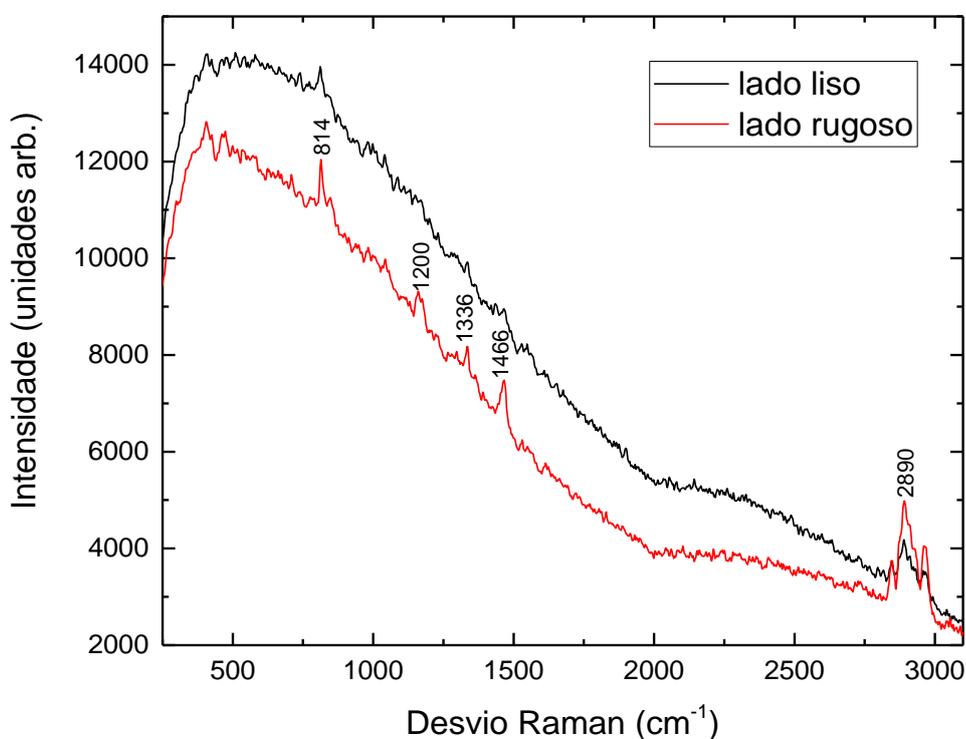
Fonte: o autor, 2019.

Para verificar se a membrana filtrante poderia causar algum tipo de interferência, também foi obtido o espectro Raman apenas da membrana, tanto do seu lado liso quanto do seu lado rugoso. Para isso o tempo de integração utilizado foi aumentado para 20000 ms e as médias aumentadas para 5. Nesse experimento também foi utilizada a objetiva de 10x de magnificação do microscópio.

Na Figura 16 estão apresentados os espectros Raman tanto para o lado liso quanto para o lado rugoso da membrana filtrante. Comparando a amplitude do pico em torno de 1510 cm^{-1} do espectro SERS para o lado liso (Figura 15) com a amplitude do pico em 814 cm^{-1} (considerado característico do material da membrana) do espectro Raman também para o lado liso, é obtido que o sinal SERS é 25,8x maior, desse modo o sinal Raman da membrana filtrante pode ser considerado ruído.

Além disso, observando os gráficos é possível perceber que o lado rugoso possui um sinal Raman maior do que o lado liso, já que as amplitudes dos picos existentes são maiores no espectro Raman referente ao lado rugoso da membrana filtrante (intensificação de 1,45x para o pico em 814 cm^{-1}). Dessa forma, somado ao fato do lado liso possuir um maior sinal SERS comparado ao lado rugoso para a rodamina 6G, este foi o lado adotado para os testes futuros. Os picos identificados no espectro Raman foram considerados característicos da membrana filtrante.

Figura 16: Espectros Raman dos lados liso e rugoso da membrana filtrante (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).



Fonte: o autor, 2019.

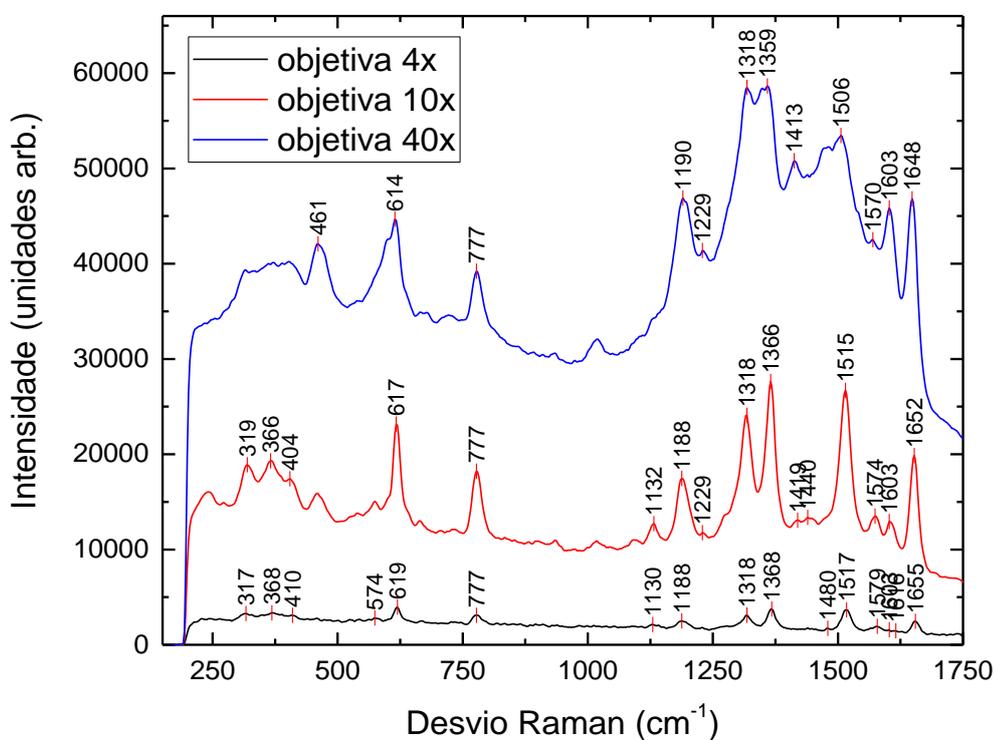
3.4.6 Análise da influência das objetivas do microscópio

Com o objetivo de analisar a influência da objetiva utilizada no espectro SERS obtido, foram feitos testes com as três objetivas disponíveis em laboratório (4, 10 e 40 vezes). Esse teste foi realizado pois apesar de uma maior focalização significar um maior sinal SERS, também significa um aumento na possibilidade de degradação da amostra, dessa forma, foi necessário investigar qual objetiva seria a mais adequada. Para isso, foram retiradas gotas de $7\ \mu\text{L}$ de uma solução idêntica à utilizada na análise anterior, colocadas sobre o lado liso de frações da membrana

filtrante e reservadas até que secassem completamente. Com as gotas da solução secas sobre a membrana foram realizadas as espectroscopias SERS, para as três objetivas diferentes. Nesse procedimento o tempo de integração e as médias foram mantidas em 5000 ms e 3, respectivamente.

A Figura 17 apresenta os resultados dos testes para as objetivas de 4 vezes, 10 vezes e 40 vezes. Para as objetivas de magnificação de 4 vezes e 10 vezes ocorreu a formação dos picos característicos da rodamina 6G, sendo eles com maiores amplitudes para a objetiva de 10 vezes (intensificação de 7,4x para o pico por volta de 1510 cm^{-1}). Já para a espectroscopia SERS realizada com a objetiva de 40 vezes o sinal foi dominado principalmente por fluorescência (a banda larga que superpõe à linhas características entre $1000\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$), o que dificultou a identificação dos picos característicos observados com as outras objetivas, principalmente na região entre 1100 cm^{-1} e 1750 cm^{-1} . Dessa forma, a objetiva de 10 vezes foi escolhida como a mais adequada para realização dos experimentos futuros.

Figura 17: Espectros SERS para as 3 objetivas diferentes (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3.



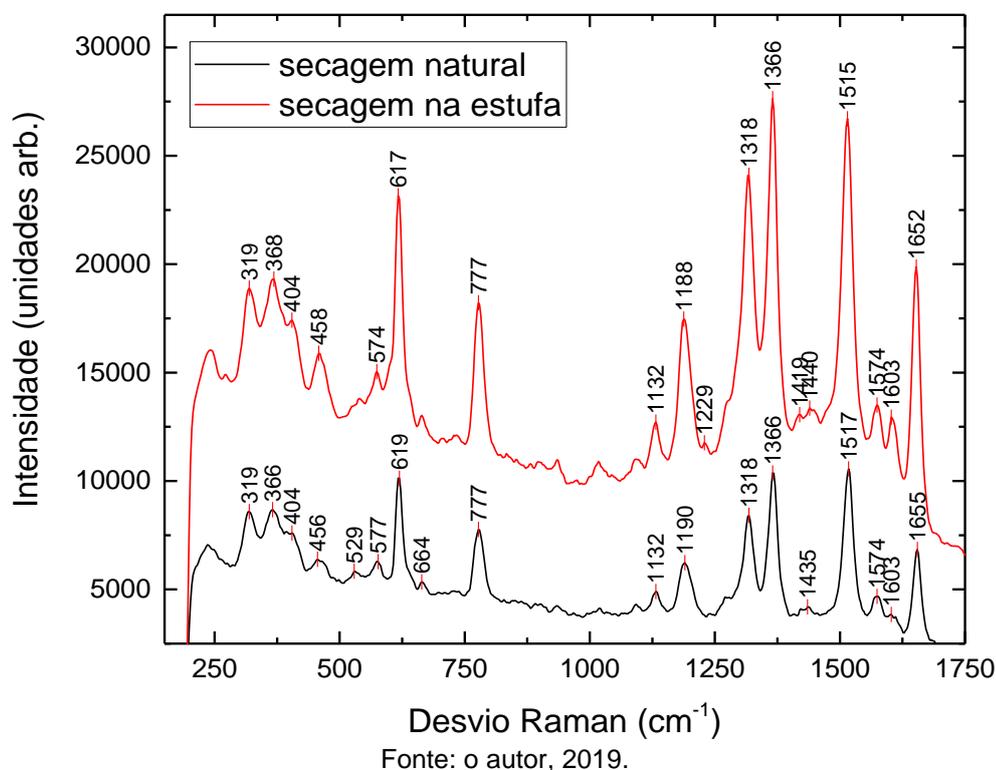
Fonte: o autor, 2019.

3.4.7 Análise da influência do processo de secagem

A fim de otimizar o processo de secagem, já que o processo natural demorava cerca de 3 horas, foi feito um teste utilizando a estufa descrita anteriormente. Para esse teste, gotas da solução coloidal de 1,95 mL de AgNP's com 50 μ L de rodamina 6G 10^{-3} mM foram colocadas sobre frações da membrana e reservadas para secar, algumas dentro da estufa e outras fora da estufa. A estufa utilizada já estava ligada 20 minutos antes das amostras serem colocadas, com uma temperatura estabilizada de 60 °C. Após 10 minutos na estufa, as frações de membrana foram retiradas e reservadas por 5 minutos até que as outras gotas secassem completamente. Com todas secas, foi realizada a espectroscopia SERS de todas as amostras. A objetiva utilizada foi a de 10x, com um tempo de integração de 5000 ms e 3 médias.

Na Figura 18 estão indicados os espectros SERS para os dois tipos de secagem. Ambos os espectros SERS apresentam os picos característicos da rodamina 6G, porém as amplitudes são maiores na amostra que foi submetida ao processo de secagem na estufa, ocorrendo uma intensificação de 2,4x para o pico em 1510 cm^{-1} . Dessa forma, o processo de secagem através da estufa foi escolhido como mais adequado para a realização dos testes futuros. O menor sinal SERS para o processo de secagem natural (mais demorado) pode estar associado a um processo de oxidação das nanopartículas quando em contato com o ar, diminuindo a interação entre as nanopartículas e a rodamina 6G.

Figura 18: Espectros SERS para diferentes processos de secagem (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).



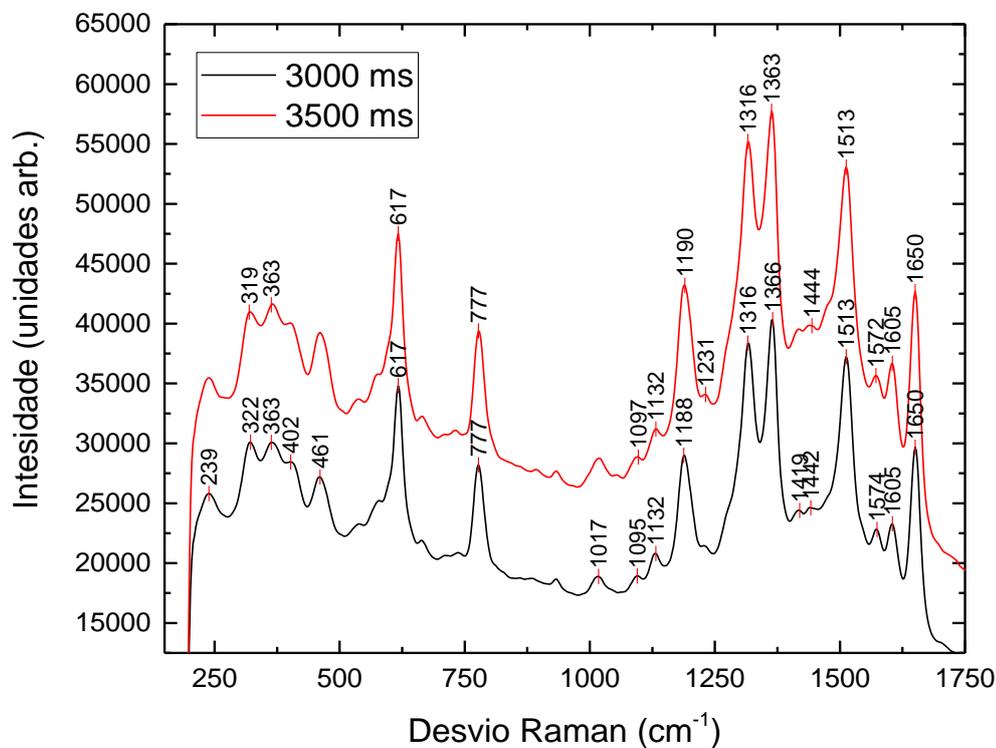
3.4.8 Análise da influência do tempo de integração

Com a adição da estufa no processo de secagem, alguns espectros SERS passaram a apresentar saturação na intensidade com a utilização da objetiva de 10 vezes. Dessa maneira, foram feitos experimentos para testar qual seria o tempo de integração mais adequado a ser utilizado no espectrômetro da StellarNet Raman-HR-TEC-X2. Para isso, gotas de 7 μL da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G foram colocadas sobre frações da membrana e estas colocadas na estufa por 10 minutos. Após a secagem completa foram obtidos diversos espectros SERS, variando o tempo de integração entre 3000 e 5000 ms. A objetiva utilizada foi a de 10 vezes e as médias foram mantidas em constantes em 3.

Os espectros SERS obtidos estão apresentados na Figura 19, na qual é possível perceber que para um tempo de integração de 3500 ms as amplitudes dos picos foram maiores do que para o tempo de integração de 3000 ms (intensificação de 1,1x para o pico por volta de 1510 cm^{-1}). Apesar disso, como para o tempo de 3500 ms o sinal chegou perto da saturação, que ocorre em 60000, para os próximos

experimentos foi escolhido o tempo de integração de 3000 ms como o mais adequado. Para tempos de integração acima de 3500 ms houve saturação do sinal.

Figura 19: Espectros SERS para os diferentes tempos de integração (Médias: 3. Objetiva: 10x).



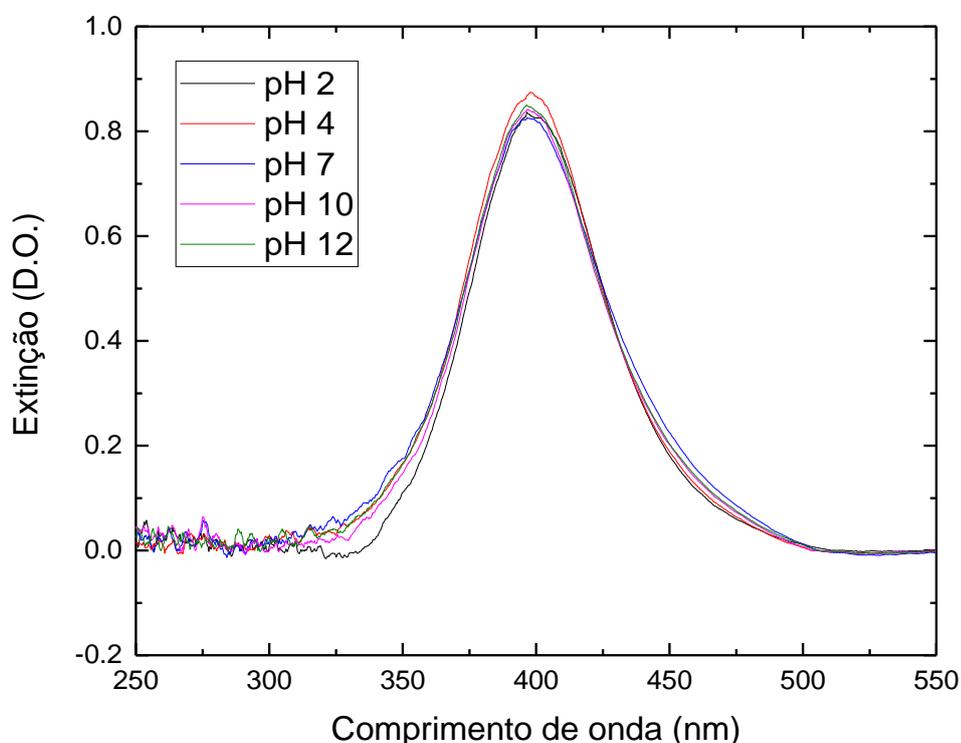
3.4.9 Análise da influência do pH

Para analisar a influência do pH dos colóides de nanopartículas na espectroscopia SERS foram feitos testes a partir de soluções com AgNP's com diferentes pHs. Foram utilizadas uma solução aquosa de ácido sulfúrico e uma solução aquosa de hidróxido de sódio para alterar o pH das amostras. Primeiramente, foi feito o processo de síntese das nanopartículas de prata por ablação a laser, como descrito na seção 3.3. Com a solução coloidal de AgNP's pronta foram colocadas alíquotas de 1,95 mL de AgNP's em 5 cubetas com capacidade para 4,5 mL. Após isso, para alterar o pH foram colocadas quantidades diferentes das soluções de ácido ou base em cada cubeta. Na primeira e na segunda cubeta foram colocados 4 μ L e 1 μ L, respectivamente, da solução de ácido sulfúrico, resultando em um pH de 2 e 4, respectivamente. Na terceira cubeta não foi acrescentada nenhuma solução, mantendo o seu pH em 7. Já na quarta e quinta

cubeta foram adicionados 1 μL e 4 μL , respectivamente, da solução de hidróxido de sódio, resultando em um pH de 10 e 12, respectivamente.

Com a mudança no pH das amostras feita, foi realizada a espectroscopia UV-Vis para cada cubeta, a fim de analisar a influência do pH no espectro de extinção do colóide. A Figura 20 apresenta os espectros de extinção para as 5 amostras com diferentes pHs com a linha de base subtraída, através da qual podemos perceber que o pH não altera de forma significativa as características plasmônicas das AgNP's.

Figura 20: Espectros UV-Vis da solução coloidal de AgNP's para diferentes pHs (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. Box car: 5x).



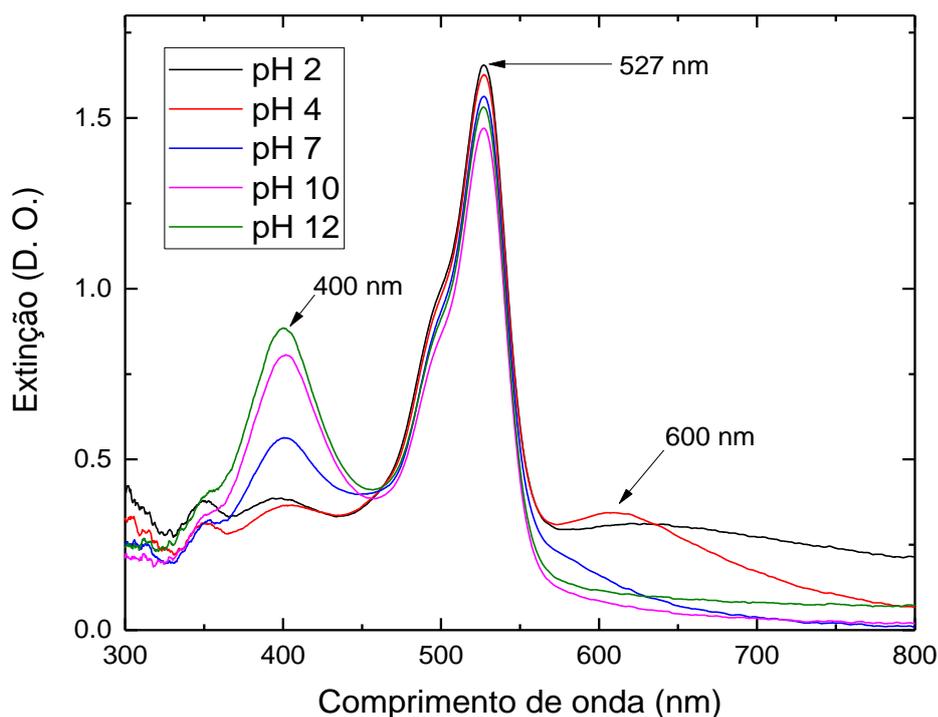
Fonte: o autor, 2019.

Após a obtenção dos espectros de extinção, foram colocadas 50 μL de rodamina 6G 10^{-3} mM em cada cubeta, e novamente foi realizada a espectroscopia UV-Vis para as cinco cubetas, a fim de analisar a interação entre a rodamina e as AgNP's com diferentes pHs. Com todas as amostras prontas foi feita a espectroscopia SERS em substrato líquido para as 5 cubetas. Logo após, foram retiradas gotas de 7 μL de cada cubeta e colocadas em frações da membrana, sobre o lado liso. Após o processo de secagem realizado com a estufa as amostras foram colocadas no microscópio com a objetiva de 10 vezes para a realização da

espectroscopia SERS em substrato sólido. O tempo de integração utilizado nesses testes foi mantido constante em 3000 ms e as médias em 3.

Os resultados da espectroscopia UV-Vis para as amostras de AgNP's e rodamina 6G com diferentes pHs estão apresentados na Figura 21. Analisando os espectros de extinção é possível notar que para o pico em 400 nm, que é atribuído à LSPR da solução coloidal de AgNP's, as amostras com o pH básico apresentaram amplitudes maiores do que as amostras com pH ácido. Para o pH 4 ocorreu a menor amplitude em 400 nm e a maior amplitude em 600 nm (banda de interação entre AgNP's e rodamina 6G). Esta relação está de acordo com o esperado, já que grande parte das nanopartículas disponíveis estão interagindo com a rodamina para esse pH, diminuindo a banda característica das AgNP's e aumentando a banda da interação. Em contrapartida, para o pH 2 a redução da banda em 400 nm não é acompanhada por um aumento significativo da banda em 600 nm, tal fato pode ser explicado pela oxidação das nanopartículas em pHs muito ácidos. Os melhores resultados de interação obtidos para o pH 4 estão relacionados com a interação eletrostática entre a molécula de rodamina e as AgNP's para esse pH, sem a oxidação das nanopartículas, observada em pHs mais ácidos.

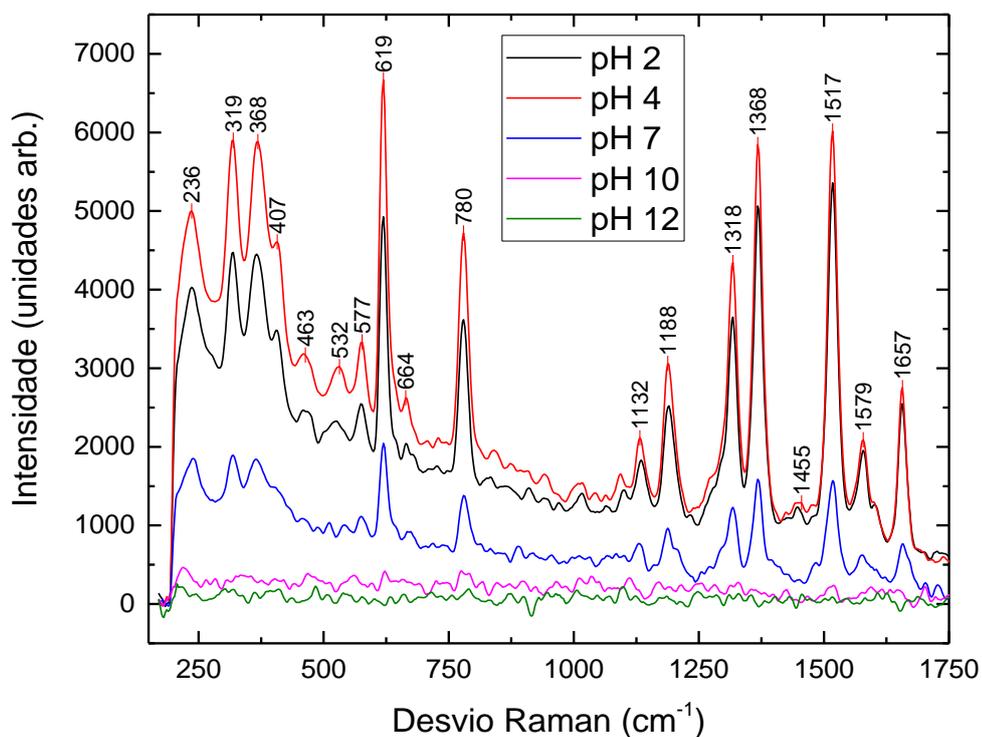
Figura 21: Espectros UV-Vis da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G para diferentes pHs (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. Box car: 5x).



Fonte: o autor, 2019.

Na Figura 22 estão os espectros da espectroscopia SERS realizada em substrato líquido, nos quais as amplitudes dos picos característicos da rodamina 6G são maiores para pHs ácidos, em especial para o pH igual a 4. Comparando com o espectro UV-Vis da Figura 21, é possível perceber que as maiores amplitudes observadas nos espectros SERS estão relacionadas com as maiores bandas de interação (600 nm) observadas no espectro UV-Vis (pHs 2, 4 e 7). Além disso, o melhor resultado da espectroscopia SERS observado para o pH 4 pode ser atribuído também aos resultados obtidos na Figura 21, já que foi para esse pH que ocorreu a banda de interação mais significativa entre AgNP's e rodamina 6G.

Figura 22: Espectros SERS em substrato líquido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G para diferentes pHs (Tempo de interação: 3000 ms. Médias: 3).

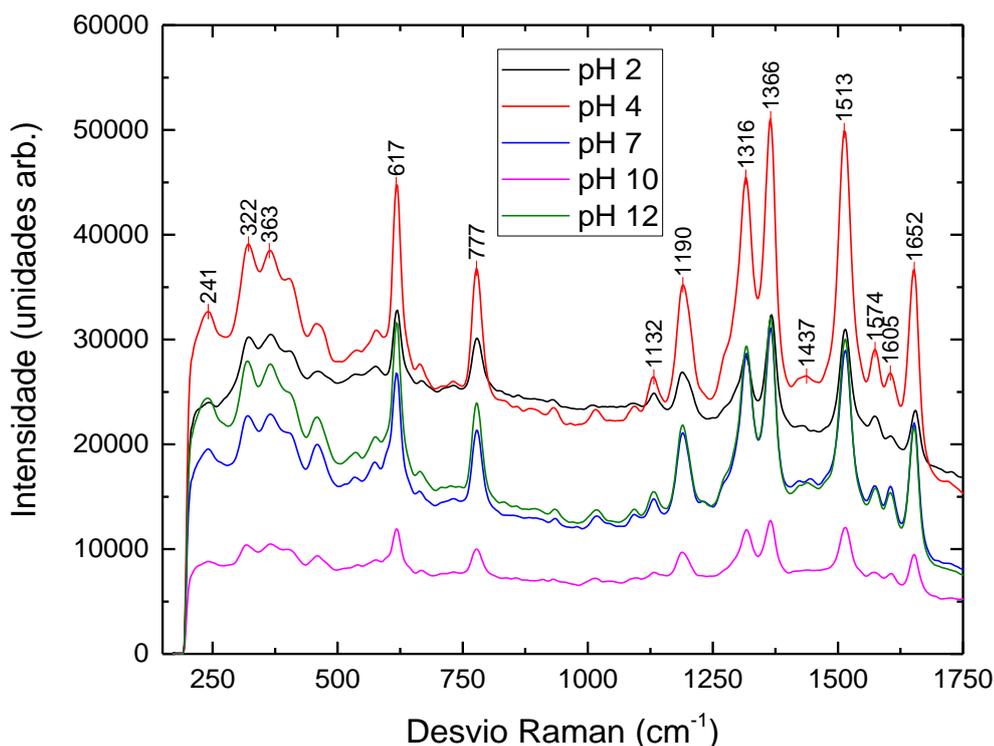


Fonte: o autor, 2019.

Os resultados da espectroscopia SERS em substrato sólido estão representados na Figura 23. A intensificação na banda por volta de 1510 cm^{-1} (razão entre intensidade no substrato sólido/intensidade no substrato líquido) foi de 2,6x para o pH 2, 6x para o pH 4 e 13,7x para o pH7. Embora a intensificação comparativa tenha sido maior para pH 7, os sinais SERS mais intensos foram observados para pH 4, assim como havia sido observado para o substrato líquido. Comparando os espectros das amostras com pH 4 e o pH 7, ambos em substrato sólido, ocorreu uma

intensificação de 1,75x para o pH 4, analisando o pico por volta de 1510 cm^{-1} . Além disso, no substrato sólido aparecem bandas para os pHs 10 e 12, o que não ocorreu no substrato líquido, devido à maior sensibilidade da espectroscopia SERS realizada em substrato sólido.

Figura 23: Espectros SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com rodamina 6G para diferentes pHs (Tempo de interação: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).



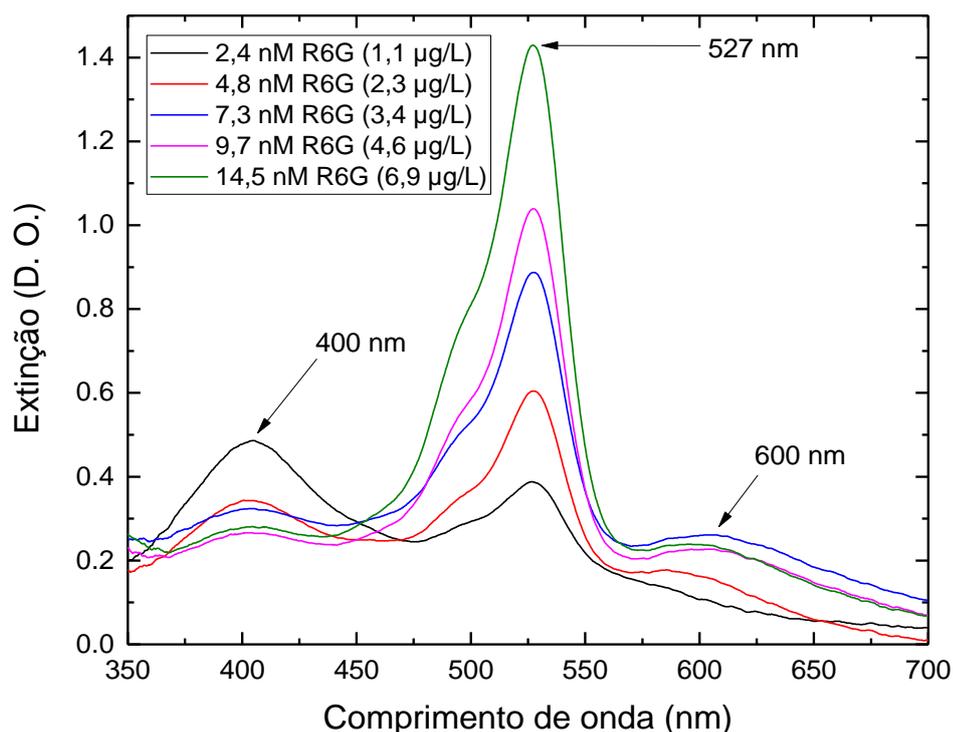
3.4.10 Análise da influência da concentração de rodamina 6G

Com o intuito de analisar a influência da concentração de rodamina 6G no espectro SERS das amostras foram feitos testes variando a concentração de rodamina. Para esses testes foram colocadas em cinco cubetas alíquotas de 1,95 mL de solução coloidal de nanopartículas de prata e 71,5 μL de solução tampão de pH 4. Logo após, foram colocadas quantidades diferentes de solução aquosa de rodamina 6G 10^{-3} mM e água deionizada em cada cubeta, para manter o volume final das amostras constante em 2,0665 mL. Na primeira foi adicionada 5 μL de rodamina e 40 μL de água, na segunda 10 μL de rodamina e 35 de água, na terceira 15 μL de rodamina e 30 μL de água, na quarta 20 μL de rodamina e 25 de água e na quinta 30 μL de rodamina e 15 de água. Esse procedimento resultou em concentrações de rodamina 6G de 2,4 nM (1,1 $\mu\text{g/L}$), 4,8 nM (2,3 $\mu\text{g/L}$), 7,3 nM (3,4

$\mu\text{g/L}$), 9,7 nM (4,6 $\mu\text{g/L}$) e 14,5 nM (6,9 $\mu\text{g/L}$), respectivamente. Com as amostras preparadas, foram obtidos os espectros UV-Vis das 5 amostras, para analisar a influência da concentração de rodamina no espectro de extinção.

A Figura 24 apresenta os espectros de extinção para as amostras com diferentes quantidades de rodamina 6G, na qual é possível observar que a amplitude do pico em 527 nm aumenta à medida que a quantidade de rodamina 6G na solução aumenta. É possível perceber também uma diminuição da banda em 400 nm e um aumento da banda em torno de 600 nm, à medida que a quantidade de rodamina 6G aumenta na amostra, resultado da interação das AgNP's com a rodamina 6G.

Figura 24: Espectros UV-Vis da solução coloidal de AgNP's (pH 4) com rodamina 6G para diferentes quantidades de rodamina 6G (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. *Box car*: 5x).



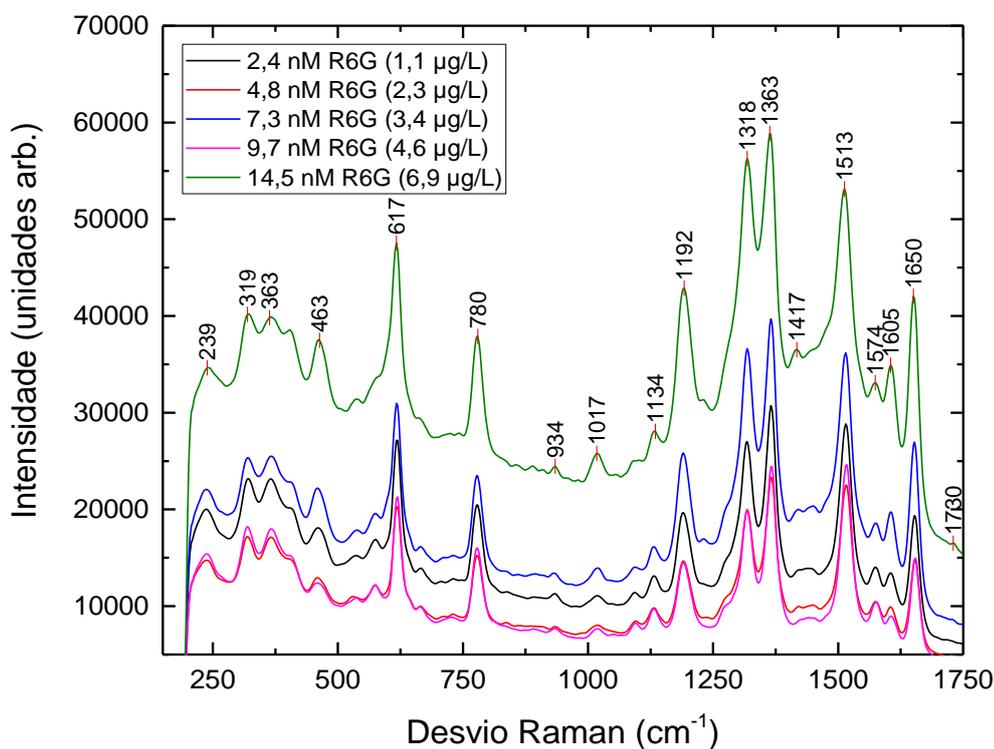
Fonte: o autor, 2019.

Após a obtenção dos espectros UV-Vis, foram retiradas gotas de 7 μL de cada amostra, colocadas sobre o lado liso de frações da membrana filtrante e deixadas para secar na estufa por 10 minutos. Depois das gotas estarem secas, elas foram levadas ao microscópio, para a realização da espectroscopia SERS. A

objetiva usada foi a de 10x, o tempo de integração foi de 3000 ms e foram feitas 3 médias.

A Figura 25 mostra os espectros SERS para as amostras com diferentes quantidades de rodamina 6G. Calculando a amplitude no pico próximo a 1510 cm^{-1} para os 5 espectros SERS, constatou-se que a menor amplitude foi a da amostra com 4,8 nM de rodamina 6G (16034 ua), seguida pelas amostras com 9,7 nM (18864 ua), 2,4 nM (20435), 7,3 nM (25758 ua) e 14,5 nM (34635 ua), respectivamente. Para esse teste era esperado que a amplitude no pico analisado aumentasse a medida que a quantidade de rodamina 6G na amostra aumentasse. As concentrações próximas, a não uniformidade das gotas e a utilização da objetiva de 10x foram consideradas responsáveis pelo resultado negativo, já que a objetiva não conseguia focalizar a gota por inteiro.

Figura 25: Espectros SERS da solução coloidal de AgNP's (pH 4) com rodamina 6G para diferentes quantidades de rodamina 6G (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 10x).

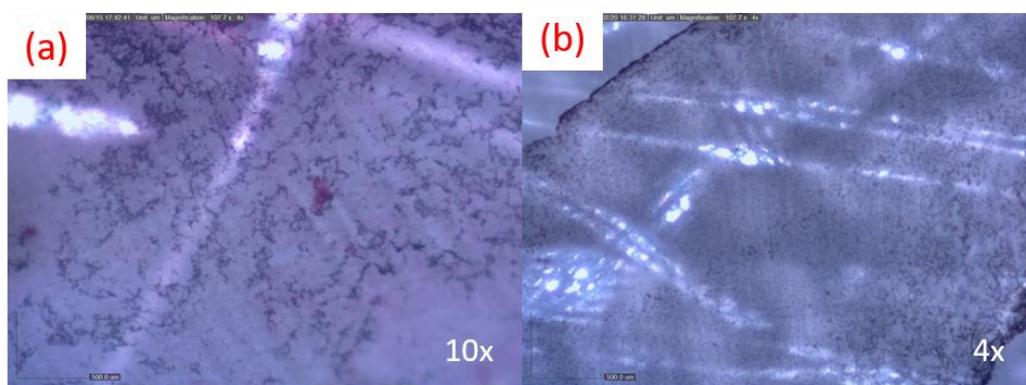


Fonte: o autor, 2019.

Para solucionar o problema com a objetiva de 10x, foram realizados testes com a objetiva de 4x, já que esta consegue focalizar a gota de cada amostra por inteiro, e aumentado o intervalo das concentrações. A Figura 26 mostra uma

comparação entre a focalização das duas objetivas. Nesses novos testes foram colocadas em cinco cubetas alíquotas de 0,9 mL de solução coloidal de nanopartículas de prata e 33 μL de solução tampão de pH 4. Nesse teste as quantidades de rodamina foram variadas de 5 μL até 65 μL , variando de 15 em 15, e as de água deionizada de 195 μL até 135 μL , a fim de manter o volume final das amostras constante em 1,133 mL. Esse procedimento resultou em concentrações de rodamina 6G de 4,4 nM (2,1 $\mu\text{g/L}$), 17,7 nM (8,5 $\mu\text{g/L}$), 30,9 nM (14,8 $\mu\text{g/L}$), 44,1 nM (21,1 $\mu\text{g/L}$) e 57,4 nM (27,5 $\mu\text{g/L}$), respectivamente.

Figura 26: Comparação focalização objetiva de 4x e 10x.

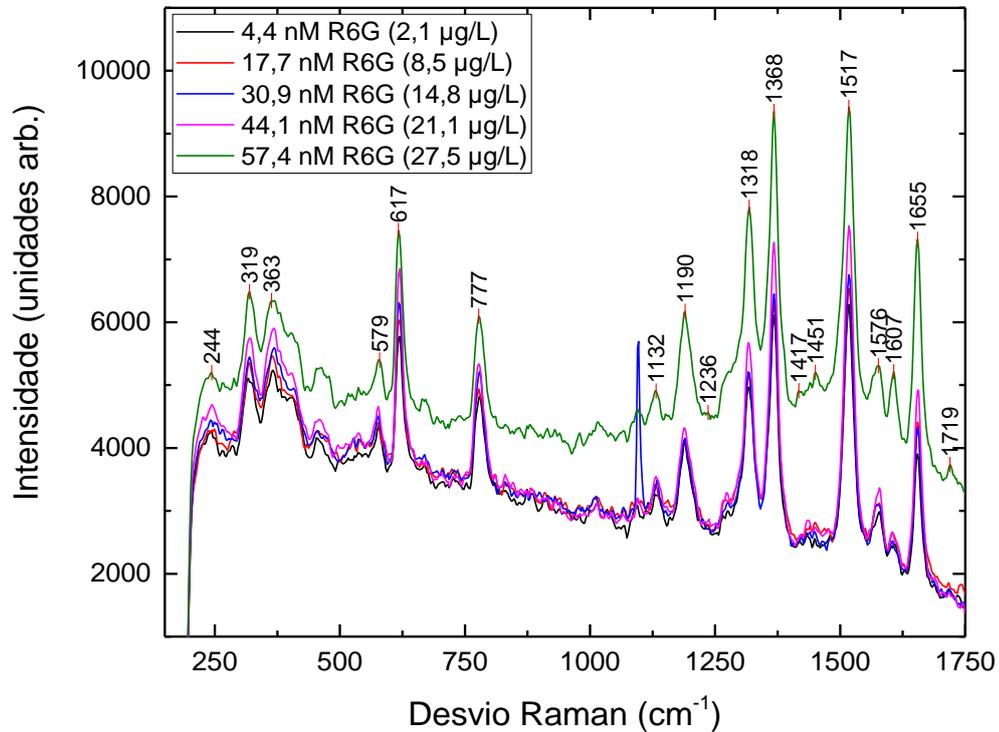


Fonte: o autor, 2019.

(a) microfotografia com a objetiva de 10x. (b) microfotografia com a objetiva de 4x.

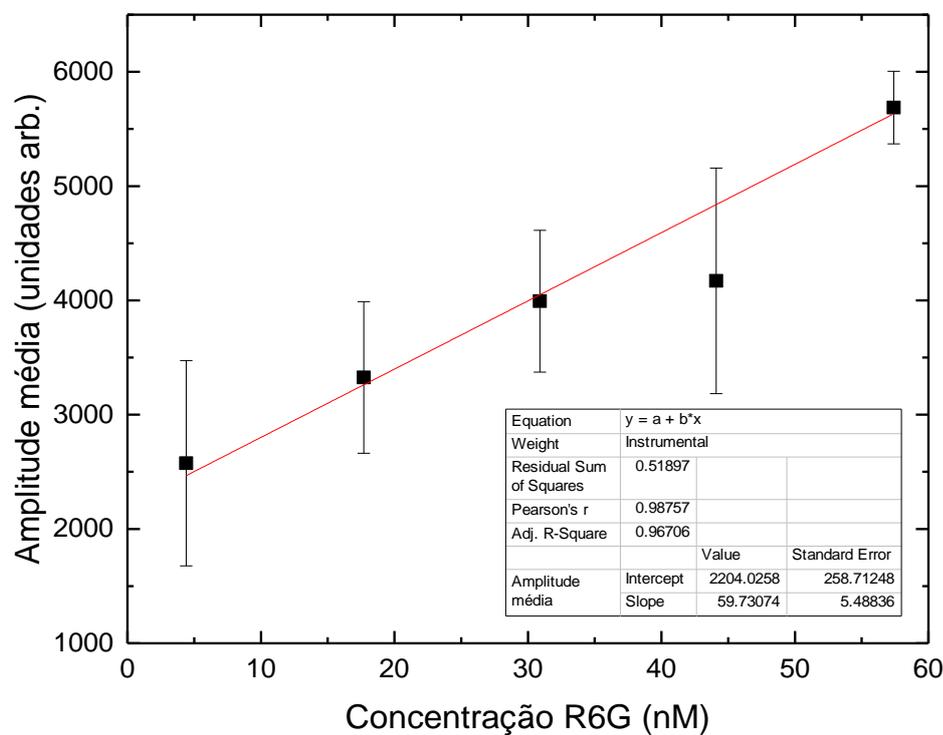
Os espectros SERS dos testes utilizando a objetiva de 4x em amostras com diferentes quantidades de rodamina 6G estão apresentados na Figura 27. Calculando a amplitude no pico próximo a 1510 cm^{-1} para os 5 espectros SERS, constatou-se que a menor amplitude foi a da amostra com 4,4 nM de rodamina 6G (4240 ua), seguida pelas amostras com 17,7 nM (4478 ua), 30,9 nM (4715 ua), 44,1 nM (5496 ua) e 57,4 nM (6064 ua), respectivamente. Para esse teste a amplitude do pico analisado aumentou a medida que a quantidade de rodamina 6G em cada amostra aumentava, conforme esperado.

Figura 27: Espectros SERS da solução coloidal de AgNP's (pH 4) com rodamina 6G para diferentes quantidades de rodamina 6G (Tempo de integração: 3000 ms. Médias: 3. Objetiva: 4x).



A Figura 28 apresenta uma curva de calibração levando em conta as amplitudes médias do pico próximo a 1510 cm^{-1} para as amostras com diferentes quantidades de rodamina 6G. Para a elaboração dessa curva foram feitas as médias das amplitudes para cada quantidade de rodamina, utilizando 3 espectros SERS de gotas diferentes para cada quantidade de R6G analisada. Com isso, pode-se observar um comportamento crescente dos pontos da curva, acompanhando o crescimento da quantidade de rodamina 6G nas amostras. Apesar de que o mais indicado seria utilizar uma razão entre um pico característico da rodamina 6G e um pico de referência em um mesmo espectro, como os valores de amplitude para a rodamina foram muito grandes, foi possível traçar a curva de calibração usando apenas os valores absolutos do pico por volta de 1510 cm^{-1} .

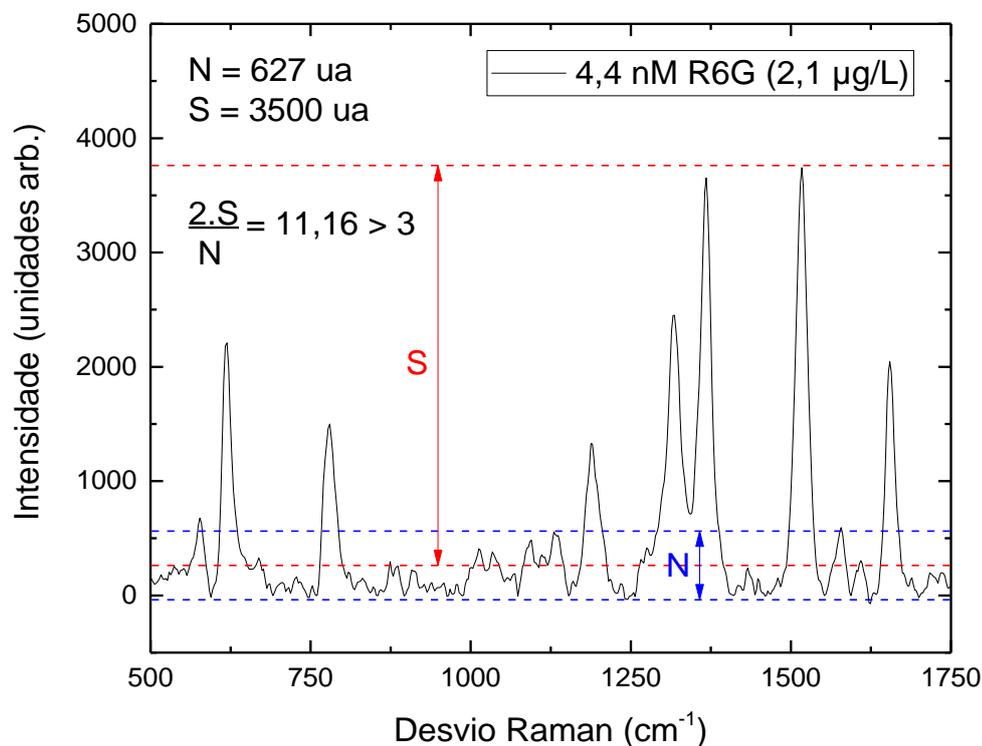
Figura 28: Curva de calibração para as soluções coloidais de AgNP's (pH 4) com diferentes quantidades de rodamina.



Fonte: o autor, 2019.

Para fins de comparação das concentrações utilizadas com o limite de detecção, foi calculada a relação sinal/ruído para a menor concentração de rodamina 6G utilizada no teste com a objetiva de 4x. Para o cálculo foi utilizada a amplitude pico-a-pico do ruído (N) e a amplitude do sinal ($2 \times S$), medida a partir do valor médio do ruído até o topo do pico. A Figura 29 apresenta o espectro SERS e os cálculos realizados para a amostra com 4,4 nM de rodamina (2,1 $\mu\text{g/L}$). A relação sinal/ruído precisa ser maior que 3, o que de fato ocorreu, já que o resultado obtido foi de 11,2, mostrando que a amostra analisada está consideravelmente acima do limite de detecção da técnica desenvolvida.

Figura 29: Curva de calibração para as soluções coloidais de AgNP's (pH 4) com diferentes quantidades de rodamina.



Fonte: o autor, 2019.

3.5 DETECÇÃO DO GLIFOSATO UTILIZANDO O SUBSTRATO SÓLIDO DESENVOLVIDO: ANÁLISES PRELIMINARES

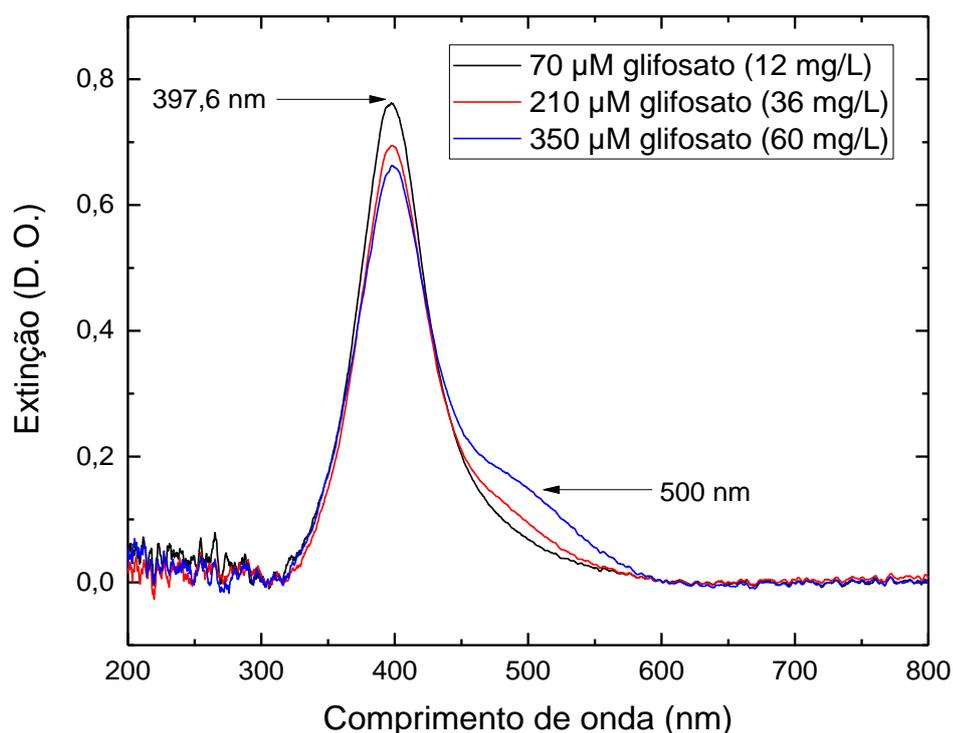
Após o desenvolvimento da metodologia para uso com rodamina 6G, foram feitos experimentos utilizando o herbicida glifosato. O processo utilizado para a síntese das nanopartículas de prata utilizadas nos testes a seguir foi o mesmo procedimento de ablação descrito anteriormente. Para os testes com glifosato foi escolhido o pH 4, devido à carga positiva que a molécula do herbicida apresenta para este pH (COUTINHO, MAZO, 2005).

Após a ablação, foram retiradas alíquotas de 0,9 mL da solução coloidal de AgNP's e colocadas em 3 cubetas com a capacidade de 4,5 mL. Nessas cubetas foram acrescentados 33 µL de solução tampão de pH 4 e quantidades diferentes de glifosato com concentração 4 mM. Na primeira cubeta foram colocados 20 µL de glifosato e 180 µL de água deionizada, na segunda 60 µL de glifosato e 1140 µL de água deionizada e na terceira 100 µL de glifosato e 100 µL de água deionizada. Dessa forma, todas as amostras possuíam o mesmo volume final de 1,133 mL,

porém com diferentes concentrações de glifosato, 70 μM (12 mg/L), 210 μM (36 mg/L) e 350 μM (60 mg/L), respectivamente.

Na Figura 30 estão apresentados os espectros de extinção para essas amostras, na qual é possível observar uma banda de interação entre as nanopartículas e o glifosato em torno de 500 nm. Observa-se que essa banda de interação aumenta à medida que a concentração de glifosato aumenta, resultado de um número maior de moléculas de glifosato disponíveis para interagir com as AgNP's. A intensificação observada foi de aproximadamente 2,2x entre as amostras com menor e maior concentração na Figura 30. É possível notar também que a intensificação da banda por volta de 500 nm se dá à custa da redução do LSPR (397,6 nm), que diminui à medida que a concentração de glifosato aumenta nas amostras.

Figura 30: Espectros UV-Vis da solução coloidal de AgNP's com glifosato para diferentes quantidades de glifosato (Tempo de integração: 5 ms. Médias: 100. Box car: 5x).



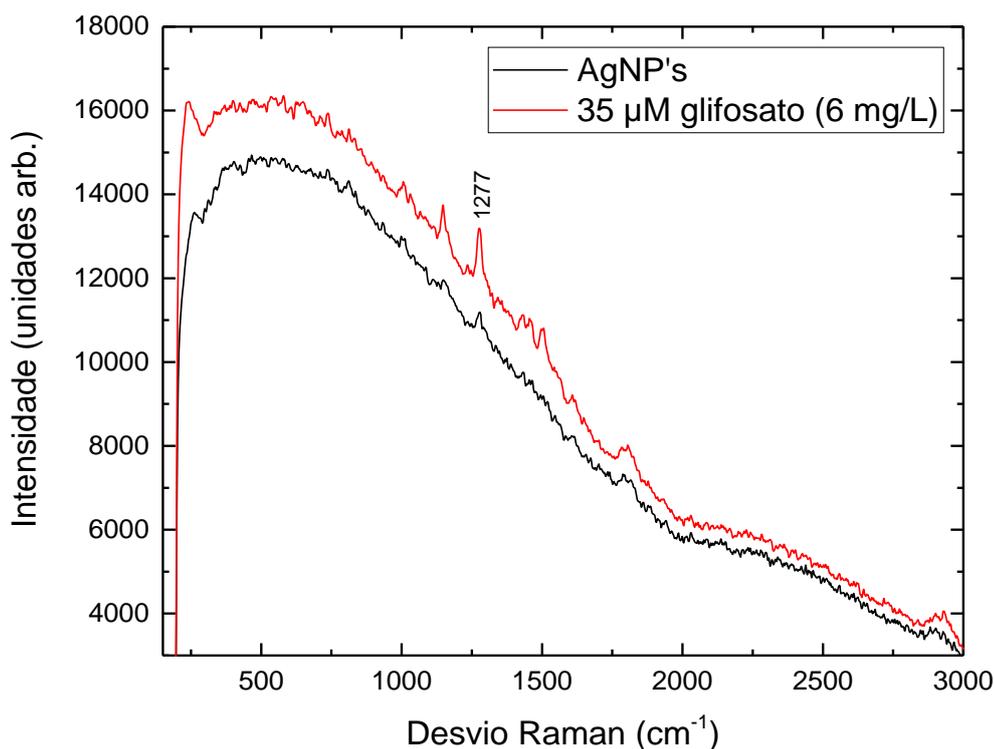
Fonte: o autor, 2019.

Além disso, para a espectroscopia SERS em substrato sólido, foram realizados testes utilizando concentrações menores de glifosato. Para isso, da mesma forma que nos testes anteriores, foram colocadas alíquotas de 0,9 mL de AgNP's e 33 μL de solução tampão de pH 4 em cubetas. Na primeira cubeta foram colocados 5 μL de glifosato e 195 μL de água deionizada, na segunda 10 μL de

glifosato e 190 μL de água deionizada, na terceira 15 μL de glifosato e 185 μL de água deionizada e na quarta 20 μL de glifosato e 180 μL de água deionizada, mantendo o volume final constante em 1,133 mL. Para esse teste as concentrações de glifosato obtidas foram respectivamente 17,5 μM (3 mg/L), 35 μM (6 mg/L), 52,5 μM (9 mg/L) e 70 μM (12 mg/L). Essas amostras foram então submetidas a espectroscopia SERS em substrato sólido.

Na Figura 31 são apresentados espectros SERS de duas soluções, a primeira apenas com AgNP's (pH 4) e a segunda com AgNP's (pH 4) e glifosato com concentração de 35 μM (6 mg/L). Com a comparação dos dois espectros SERS é possível perceber que o pico localizado por volta de 1275 cm^{-1} aparece em ambos os casos, porém para a amostra contendo glifosato o pico está intensificado.

Figura 31: Espectros SERS em substrato sólido da solução coloidal de apenas AgNP's e de AgNP's com glifosato 35 μM (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).



Para quantificar a intensificação observada na Figura 31 foram estimados os limites de detecção para as duas amostras, retirando suas linhas de base. As Figuras 32 e 33 apresentam, respectivamente, os espectros SERS e os cálculos realizados para a amostra contendo glifosato e para a amostra contendo apenas nanopartículas. Para a amostra contendo glifosato o valor da relação sinal/ruído foi

de 4,5, acima do limite de detecção (maior que 3), e para a amostra contendo apenas nanopartículas o valor da relação sinal/ruído foi de 2,4, abaixo do limite de detecção (menor que 3). Esse resultado era esperado, pois como o pico por volta de 1275 cm^{-1} aumentou com a inclusão do glifosato, a relação sinal/ruído também teria que aumentar. Dessa forma, para as análises de identificação do glifosato será utilizado o pico por volta de 1275 cm^{-1} .

Figura 32: Cálculo do limite de detecção e espectro SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com glifosato $35\text{ }\mu\text{M}$ (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).

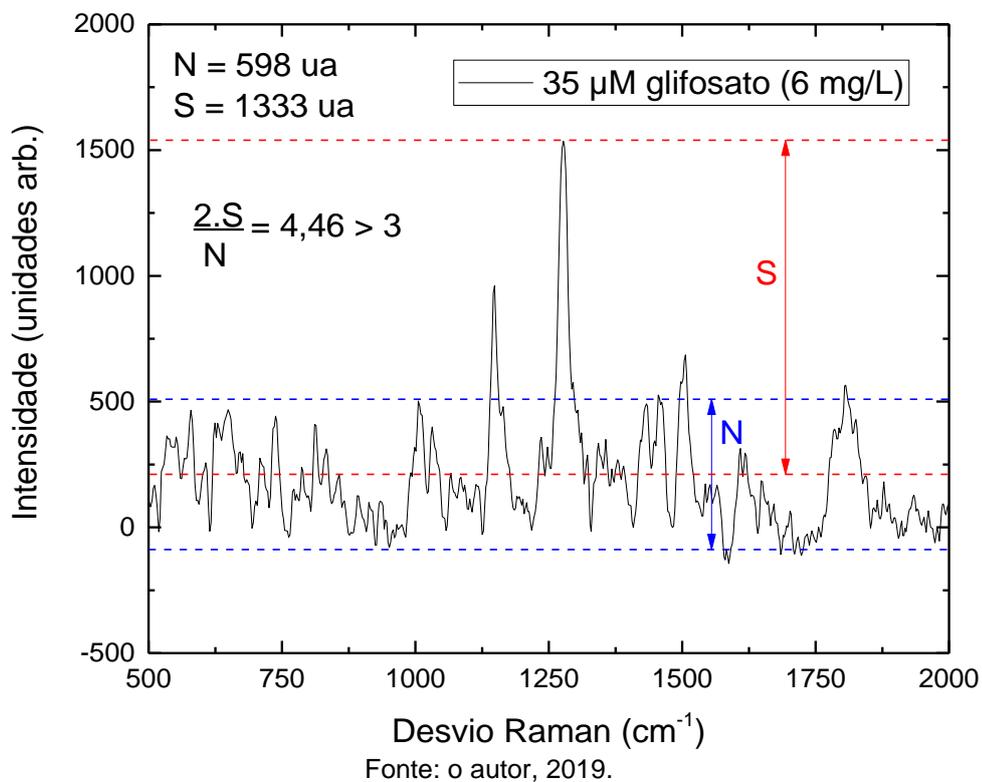
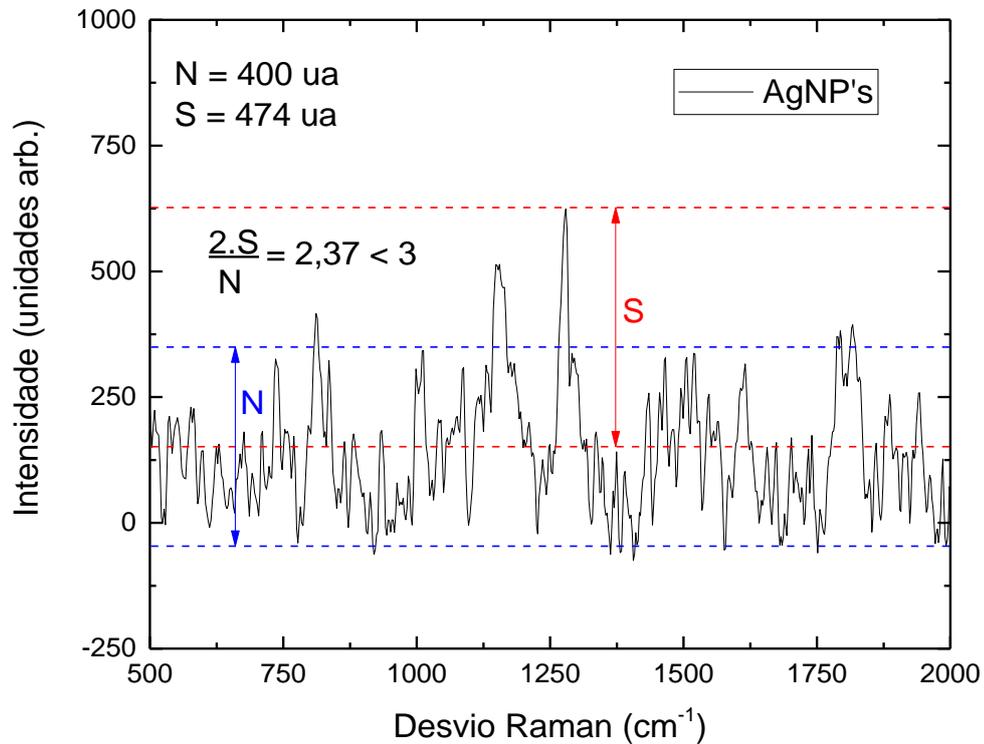


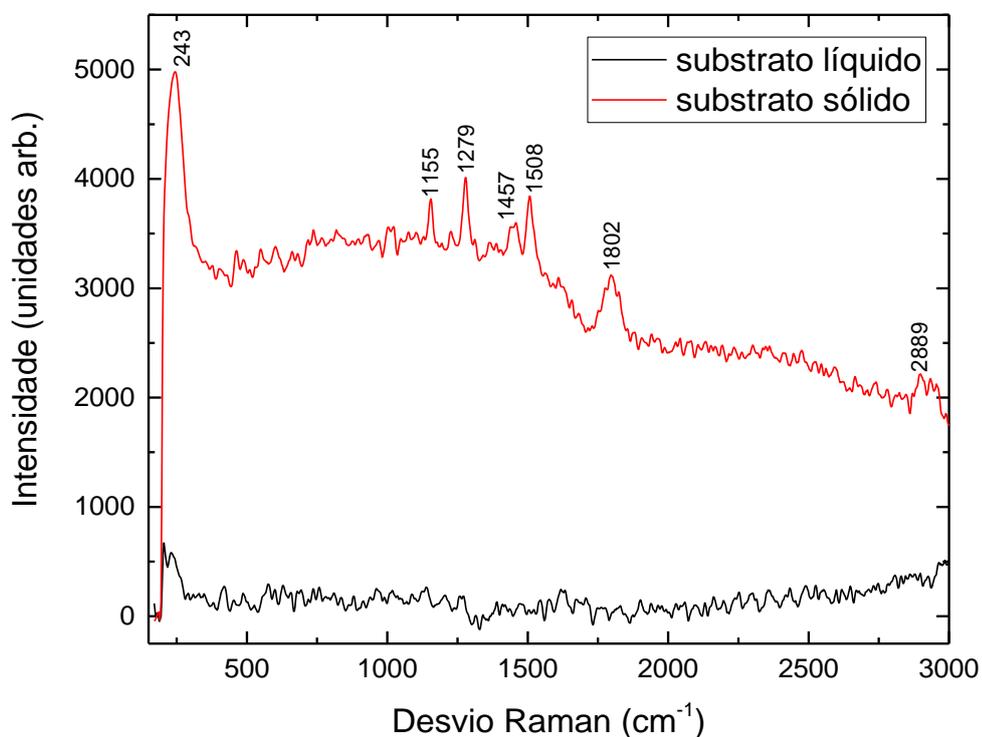
Figura 33: Cálculo do limite de detecção e espectro SERS em substrato sólido da solução coloidal de apenas AgNP's (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).



Fonte: o autor, 2019.

Na Figura 34 estão os espectros SERS em substrato líquido e sólido da amostra contendo glifosato com concentração de 70 μM (12 mg/L), onde observa-se a formação de diversos picos no espectro SERS em substrato sólido, que não podem ser observados no espectro SERS em substrato líquido. Este resultado pode ser atribuído à maior sensibilidade da espectroscopia SERS em substrato sólido do que em substrato líquido, como já havia sido observado nos testes envolvendo o corante rodamina 6G.

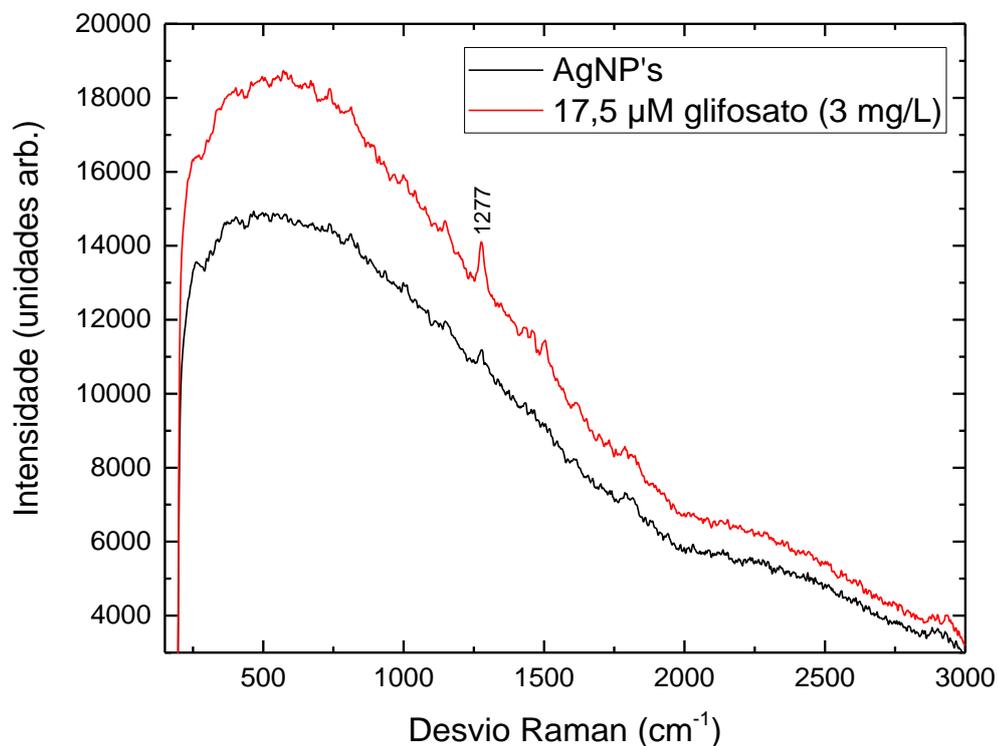
Figura 34: Espectros SERS em substrato líquido e sólido da solução coloidal de AgNP's com glifosato (Tempo de interação: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).



Fonte: o autor, 2019.

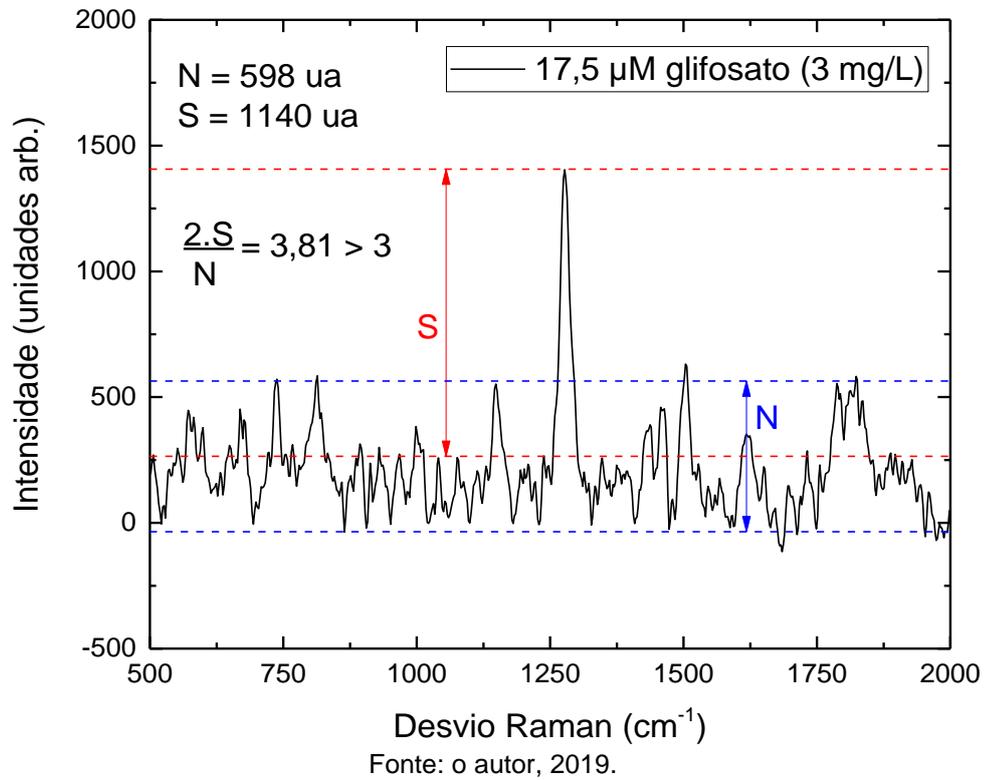
Com o objetivo de testar o limite de detecção do glifosato na técnica desenvolvida foram analisados os resultados para a menor concentração de glifosato utilizada. Na Figura 35 está representado o espectro SERS da solução apenas com AgNP's (pH 4) e o espectro SERS de uma solução de AgNP's (pH 4) e glifosato com uma concentração de 17,5 μM (3 mg/L). É possível observar que mesmo para uma menor concentração de glifosato o pico em torno de 1275 cm^{-1} está intensificado se comparado com o mesmo pico na solução apenas com nanopartículas.

Figura 35: Espectros SERS em substrato sólido da solução coloidal de apenas AgNP's e de AgNP's com glifosato 17,5 μM (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).



Para o cálculo da relação sinal/ruído foi retirada a linha de base do espectro SERS da solução com a menor concentração de glifosato utilizada (17,5 μM / 3 mg/L). A Figura 36 apresenta esse espectro e os cálculos realizados. A razão mostrada na Figura 36 precisa ser maior que 3, o que de fato ocorreu, já que o valor encontrado foi 3,8, garantindo dessa maneira que a concentração de glifosato de 17,5 μM (3 mg/L) está acima do limite de detecção para a técnica desenvolvida.

Figura 36: Cálculo do limite de detecção e espectro SERS em substrato sólido da solução coloidal de AgNP's com glifosato 17,5 μM (Tempo de integração: 20000 ms. Médias: 5. Objetiva: 10x).



4 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

4.1 CONCLUSÕES

A fim de desenvolver uma metodologia eficiente para a espectroscopia SERS em substrato sólido foram testadas as influências de vários parâmetros ao longo do processo para se obter um processo otimizado. Primeiramente foram testados os dois lados da membrana filtrante e concluiu-se que o lado liso seria mais adequado para a utilização. Após isso, foram testadas 3 objetivas de magnificação diferentes (4x, 10x, 40x) e concluiu-se que a objetiva de 10x atenderia melhor à realização dos testes. Em seguida foi testado um novo método para secagem, utilizando uma estufa, que passou a ser utilizado para todos os testes realizados. Também foi testado o tempo de integração a ser utilizado e concluiu-se que um tempo de 3000 ms seria o mais adequado. Na continuidade foi testada a influência do pH da solução coloidal de AgNP's e foi observado que para o pH 4 ocorrem as maiores amplitudes de sinal Raman. E por fim foi testada a influência da quantidade de analito, onde foi possível perceber que a não uniformidade das gotas analisadas pode afetar o resultado da espectroscopia SERS.

Os resultados da espectroscopia SERS em substrato sólido da rodamina 6G, utilizando a metodologia desenvolvida durante o trabalho, mostraram uma intensificação das amplitudes dos picos característicos do analito se comparados com os resultados em substrato líquido, para uma mesma amostra.

A Tabela 1 apresenta os valores quantitativos das melhorias que foram alcançadas durante o desenvolvimento do trabalho para cada teste realizado, estando em negrito a característica escolhida como mais adequada.

Tabela 1: Melhorias alcançadas durante o desenvolvimento do trabalho.

TESTE	MELHORIA
Substrato (sólido x líquido)	15x
Membrana filtrante (lado liso x rugoso)	2,8x
Objetivas (4x, 10x e 40x)	7,4x
Processo de secagem (estufa x natural)	2,4x
Influência do pH (2, 4 , 7, 10, 12)	1,75x

Fonte: o autor, 2019.

Para o herbicida glifosato, a técnica desenvolvida para a espectroscopia SERS em substrato sólido foi capaz de detectá-lo, o que não acontecia para os testes feitos em substrato líquido. Além disso, através dos cálculos das relações sinal/ruído foi possível concluir que as concentrações analisadas com a técnica desenvolvida estavam acima do limite de detecção para as amostras testadas, tanto de glifosato, com uma relação sinal/ruído de 3,8 para 3 mg/L, quanto de rodamina 6G, com uma relação sinal/ruído de 11,2 para 2,1 µg/L.

4.2 CONTINUIDADE DO TRABALHO

Considerando os resultados apresentados nessa dissertação a respeito do desenvolvimento de um substrato sólido para a realização da espectroscopia SERS, novas análises e testes serão feitos, a fim de aumentar a eficiência da técnica desenvolvida, para que no futuro essa técnica possa ser utilizada para o sensoriamento de contaminantes em água.

O processo de ablação das nanopartículas também continuará a ser estudado, com o objetivo de evoluir o procedimento, garantindo uma maior reprodutibilidade e eficiência, para que assim possa existir uma intensificação SERS ainda maior para as amostras testadas.

Além disso, novos analitos poderão ser utilizados, além do corante rodamina 6G e do herbicida glifosato, a fim de aumentar as possibilidades de utilização da técnica desenvolvida nessa dissertação.

REFERÊNCIAS

- ABAKERLI, R. B.; FAY, E. F. **Validação de método para análise de N-(fosfonometil) glicina (glifosato) e ácido aminometilfosfônico (AMPA) por HPLC e detecção por fluorescência em culturas.** Jaguariúna: Congresso Virtual Iberoamericano Sobre Gestión de Calidad en Laboratorios, 2003. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/15121/1/artcongressA64.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2019.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v. 25, n. 4, p. 589-893, 2002.
- BARBOZA, H. T. G. *et al.* Compostos Organofosforados e seu Papel na Agricultura. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, p. 172-193, 2018.
- BARRIGOSI, J. A. F. **Uso de agrotóxicos.** AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html>. Acesso em: 4 fev. 2019.
- BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia.** São Paulo: FFLCH – USP, 2017.
- CABRAL, L. **Glifosato: herbicida muito utilizado pode causar doenças fatais.** Disponível em: <https://www.ecycle.com.br/6070-glifosato.html>. Acesso em: 29 jan. 2019.
- CABRAL, L. **Organofosforados: o que são, sintomas de intoxicação, impactos e alternativas.** Disponível em: <https://www.ecycle.com.br/6021-organofosforados>. Acesso em: 4 fev. 2019.
- CARDINALI, V. C. B. *et al.* Shikimate accumulation, glyphosate absorption and translocation in horseweed biotypes. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 109-118, 2015.
- CARDOSO, S. F. **Avaliação de Eichhornia crassipes como fonte de ácido chiquímico.** Dissertação. Araraquara: Farmácia e Bioquímica – UEP, 2013.
- CARNEIRO, F. F. *et al.* **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro/São Paulo: Expressão Popular, 2015.
- CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environmental Science & Policy**, v. 9, n. 7-8, p.685-692, 2003.
- CAVALCANTE, E. **Síntese e propriedades ópticas de sistemas coloidais contendo nanopartículas de ouro dispersas em óleo de mamona.** Dissertação. Maceió: Programade Pós-graduação em Química e Biotecnologia - Universidade Federal de Alagoas, 2009.

CHALUNBINSKI, M.; KOWALSKI, M. L. Endocrine disrupters-potencial modulators of the immune system and allergic response. **Allergy**, v. 61, n. 11, p. 1326-1335, 2006.

COCKER, J. et al. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. **Toxicology Letters**, vol. 134, n. 1-3, p. 97-103, ago. 2002.

COLINA, L. P. *et al.* **El sistema de aspersiones aéreas del Plan Colombia y sus impactos sobre el ecosistema y la salud en la frontera ecuatoriana**. Comisión Científica Ecuatoriana, 2007.

CONAMA. **Resolução 357/2005**. Disponível em: <http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLU%C3%87%C3%83O%20CONAMA%20n%C2%BA%20357.pdf> . Acesso em: 1 fev. 2019.

COSTA, C. **Na contramão de Europa e EUA, Brasil caminha para liberar mais agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.bbc.com/portuguese/brasil-44621328>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

COSTA, D. **Uso de agrotóxicos aumenta em 21% em 11 anos no Brasil**. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/economia/uso-de-agrotoxicos-aumenta-21-em-11-anos-no-brasil-22919307>. Acesso em: 28 jan. 2019.

COSTA, J. C. S. *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy studies of organophosphorous model molecules and pesticides. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 45, p. 15645-15651, 2012.

COSTA, L. C. S. **Sintonização de ressonâncias plasmônicas de nanoestruturas de prata para detecção espectroscópica de glifosato em água**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial - UTFPR, 2019.

COUTINHO, C. F. B., MAZO, L. H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**. v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.

CURWIN, B. *et al.*, Pesticide use and practices in a Iowa farm Family pesticide exposure study. **Journal of Agricultural Safety and Healthy**, v. 8, n. 4, p. 423-433, 2002.

DESCHAINES, T. O., WIEBOLDT, D. Practical Applications of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). **Thermo Fisher Scientific**. Technical Note 51874, 2005.

FARIA, D. L. A., SANTOS, L. G. C., GONÇALVES, N. S. Uma Demonstração Sobre o Espalhamento Inelástico de Luz: Repetindo o Experimento de Raman, **Química Nova**, v.20, n.3, p.319-323, 1997.

FILHO, M. A. **O perigo dos emergentes**. Disponível em: <https://www.unicamp.br/unicamp/ju/623/o-perigo-dos-emergentes>. Acesso em: 08 nov 2019.

G1. **Agrotóxicos podem causar câncer aponta pesquisa.** Disponível em: <https://g1.globo.com/pr/parana/especial-publicitario/apreaa/noticia/agrotoxicos-podem-causar-cancer-apontam-pesquisas.ghtml>. Acesso em: 28 jan. 2019.

GASNIER, C. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.

GHISELLI, G; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, vol. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GÓES, R. E. **Detecção de glifosato em água por reconhecimento de padrões em espectroscopia assistida por nanopartículas de prata fabricadas por ablação a laser.** Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial - UTFPR, 2018.

HOLLAS, J. M. **Modern Spectroscopy.** 4 ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Inc., 2004.

IBAMA. **Agrotóxicos.** Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos>. Acesso em: 28 jan. 2019.

IBGE. **Censo Agro 2017.** Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/estabelecimentos.html. Acesso em: 28 jan. 2019.

INMETRO. **Determinação de Glifosato por Cromatografia Iônica - IOP-A 5.007.** CRL 0309. ABNT NBR ISO/IEC 17025, 2013b.

INMETRO. **Determinação do ingrediente ativo glifosato por HPLC - PMGL 035.** CRL 0541. ABNT NBR ISO/IEC 17025, 2013a.

JAFELICCI JUNIOR, M.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides. **Química Nova na Escola**, n. 9, 1999.

JIN, R. et al. Photoinduced Conversion of Silver Nanospheres to Nanoprisms. **Science**, v. 294, p. 1901-1903, 2001.

KHROLENKO, M.V.; WIECZOREK, P.P. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. **Journal of Chromatography A**, v. 1093, n. 1-2, p. 111-117, 2005.

KIM, M. *et al.* A simplified approach to the determination of n-nitroso glyphosate in technical glyphosate using HPLC with post-derivatization and colorimetric detection. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1054–1058, 2007.

KNEIPP, K. *et al.* Approach to single-molecule detection using Surface-Enhanced Resonance Raman-Scattering (SERS) - A study using rhodamine 6G on colloidal silver. **Applied Spectroscopy**, v. 49, n. 6, p. 780–784, 1995.

LANGILLE, M. R., PERSONICK, M. L., MIRKIN, C. A. Plasmon-Mediated Syntheses of metallic nanostructures. **Angewandte Chemie**, v.52, p. 13910-13940. 2013.

LING, X. *et al.* Can graphene be used as a substrate for Raman enhancement? **Nano Letters**, v. 10, n. 2, p. 553–61, 2010.

MACHADO, R.; OLIVEIRA, M. **Comissão especial aprova parecer que muda legislação brasileira sobre agrotóxicos**. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/AGROPECUARIA/559559-COMISSAO-ESPECIAL-APROVA-PARECER-QUE-MUDA-LEGISLACAO-BRASILEIRA-SOBRE-AGROTOXICOS.html>. Acesso em: 28 jan. 2019.

MAPA. **Registro de Agrotóxicos e Afins Informações Técnicas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos>. Acesso em: 3 fev. 2019.

MARTÍNEZ, A.; REYES, I.; REYES, N. Citotoxicidad del glifosato em células mononucleares de sangue periférica humana. **Biomédica**, v. 27, n. 4, p. 594-604.

MARTÍNEZ-TORRES, P. G. *et al.* Facile Nanostructured Substrate Preparation Using Gold Nanocuboids for SERS. **Nanomaterials and Nanotechnology**, p. 5-12, 2005.

MATOS, F. S. **Determinação de glifosato e AMPA em água por injeção direta da amostra em cromatografia iônica capilar e LC-MS/MS**. Dissertação. Santa Maria: Programa de Pós-graduação em Química – UFSM, 2014.

MIE, G. Contributions to the optics of diffuse media, especially colloid metal solutions. **Annals of Physics**, v. 330, n. 3, p. 377–445, 1908.

MIRELA, D. **Metallic Nanoparticles**. 89p. Tese (doutorado) – Programme Physics of University of Nova Gorica, 2009. Disponível em: <http://www.ung.si/~sstanic%20teaching/Seminar/>. Acesso em: 02 dez. 2019.

MOSIER-BOSS, P. A. Review of SERS Substrates for Chemical Sensing. **Nanomaterial**, v. 142, n. 7, 2017.

NGUYEN, T. B. *et al.* Preparation of metal nanoparticles for surface enhanced Raman scattering by laser ablation method. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 25016, 2012.

PATEL, G. M. *et al.* Recognition of carbendazim fungicide in environmental samples by using 4-aminobenzenethiol functionalized silver nanoparticles as a colorimetric sensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 206, p. 684–691, 2015.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou remédio: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003.

PIMENTA, E. M. **Extração de glifosato e ácido aminometilfosfônico da madeira de eucalipto e quantificação por HPLC-ICP-MS/MS**. Dissertação. Montes Claros: Instituto de Ciência Agrárias – UFMG, 2016.

PIRES, N. L. **Expansão da fronteira agrícola e presença de glifosato e AMPA em amostras de água da região de Santarém (PA): Desafios analíticos para o monitoramento**. Dissertação. Brasília: UNB, 2015.

QIU, T. *et al.* Silver fractal networks for surface-enhanced Raman scattering substrates. **Applied Surface Science**, v. 254, n. 17, p. 5399–5402, 2008.

RAMAN, C. V. A ney radiation. **Indian Journal of Physics**, v.2, p. 387-398, 1928.

REVISTA GALILEU. **Líder mundial, Brasil pode ganhar mais agrotóxicos na comida**. Disponível em: <https://revistagalileu.globo.com/Ciencia/Meio-Ambiente/noticia/2018/05/lider-mundial-brasil-pode-ganhar-mais-agrotoxicos-na-comida.html>. Acesso em: 28 jan. 2019.

RODRIGUES, A. G., GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, p. 4309, 2012.

ROHIT, J. V.; SINGHAL, R. K.; KAILASA, S. K. Dithiocarbamate-calix[4]arene functionalized gold nanoparticles as a selective and sensitive colorimetric probe for assay of metsulfuron-methyl herbicide via non-covalent interactions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 237, p. 1044–1055, 2016.

ROSSI, M. **O “alarmante” uso de agrotóxicos no Brasil atinge 70% dos alimentos**. Disponível em: https://brasil.elpais.com/brasil/2015/04/29/politica/1430321822_851653.html. Acesso em: 28 jan. 2019.

SESP. **Protocolo de avaliação das intoxicações crônicas por agrotóxicos**. Curitiba: Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, 2013. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CEST/Protocolo_AvaliacaoIntoxicacaoAgrotoxicos.pdf. Acesso em: 5 jan. 2019.

SHARMA, H. S. S.; CARMICHAEL, E.; MCCALL, D. Fabrication of SERS substrate for the detection of rhodamine 6G, glyphosate, melamine and salicylic acid. **Vibrational Spectroscopy**, v. 83, p. 159-169, 2016.

SHRIVASTAVA, A., GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 1, 2011.

SILVA, B. M. **Desenvolvimento de metodologia simples, rápida e sem etapa de clean-up para determinação de glifosato em amostras ambientais de água e solo por HPLC/UV-Vis.** Dissertação. São Carlos: Química Analítica - USP, 2009.

SILVA, D. **Poluição da água.** Disponível em: <https://www.estudokids.com.br/poluicao-da-agua/>. Acesso em: 08 nov 2019.

SILVA, S. M. P. **Brasil lidera ranking mundial de uso de agrotóxicos.** Disponível em: <http://www.dm.com.br/cotidiano/2018/07/brasil-lidera-o-ranking-mundial-de-uso-de-agrotoxicos.html>. Acesso em: 28 jan. 2019.

SINAN. **Intoxicações 2007 a 2014.** Disponível em: http://dados.contraosagrotoxicos.org/pt_PT/dataset/intoxicacoes-sinan/resource/95a0423b-2ac4-4cf5-8b6f-3f16b55dc709. Acesso em: 28 jan. 2019.

SLAGER, R. E. Rhinitis associated with pesticide use among private pesticide in the agricultural health study. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 73, n.20, p. 1382-1393, 2010.

SOLÉ, J. G.; BAUSÁ, L. E.; JAQUE, D. **An Introduction to the Optical Spectroscopy of Inorganic Solids.** West Sussex: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

SOUZA, A.; CAMPOREZ, P. **Intoxicação por agrotóxico dobra em dez anos e alimenta debate sobre incentivos fiscais.** Disponível em: <https://oglobo.globo.com/sociedade/sustentabilidade/intoxicacao-por-agrotoxico-dobra-em-dez-anos-alimenta-debate-sobre-incentivos-fiscais-22342566>. Acesso em: 28 jan. 2019.

STROBBIA, P.; LANGUIRAND, E.; CULLUM, B. M. Recent advances in plasmonic nanostructures for sensing: a review. **Optical Engineering**, v. 54, n. 10, p. 100902, 2015.

TORDIN, C. **Contaminantes emergentes podem ser uma ameaça na água para consumo humano.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/32796742/contaminantes-emergentes-podem-ser-uma-ameaca-na-agua-para-consumo-humano>. Acesso em: 08 nov 2019.

TSUJI, T., TSUJI, M., HASHIMOTO, S. Utilization of laser ablation in aqueous solution for observation of photoinduced shape conversion of silver nanoparticles in citrate solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry – Elsevier**, v. 221, p. 224– 231, 2011.

VILELA, D.; GONZÁLEZ, M. C.; ESCARPA, A. Sensing colorimetric approaches based on gold and silver nanoparticles aggregation: Chemical creativity behind the assay. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 751, p.24–43, 2012.

WEI, H.; ABTAHI, S.M.H.; VIKESLAND, P.J. Plasmonic colorimetric and SERS sensors for environmental analysis. **Environmental Science Nano**, v. 2, p. 120–135, 2015.

APÊNDICE A - PUBLICAÇÃO RESULTANTE DESSE TRABALHO

TRABALHO EM ANAIS DE EVENTO

HORNUNG, F.; MULLER, M.; FABRIS, J. L. **Development of a solid substrate for surface enhanced Raman spectroscopy**. LAWOFs 2019 - Second Latin American Workshop on Optical Fiber Sensors, 2019, Rio de Janeiro. Proceedings of Second Latin American Workshop on Optical Fiber Sensors. São Caetano do Sul: SBMO - Sociedade Brasileira de Microondas e Optoeletrônica, 2019. v. 1. p. 22-26.