

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

LAYS DE CARVALHO SEIXAS COSTA

**SINTONIZAÇÃO DE RESSONÂNCIAS PLASMÔNICAS DE NANOESTRUTURAS
DE PRATA PARA DETECÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE GLIFOSATO EM ÁGUA**

DISSERTAÇÃO

CURITIBA

2019

LAYS DE CARVALHO SEIXAS COSTA

**SINTONIZAÇÃO DE RESSONÂNCIAS PLASMÔNICAS DE NANOESTRUTURAS
DE PRATA PARA DETECÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE GLIFOSATO EM ÁGUA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito 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

Costa, Lays de Carvalho Seixas

Sintonização de ressonâncias plasmônicas de nanoestruturas de prata para detecção espectroscópica de glifosato em água [recurso eletrônico] / Lays de Carvalho Seixas Costa.-- 2019.

1 arquivo texto (132 f.) : PDF ; 7,66 MB

Modo de acesso: World Wide Web

Título extraído da tela de título (visualizado em 16 maio 2019)

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Curitiba, 2019

Bibliografia: f. 115-124

1. Engenharia elétrica - Dissertações. 2. Herbicidas - Detecção. 3. Pesticidas - Detecção. 4. Água - Teor de pesticidas - Identificação. 5. Pesticidas - Aspectos ambientais. 6. Pesticidas - Toxicologia. 7. Espectroscopia óptica. 8. Raman, Espectroscopia de. 9. Análise espectral. 10. Glifosato. 11. Água - Qualidade. 12. Controle de qualidade da água. I. Fabris, José Luís. II. Muller, Márcia. 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 da UTFPR, Câmpus Curitiba
Bibliotecário: Adriano Lopes CRB-9/1429

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 826

A Dissertação de Mestrado intitulada **"Sintonização de Ressonâncias Plasmônicas de Nanoestruturas de Prata Para Detecção Espectroscópica de Glifosato em Água"** defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) Lays de Carvalho Seixas Costa, no dia **26 de abril de 2019**, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Fotônica em Engenharia, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial.

BANCA EXAMINADORA:

Prof(a). Dr(a). José Luís Fabris - Presidente – (UTFPR)

Prof(a). Dr(a). Neoli Lucyszyn - (PUC-PR)

Prof(a). Dr(a). Hypolito José Kalinowski - (UFF)

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, 26 de abril de 2019.

Aos meus pais, minha esposa, familiares, amigos e orientadores.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais Erli e Carlos, minha esposa Drielen, minha avó Lucimar e minha irmã Thays. São minha fortaleza e meu amor maior. Agradeço por todo o apoio e compreensão no período de desenvolvimento desta dissertação. Agradeço principalmente pela dedicação, cuidado e amor que recebi no momento mais difícil de minha vida.

Aos meus amigos e colegas da UTFPR: Natália (Big Giro), Robinho, Aninha Carla, Felipe, Victor, Tay, Guido e Dani. Por todos os momentos, pesquisas, matérias, risadas e até choros que vivemos juntos.

Às minhas amigas e companheiras de vida Inaê e Karise. Por tornarem a vida mais leve e dissolverem meus problemas com um sorriso.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

À UTFPR-Curitiba pelo espaço e equipamentos. Às professoras Neoli e Marcela pela disponibilidade e abertura de portas para meu crescimento como pesquisadora. Ao CPGEI, agradeço imensamente aos docentes pelas disciplinas ministradas e todo o conhecimento que adquiri durante esse período. Ao Centro de Microscopia da UFPR.

Ao meu orientador José Luís Fabris e à co-orientadora Marcia Müller, por tudo o que aprendi nesse período, todo o apoio, disponibilidade e orientação que recebi. Sem dúvidas tive um crescimento pessoal e profissional que é resultado de todos os seus ensinamentos.

À Deus, pela finalização desse projeto e por colocar em meu caminho todas as pessoas aqui listadas.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

COSTA, Lays. SINTONIZAÇÃO DE RESSONÂNCIAS PLASMÔNICAS DE NANOESTRUTURAS DE PRATA PARA DETECÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE GLIFOSATO EM ÁGUA. 134f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2019.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de uma metodologia capaz de detectar o herbicida glifosato em água utilizando técnicas de espectroscopia ótica ultravioleta-visível e Raman. O corante rodamina foi utilizado como molécula de prova para testes preliminares, com o objetivo do desenvolvimento de uma metodologia de ablação a laser e de conversão de formato fotoinduzida, capaz de sintetizar nanopartículas com diferentes geometrias e dimensões. Tais nanopartículas apresentaram diferentes ressonâncias plasmônicas e, quando sintonizadas com o comprimento de onda para bombeamento do laser utilizado nas interrogações Raman, evidenciam uma otimização na intensificação do campo eletromagnético. Posteriormente o corante foi substituído pelo herbicida glifosato e os resultados mostram que com a utilização de nanoestruturas esféricas é possível identificar apenas uma banda na região de 1806 cm^{-1} do espectro Raman com intensificação de superfície, com uma relação sinal/ruído de 5,70 para a menor concentração utilizada nos testes de 0,11 mg/L de glifosato em solução. Para as nanoestruturas de prata triangulares e hexagonais, resultado do processo de fotoconversão, o espectro mostrou-se distinto, com três novas bandas em 725 , 935 e 1375 cm^{-1} , regiões de assinatura do herbicida, e uma maior relação sinal/ruído de 10,02 para a mesma concentração de glifosato. Tais resultados foram atribuídos à sintonização das ressonâncias plasmônicas e à concentração dos campos eletromagnéticos nas bordas afiadas de tais estruturas.

Palavras-chave: Espectroscopia ótica, agrotóxicos, glifosato, qualidade da água, nanotecnologia.

ABSTRACT

COSTA, Lays. TUNING OF PLASMONIC RESONANCES OF SILVER NANOESTRUTURES FOR SPECTROSCOPIC DETECTION OF GLYPHOSATE IN WATER. 134f. Master Thesis – Postgraduate Program in Electrical Engineering, Federal University of Technology - Paraná. Curitiba, 2019.

This work presents the development of a methodology able to detect the herbicide glyphosate in water using UV-Vis and Raman optical spectroscopy techniques. Rhodamine dye was used as probe molecule for preliminary testes, with the objective of developing a laser ablation and photo-induced shape conversion methodology capable of synthesizing nanoparticles with different geometries and dimensions. These nanoparticles presented different plasmon resonances and, when tuned to the laser pumping wavelength used in the Raman interrogations, show an optimization in the intensification of the electromagnetic field. Subsequently the dye was replaced by the herbicide glyphosate and the results show that with the use of spherical nanostructures it is possible to identify only one band in the 1806 cm^{-1} region of the surface enhanced Raman spectrum, with a signal-to-noise ratio of 5.70 for the lowest concentration used in the tests of 0.11 mg / L of glyphosate in solution. For the triangular and hexagonal silver nanostructures resulting from the photoconversion process, the spectrum was distinct with three new bands at 725 , 935 and 1375 cm^{-1} , herbicide's fingerprint regions, and a higher signal-to-noise ratio of 10.02 for the same glyphosate concentration. Such results were attributed to the tuning of the plasmon resonances and to the concentration of electromagnetic fields at the sharp edges of such structures.

Keywords: Optic spectroscopy, glyphosate, colloids, nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fórmula estrutural geral da molécula de compostos classificados como organofosforados	23
FIGURA 2 - Esquema de comportamento do glifosato em diferentes pHs	35
FIGURA 3 - Etapas da LAL de alvo sólido.	37
FIGURA 4 - Taça de Licurgo iluminada externa e internamente	39
FIGURA 5 - Coloração da solução coloidal de nanopartículas de prata em função do comprimento de onda da banda <i>LSPR</i>	40
FIGURA 6 - Nanopartículas em solução com citrato de sódio	42
FIGURA 7 - Evolução do formato de nanopartículas de prata durante o processo de fotoconversão.....	43
FIGURA 8 - Vibrações eletrônicas dipolo e quadrupolo de nanoprismas.....	44
FIGURA 9 - Fenômenos de interação da radiação incidente I_0 com a matéria.	45
FIGURA 10 - Processos de espalhamento da luz.....	46
FIGURA 11 - Ressonância de plasmon de superfície	49
FIGURA 12 - Exemplo do cálculo do <i>LOD</i>	50
FIGURA 13 - Estrutura geral dos xantenos.....	51
FIGURA 14 - Exemplos de moléculas da família de corantes rodamina.....	52
FIGURA 15 - Espectros de emissão combinados e esquema de irradiação de luz para fotoconversão.....	54
FIGURA 16 - Equipamentos utilizados para análises.....	55
FIGURA 17 - Montagem experimental para ablação a laser	56
FIGURA 18 - Diagrama de análises para definição da metodologia de LAL	57
FIGURA 19 - Espectros de extinção de Ag NPs sintetizadas com diferentes energias de pulso	58
FIGURA 20 - Espectros de extinção de Ag NPs sintetizadas com diferentes taxas de repetição.	59
FIGURA 21 - Espectros de extinção de Ag NPs sintetizadas com diferentes tempos de LAL.....	60
FIGURA 22 - Espectros de extinção de Ag NPs sintetizadas com diferentes temperaturas durante a LAL.....	61
FIGURA 23 - Espectros de extinção da solução com variação da concentração de citrato de sódio e peróxido de hidrogênio durante a fotoconversão ...	64
FIGURA 24 - Espectro de extinção e imagem da solução com diferentes alíquotas de peróxido de hidrogênio durante a fotoconversão.	65

FIGURA 25 - Espectros de extinção da solução com diferentes concentrações de citrato de sódio durante a fotoconversão.	67
FIGURA 26 - Diagrama de análises realizadas para definição da metodologia de fotoconversão.....	68
FIGURA 27 - Espectros de extinção das soluções contendo 0,6 mM, 0,3 mM, 0,1mM de citrato de sódio.....	69
FIGURA 28 - Espectros <i>SERS</i> e Raman de 100 μ L de R6G em 2,5 mL de solução	70
FIGURA 29 - Espectros de extinção e imagens das soluções testes para a concentração de citrato de sódio	71
FIGURA 30 - Espectros Raman das soluções contendo 100 μ L de R6G antes e após o período de 24 horas de <i>PISC</i>	73
FIGURA 31 - Espectros das soluções contendo 100 μ L de glifosato em diferentes condições de pH	76
FIGURA 32 - Comparação da coloração da solução de Ag NPs + glifosato em diferentes pH.....	77
FIGURA 33 - Determinação da área da banda de plasmon das Ag NPs	78
FIGURA 34 - Diagrama de análises para testes com o herbicida glifosato	80
FIGURA 35 - Imagens por microscopia eletrônica de transmissão da solução de nanopartículas de prata após ablação.	81
FIGURA 36 - Contagem e diâmetro das partículas esféricas em solução após a <i>LAL</i>	82
FIGURA 37 - Espectros de extinção e imagens de nanopartículas esféricas na presença de glifosato	83
FIGURA 38 - Espectros de extinção decompostos em gaussianas de solução de Ag NPs esféricas com diferentes concentrações de glifosato	84
FIGURA 39 - Comportamento das bandas de plasmon para cada concentração de glifosato adicionada	86
FIGURA 40 - Espectros Raman da solução contendo nanopartículas esféricas na presença de glifosato	87
FIGURA 41 - Amplitude relativa da banda em 1806 cm^{-1} para cada concentração de glifosato adicionada	88
FIGURA 42 - Imagens por microscopia eletrônica de transmissão da solução de nanopartículas de prata após fotoconversão (amostra B).....	89
FIGURA 43 - Contagem e diâmetro das partículas esféricas em solução após a fotoconversão.....	90
FIGURA 44 - Espectros de extinção da amostra sem fotoconversão (A) e da amostra após a fotoconversão (B).	91

FIGURA 45 - Imagens por microscopia eletrônica de transmissão da solução de nanopartículas de prata após fotoconversão com posterior adição de glifosato.....	93
FIGURA 46 - Espectro de extinção de Ag NPs após <i>PISC</i> e na presença de glifosato	94
FIGURA 47 - Espectros de extinção decompostos em gaussianas de solução de Ag NPs após <i>PISC</i> com a adição posterior de diferentes concentrações de glifosato.....	95
FIGURA 48 - Amplitude e deslocamento da gaussiana 3 para cada concentração de glifosato adicionada	97
FIGURA 48 - Espectros <i>SERS</i> da solução contendo nanoestruturas de prata na presença de glifosato	97
FIGURA 49 - Amplitude relativa das bandas <i>SERS</i> para cada concentração de glifosato adicionada	98
FIGURA 51 - Espectro de extinção de NPs após ablação e com diferentes concentrações de glifosato	100
FIGURA 52 - Espectros de extinção em gaussianas para diferentes concentrações de glifosato.....	101
FIGURA 53 - Curvas ajustadas do comportamento da gaussiana 3 em função de diferentes concentrações de glifosato em solução.....	104
FIGURA 54 - Espectros <i>SERS</i> e curva de calibração das soluções contendo nanoesferas de prata na presença de glifosato	105
FIGURA 55 - Espectro de extinção das NPs após ablação e com concentrações menores de glifosato	107
FIGURA 56 - Espectros <i>SERS</i> das NPs após a ablação com a posterior adição de concentrações menores de glifosato.....	108
FIGURA 57 - Espectro de extinção e imagens das cubetas após o processo de fotoconversão e com a adição posterior de diferentes alíquotas de glifosato.....	109
FIGURA 58 - Curvas ajustadas do comportamento da banda de plasmon associada à interação das Ag NPs após a <i>PISC</i> com adição posterior de diferentes concentrações de glifosato em solução	110
FIGURA 59 - Espectros <i>SERS</i> das soluções contendo nanopartículas após fotoconversão com adição posterior de glifosato	111
FIGURA 60 - Curvas logísticas ajustadas para as amplitudes relativas das bandas nas regiões de 725, 935 e 1375 cm^{-1} do espectro <i>SERS</i>	111
FIGURA 61 - Espectro de extinção de nanopartículas após a fotoconversão com adição posterior de concentrações menores de glifosato	113
FIGURA 62 - Espectros <i>SERS</i> das soluções contendo Ag NPs (após a <i>PISC</i>) em solução com concentrações menores de glifosato.....	113

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL_{50}	21
TABELA 2 - Sintomas agudos e crônicos por grupos de agrotóxicos.....	22
TABELA 3 - Nanotecnologia e suas aplicações em áreas de estudo.....	29
TABELA 4 - Métodos químicos e métodos físicos de obtenção de nanopartículas...	30
TABELA 5 - Parâmetros testados para definição de metodologia de LAL.....	57
TABELA 6 - Parâmetros definidos após a realização dos testes.....	62
TABELA 7 - Comparação entre os valores de intensidade da banda em 1517 cm^{-1} para diferentes amostras contendo $100\text{ }\mu\text{L}$ de R6G	70
TABELA 8 - Intensidade da banda na região de 1517 cm^{-1} antes e após <i>PISC</i>	74
TABELA 9 - Amplitude das gaussianas para as diferentes concentrações de glifosato em solução.	85
TABELA 10 - Comparação da área e amplitude das gaussianas antes e após o processo de <i>PISC</i>	92
TABELA 11 - Relações entre a intensidade do sinal e do ruído para a amostra de $3,2\text{ mg/L}$	112
TABELA 12 - Relações das intensidades sinal/ruído para a amostra de $0,11\text{ mg/L}$	114

LISTA DE SIGLAS

Ag NPs	Nanopartículas de prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DL ₅₀	Dose Média Letal
FWHM	Full Width at Half Maximum - largura total a meia altura
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> – Agência internacional de pesquisa do câncer
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LED	<i>Light Emitting Diode</i> – Diodo emissor de luz
LOD	<i>Limit of detection</i> – Limite de detecção
MPF	Ministério Público Federal
NP	Nanopartícula
ONU	Organização das Nações Unidas
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>PISC</i>	<i>Photoinduced shape conversion</i> – conversão de formato por foto indução
<i>SERS</i>	<i>Surface enhanced Raman spectroscopy</i> – Espectroscopia Raman intensificada por superfície
SESP	Secretaria de Estado da Saúde do Paraná
SINAN	Sistema Nacional de Agravos Notificados
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i> – ressonância de plasmon de superfície
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

α	(alfa) probabilidade de falso positivo
β	(beta) probabilidade de falso negativo
Δ	(delta) variação
e^-	elétron
μ	micro
σ	(sigma) incerteza

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 MOTIVAÇÕES.....	17
1.2 ESTADO DA ARTE.....	19
1.2.1 Agrotóxicos.....	19
1.2.1.1 A presença dos agrotóxicos no meio ambiente.....	19
1.2.1.2 Contexto histórico de preocupações acerca do meio ambiente e da utilização de agrotóxicos.....	20
1.2.1.3 Toxicidade e danos causados por agrotóxicos.....	21
1.2.2 Os organofosforados: história, composição e toxicidade	23
1.2.2.1 Herbicida glifosato.....	24
1.2.3.2 Detecção do glifosato	26
1.2.4 Nanotecnologia	28
1.2.4.1 Sistemas coloidais: nanopartículas.....	29
1.2.4.1.1 Obtenção de nanopartículas.....	30
1.2.4.1.2 Nanopartículas aplicadas no efeito SERS e na detecção do glifosato.....	31
1.2.4.1.3 Estudos de algumas propriedades e mudança de forma fotoinduzida de nanopartículas.....	32
1.3. OBJETIVOS	33
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	35
2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO GLIFOSATO	35
2.2 NANOPARTÍCULAS.....	36
2.2.1 Ablação a laser em meio líquido (LAL).....	36
2.2.2 Teoria DLVO de interações de um sistema coloidal e potencial zeta.....	37
2.2.3 Propriedades óticas de nanopartículas metálicas e teoria de Gustav Mie	38
2.2.4 Mudança de forma fotoinduzida de nanopartículas	40
2.3 TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ÓTICA	45
2.3.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis	45
2.3.2 Espectroscopia Raman	46
2.3.2.1 Efeito SERS	48
2.3.2.2 Cálculo do limite de detecção (LOD).....	49
2.4. RODAMINA	50
3 METODOLOGIA E RESULTADOS.....	51
3.1. REAGENTES	53
3.2. INSTRUMENTAÇÃO	53
3.3. SÍNTESE DE AG NPS POR ABLAÇÃO A LASER	56
3.3.1 Resultados da síntese de nanopartículas de prata por ablação a laser	57
3.3.1.1 Resultados do parâmetro energia de pulso do laser	57
3.3.1.2. Resultados do parâmetro taxa de repetição de pulso do laser.....	59
3.3.1.3 Resultados do parâmetro tempo de ablação	60
3.3.1.4 Resultados do parâmetro temperatura ambiente	61
3.4. MUDANÇA DE FORMA FOTOINDUZIDA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (PISC).....	63
3.4.1 Análise da influência de peróxido de hidrogênio	65
3.4.2 Análise da influência de citrato de sódio	66

3.4.3 Utilização de nanopartículas de prata para <i>SERS</i> do glifosato	75
3.4.3.1 Definição do pH da solução.....	75
3.4.3.2 Definição da alíquota de peróxido de hidrogênio para <i>PISC</i>	78
3.4.3.3 Metodologia de análises com o herbicida glifosato	79
3.5.1. Resultados das curvas de calibração	100
3.5.1.1 Curvas de calibração amostra sem fotoconversão.....	100
3.5.1.2 Curvas de calibração amostra após a fotoconversão.....	108
4. CONCLUSÕES	115
5. CONTINUIDADE DO TRABALHO	116
REFERÊNCIAS.....	117
APÊNDICE A – CÁLCULOS DE INCERTEZA NA CONCENTRAÇÃO DE GLIFOSATO	127
APÊNDICE B – CÁLCULOS DE LOD E INCERTEZAS NA RAZÃO DAS INTENSIDADES RAMAN	131
APÊNDICE C – CÁLCULOS DE INCERTEZA TOTAL DA ANÁLISE RAMAN.....	133
APÊNDICE D – PUBLICAÇÃO RESULTANTE DESTE TRABALHO	134

1. INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÕES

Desde 2008, o Brasil ocupa o primeiro lugar na classificação mundial de consumo de agrotóxicos, comercializando 19% do volume total de produção desses compostos (SILVA, 2018). Enquanto nos últimos dez anos o mercado mundial desse setor cresceu 93%, no Brasil, esse crescimento foi de 190% (ROSSI, 2015).

Segundo os dados mais recentes sobre intoxicações por agrotóxicos, durante os anos de 2007 e 2014 o número total dos casos registrados foi de 34.147 no Brasil, sendo 6.099 no Paraná (SINAN, 2014).

O estudo dos possíveis danos agudos e crônicos em humanos, causados pela utilização desses compostos, têm crescido na comunidade científica, assim como o levantamento dos seus efeitos sobre o ambiente. Sabe-se que o uso de agrotóxicos nas lavouras pode afetar diretamente os ambientes aquíferos, e especialmente para os agrotóxicos da classe dos organofosforados, essa contaminação pode resultar no desenvolvimento de neoplasias e problemas relacionados aos aparelhos nervoso, endócrino e reprodutor humano (CARVALHO, 2003).

O herbicida glifosato é um composto organofosforado que afeta o sistema nervoso pelo bloqueio da atividade das enzimas que regulam a ação do neurotransmissor acetilcolina e seu efeito pode ser danoso ao organismo humano (SESP, 2013).

Em 2014 o IBAMA divulgou o crescimento das vendas desse herbicida e, segundo o boletim, em 2009 o volume total comercializado foi de 118.485 ton. e em 2014 o volume foi de 194.878 ton. ou seja, um crescimento de 64% durante um período de 6 anos.

Para Carneiro et al. (2015), os danos causados por essa classe de agrotóxico tornam necessária a monitoração de sua presença em águas, solos, ar e alimentos.

A detecção da presença do glifosato em água é verificada por órgãos públicos por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), seguindo a CRL 0541 (INMETRO, 2013a) com um limite de detecção de 0,2 µg/L. Entretanto, a molécula do herbicida possui propriedades que dificultam a sua determinação e, para a aplicação da técnica de cromatografia líquida, é necessária uma etapa pós-coluna

que consiste na adição de um marcador, geralmente o o-ftalaldeído (OPA) (MELO, 2018).

O problema relacionado a essa técnica é o elevado tempo das análises, denominado por Góes (2018) como “gargalo operacional”, e em virtude do número reduzido de laboratórios habilitados e do grande volume de amostras (no Paraná chegam a 100.000 por mês), as análises são realizadas semestralmente com um custo de 60 a 100 reais por amostra.

Alguns equipamentos permitem que não seja necessária a etapa pós-coluna, como por exemplo, cromatógrafo iônico (ICS), com limite de quantificação de 10 µg/L (INMETRO, 2013b). A desvantagem desse método é o alto custo do equipamento, de atualmente, cerca de R\$ 10 milhões.

Considerando os estudos acerca dos riscos à saúde humana em razão da exposição ao glifosato, torna-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia que possibilite a detecção de tal substância, diminua os custos e tempo relacionados às análises e aumente o controle qualitativo de sua presença em água.

O presente estudo propõe a utilização da técnica de espectroscopia Raman para a detecção do herbicida glifosato em água. O custo da instrumentação relacionada a essa técnica (soma dos valores do espectrômetro, fibras óticas, software, laser e lentes) é de US\$ 28.349,00, atualmente cerca de R\$108.576,76. Para cada amostra o custo é de aproximadamente R\$ 5,00 e o tempo de análise é de dois minutos.

Essa técnica possui a desvantagem de uma baixa sensibilidade, a qual pode ser solucionada com a utilização do efeito *SERS* (*Surface Enhanced Raman Scattering*). Esse efeito consiste na interação do analito com uma nanoestrutura metálica (como nanopartículas de um metal nobre, por exemplo), potencializando o sinal Raman a partir de vibrações moleculares.

1.2 ESTADO DA ARTE

1.2.1 Agrotóxicos

De acordo com a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, agrotóxicos são, em resumo, agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, que compõem parte da produção de produtos agrícolas, com o objetivo de alterar a composição da flora ou da fauna a fim de preservá-las da ação danosa de outros organismos vivos (MAPA, 2018).

1.2.1.1 A presença dos agrotóxicos no meio ambiente

Os agrotóxicos podem ser encontrados em diferentes sítios ambientais e por períodos variados. No ar, a presença e persistência desses compostos são resultado de atividades de pulverização. No solo, a contaminação ocorre em virtude do derramamento ou do descarte inadequado, o que pode resultar na contaminação de lençóis freáticos (CARNEIRO et al., 2015).

O agrotóxico pulverizado pode ser carregado pelos ventos, promovendo a exposição de agricultores locais e de populações afastadas ao passo que os decorrentes da aplicação com aviões podem inclusive precipitar-se sobre as cidades junto com a água das chuvas (CARNEIRO et al., 2015).

Áreas nas quais não ocorreu a aplicação direta também são atingidas por volatilização dos compostos e pela formação de poeira do solo contaminado (ROCH; COOPER, 1991).

São inúmeras as interações dos agrotóxicos com o meio ambiente, as principais são: adsorção, absorção, retenção, biodegradação, degradação físico-química, dissolução, precipitação, lixiviação, escoamento superficial, volatilização e sorção (GHISELLI, JARDIM, 2007).

O desequilíbrio ecológico decorrente do uso de agrotóxicos ocasiona problemas à própria agricultura, agravando a proliferação de pragas e doenças, com consequente maior uso de produtos e/ou de substâncias com maior toxicidade (PASCHOAL, 1979).

1.2.1.2 Contexto histórico de preocupações acerca do meio ambiente e da utilização de agrotóxicos

Após a Segunda Guerra Mundial, a era nuclear fez surgir preocupações acerca de um novo tipo de poluição por radiação, porém a proteção contra os impactos químicos do crescimento industrial não fazia parte das prioridades internacionais (CETESB, 2012).

Em 1940, Minamata - Japão, a empresa de produtos químicos Chisso começou a usar mercúrio para fabricar cloreto de vinila e acetaldeído e os resíduos gerados pela produção eram descartados em um rio. Em 1956, surgiu a primeira de 887 vítimas fatais contaminadas por mercúrio, uma criança de 5 anos. Somente em 1970 a empresa interrompeu o uso do poluente e em 1973, pela primeira vez na história, uma empresa era oficialmente responsabilizada por um desastre ambiental e o processo de despoluição da baía ainda duraria 14 anos (O GLOBO, 2013).

Os temores com o meio ambiente ganharam novo impulso em 1962, quando a cientista Rachel Carson publicou o livro “Primavera Silenciosa”, no qual fez um alerta agudo e profundo sobre o uso agrícola de pesticidas químicos sintéticos, mostrando a complexidade e a delicadeza dos danos causados pelo uso de agrotóxicos, os impactos do crescimento dos sistemas capitalistas e destacando a necessidade de respeitar o ecossistema para proteção da saúde humana e do meio ambiente (CARVALHO, NODARI, NODARI, 2015).

Em 1972, resultado dessa crescente preocupação com a questão sustentável, a ONU convocou a I Conferência das Nações Unidas sobre o Ambiente Humano, em Estocolmo (Suécia). Após 12 anos da Conferência ocorreu um novo desastre, causado pelo vazamento de quarenta toneladas de gases tóxicos (isocianato de metila e hidrocianeto) usados no processo de fabricação de agrotóxicos em Bhopal, na Índia, resultando em graves contaminações ambientais, quatro mil mortes e duzentos mil casos de efeitos crônicos. Até hoje as consequências desse desastre impactam a vida de milhares de pessoas (BBC, 2014).

O desastre levou a uma nova conferência realizada no Rio de Janeiro em 1992, a Eco 92. Nessa conferência ocorreu a criação da Agenda 21, um plano de ações para o desenvolvimento sustentável, a qual trata de responsabilidades socioambientais, entre elas a redução da utilização de agrotóxicos (MMA, 2012).

Por fim, a última conferência realizada foi a Rio+20, em comemoração aos 20 anos da Eco-92, realizada no Rio de Janeiro em 2012, na qual foram discutidos os avanços nesses vinte anos e reafirmados compromissos, com atenção especial às mudanças climáticas e ao mercado de carbono (ONU, 2012).

1.2.1.3 Toxicidade e danos causados por agrotóxicos

O estudo dos possíveis danos agudos e crônicos em humanos, causados pela utilização de agrotóxicos, têm crescido na comunidade científica, assim como o levantamento dos seus efeitos sobre o ambiente. Sabe-se que o uso de agrotóxicos nas lavouras pode afetar diretamente os ambientes aquíferos, o que pode resultar no desenvolvimento de neoplasias e problemas relacionados aos aparelhos nervoso, endócrino e reprodutor humano (CARVALHO, 2003).

A toxicidade da maioria dos agrotóxicos é expressa em valores referentes à Dose Média Letal (DL_{50}), a qual indica, em miligramas do ingrediente ativo do produto por quilograma de peso vivo, a quantidade letal para 50% da população de cobaias. A DL_{50} é utilizada para estabelecer as medidas de segurança visando a redução dos riscos do produto à saúde humana (EMBRAPA, 2012).

Os agrotóxicos são divididos por classes e suas classificações estão relacionadas na tabela 1.

Tabela 1 – Classes toxicológicas dos agrotóxicos com base na DL_{50}

CLASSE	CLASSIFICAÇÃO	DL_{50} (mg/kg)
I	Extremamente tóxico	< 50
II	Altamente tóxico	50 - 500
III	Medianamente tóxico	500 - 5000
IV	Pouco tóxico	> 5000

Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2012).

De acordo com Carneiro et al. (2015), apesar de alguns agrotóxicos possuírem classificações de medianamente ou pouco tóxicos, os efeitos crônicos podem ocorrer meses, anos ou até décadas após a exposição. Na tabela 2 são apresentados os sintomas de intoxicação aguda e crônica dos principais grupos químicos de agrotóxicos.

Tabela 2 – Sintomas agudos e crônicos por grupos de agrotóxicos.

GRUPO QUÍMICO	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO AGUDA	SINTOMAS DE INTOXICAÇÃO CRÔNICA
Organofosforados e carbamatos	Fraqueza, cólicas abdominais, vômitos, espasmos musculares e convulsões	Efeitos neurotóxicos retardados, alterações cromossômicas e dermatites de contato.
Organoclorados	Náuseas, vômitos, contrações musculares involuntárias	Lesões hepáticas, arritmias cardíacas, lesões renais e neuropatias periféricas.
Piretróides sintéticos	Irritações das conjuntivas, espirros, excitação, convulsões	Alergias, asma brônquica, irritações nas mucosas e hipersensibilidade.
Ditiocarbamatos	Tonteiras, vômitos, tremores musculares, dor de cabeça	Alergias respiratórias, dermatites, doença de Parkinson e cânceres.
Fentalamidas	-	Teratogêneses
Dinitroferóis e pentaclorofenol	Dificuldade respiratória, hipertermia, convulsões	Cânceres (PCP - formação de dioxinas) e cloroacnes.
Fenoxilacéticos	Perda de apetite, enjoo, vômitos, fasciculação muscular	Indução da produção de enzimas hepáticas, cânceres e teratogêneses.
Dipiridilos	Sangramento nasal, fraqueza, desamios, conjuntivites	Lesões hepáticas, dermatites de contato e fibrose pulmonar.

Fonte: Adaptado de Carneiro (2015).

Segundo Moreira et al. (2002) estima-se que anualmente existam mais de 400.000 pessoas contaminadas por agrotóxicos no Brasil, dessas, cerca de 4 mil são vítimas fatais.

O SINAN (2014), possui em sua plataforma digital o Portal de dados abertos sobre agrotóxicos e, segundo os dados mais recentes, durante os anos de 2007 a 2014 o número total dos casos registrados de intoxicação por agrotóxicos foi de 34.147 no Brasil, sendo 6.099 no Paraná.

A SESP (2013), divulgou o Protocolo de Avaliações das Intoxicações Crônicas por Agrotóxicos, com o objetivo de: “constituir um instrumento para direcionar o atendimento, diagnóstico e vigilância dos casos de intoxicações crônicas por agrotóxicos”. No protocolo consta uma lista com os grupos químicos de agrotóxicos, os sintomas das intoxicações causadas por cada um e direcionamento do atendimento médico para cada caso, entre eles, a intoxicação por organofosforados.

1.2.2 Os organofosforados: história, composição e toxicidade

De acordo com Lara, Azuero, Delgado (2016), os primeiros compostos organofosforados foram preparados por alquimistas no século XV. Centenas de anos mais tarde, no século XIX, o químico francês Jean L. Lassaigne conseguiu a esterificação do ácido fosfórico em experimentos com álcoois, dando início a diversos estudos sobre esses compostos.

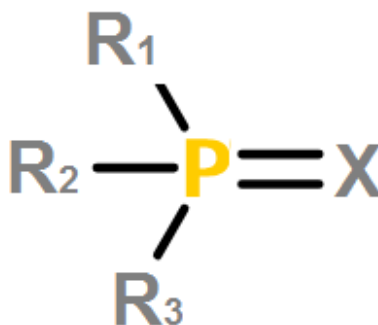
Durante a Segunda Guerra Mundial, compostos organofosforados foram sintetizados com fins militares (sarin, soman e tabun) em razão da alta toxicidade para o sistema nervoso. Nesse mesmo período a propriedade inseticida dos organofosforados foi observada pela primeira vez pelo cientista alemão Gerhard Schrader (LARA, AZUERO, DELGADO, 2016).

Segundo Barboza et al. (2018), a introdução de pesticidas na agricultura foi de extrema importância, devido a escassez refletida pela Guerra, ajudando a aumentar a produção de alimentos. Os organofosforados surgiram como substitutos aos inseticidas organoclorados por serem menos persistentes no ambiente, sendo o principal produto o Paration®, sintetizado por Schrader em 1944.

Atualmente os organofosforados representam mais de 36% do total do mercado mundial de pesticidas químicos, sendo o mais utilizado no controle de pragas agrícolas (BARBOZA et al. 2018).

De acordo com Santos et al. (2007), os organofosforados são compostos classificados como ésteres fosfóricos (derivados de ácidos fosfóricos, tiofosfórico ou ditiofosfórico), a representação geral da sua molécula pode ser vista na Figura 1.

Figura 1 - Fórmula estrutural geral da molécula de compostos classificados como organofosforados



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2007).

Nota: fórmula estrutural criada pelo software eMolecule®.

O ligante “X” representa átomos de oxigênio, enxofre, selênio, cloro ou flúor. Os radicais R_1 e R_2 representam grupos aril ou alquil que se ligam diretamente ao átomo de fósforo, formando fosfinatos, ou por meio de um átomo de oxigênio ou de enxofre, formando fosfatos e fosforotioatos. Por fim, o radical R_3 representa halogênios, alquil, aril ou heterocíclicos (SANTOS et al., 2007)

De acordo com Cocker et al. (2002), a toxicidade e o princípio ativo dos compostos organofosforados mostram relações com o substituinte representado pelo “X” na Figura 1, possibilitando a sua diferenciação em produtos específicos. Os organofosforados aplicados como inseticidas são usados frequentemente na forma “tio” ($P=S$), e por dessulfuração metabólica oxidativa o átomo de enxofre é substituído por um átomo de oxigênio, gerando $P=O$, utilizado como herbicida.

O Protocolo divulgado pela SESP (2013) descreve o mecanismo de ação dos organofosforados no sistema nervoso humano, o qual consiste na fosforilação e consequente inibição irreversível da enzima acetil-colinesterase. O bloqueio dessa enzima provoca um acúmulo do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses, levando a um estímulo aumentado do órgão efector. Esse aumento resulta nos sinais e sintomas de ação muscarínica e nicotínica, e a intoxicação pode ocorrer em três estágios: síndrome colinérgica aguda, síndrome intermediária e neuropatia tardia.

A ingestão dos produtos de degradação dos organofosforados ocorre junto com alimentos ou com a água e, a partir do uso disseminado desses compostos, vários efeitos adversos foram descritos em populações humanas e em outras espécies animais, atribuindo a esses compostos riscos à saúde pública e ambiental, entre eles: neurotoxicidade, imunotoxicidade, carcinogenicidade, desregulação endócrina e alterações no desenvolvimento do indivíduo (CARNEIRO, 2015).

1.2.2.1 Herbicida glifosato

O glifosato é um composto organofosforado, da classe de pesticidas prioritários para estudos ambientais devido a sua aplicação na agricultura em todo o mundo. O glifosato é absorvido pelas plantas e atua como inibidor das enzimas sintetizadoras de aminoácidos, processo de interesse para a eliminação de ervas daninhas em plantações (MONSANTO, 2018).

O glifosato apresenta riscos para a saúde humana, em virtude do seu contato com lençóis freáticos resultando na contaminação da água e também aos resíduos desse herbicida encontrados em alimentos (BOMBARDI, 2017).

Para Carneiro et al. (2015), os danos causados por essa classe de agrotóxico tornam necessária a monitoração de sua presença em águas, solos, ar e alimentos.

Os animais não possuem a via metabólica inibida pela ação do glifosato, o que justifica a baixa toxicidade atribuída ao herbicida, porém, foi comprovado que a toxicidade elevada para a espécie humana de diversos organofosforados está relacionada às ligações $P=O$, ligação presente na molécula do herbicida (COCKER et al., 2002).

A IARC (2010) e a Revista The Lancet Oncology (2015) apresentam uma série de estudos acerca da carcinogenicidade do glifosato.

Em agosto/2018 na Califórnia, a indústria fabricante de agrotóxicos Monsanto® foi condenada a pagar um valor de US\$ 289 milhões ao jardineiro Dewayne Johnson devido a um linfoma não-Hodgkin (NHL), um câncer no sangue que afeta o sistema imunológico, atribuído ao contato com o herbicida Roundup™, produzido pela empresa (THE GUARDIAN, 2018). A composição desse produto é: surfactante polioxietileno-amina, ácidos orgânicos de glifosato, sal de isopropilamina e água. Tal formulação garante ao Roundup™ uma toxicidade aguda, testada em laboratório pelas principais agências regulatórias do produto nos EUA (ANDRIOLI, 2011).

A decisão do Estado da Califórnia foi a primeira a julgar que agrotóxicos com glifosato causam câncer e o processo foi um dos 5 mil casos similares em andamento nos EUA. Na Europa, o presidente francês Emmanuel Macron tentou banir a substância apesar da licença para que o herbicida possa ser usado na União Europeia ter sido renovada por mais 5 anos (BBC, 2018).

No Brasil, de acordo com dados do IBAMA (2017), o herbicida glifosato e seus sais lideram a classificação dos 10 ingredientes de agrotóxicos mais vendidos, com um volume total de 173.150,75 toneladas comercializadas, sendo o Paraná o 3º estado com maior comercialização desse agrotóxico (24.121,69 toneladas), Rio Grande do Sul em segundo (26.044,63 toneladas) e Mato Grosso liderando (31.484,08 toneladas).

O limite quantitativo de glifosato em água no Brasil (500 µg/L (3 µM)) é cinco mil vezes maior do que o permitido na União Europeia (0,5 µg/L) (BOMBARDI, 2017) e, entre os cinquenta agrotóxicos mais utilizados, 22 são proibidos na UE, o que faz do

Brasil o maior consumidor de agrotóxicos proibidos em outros países (LAZZERI, 2017).

Em agosto/2018 o MPF publicou uma liminar, Processo N° 0021371-49.2014.4.01.3400, de suspensão dos registros, do uso na agricultura e com a exigência que a ANVISA priorizasse o andamento dos procedimentos de reavaliação toxicológica das substâncias abamectina, glifosato e tiram, os quais deveriam ser concluídos até 31/12/2018 (MPF, 2018). Em setembro/2018 o Tribunal Regional Federal - 1ª Região derrubou a liminar (CRUZ, 2018), seguido pela declaração do ministro da Agricultura Bairo Maggi “a proibição definitiva do uso de glifosato no Brasil seria um desastre para a agricultura do país” (G1, 2018).

Segundo informações da Ascom/ANVISA (2017), desde 2008 o glifosato segue sob avaliação de toxicidade. Em 2013, o parecer da Fiocruz, contratada para análises de aspectos toxicológicos do herbicida, foi de que as evidências acerca da carcinogenicidade do glifosato não eram suficientes para a sua proibição. Em 2017, novas análises foram realizadas, contando também com estudos de toxicidade aguda, subcrônica e crônica do glifosato e a discussão, no Parecer Técnico de Reavaliação n° 19/2017/GGTOX/ANVISA, de 23/06/2017, sobre as definições de seus resíduos.

Novas avaliações foram realizadas e, em março/2019, a GGTOX divulgou um parecer no qual afirma não ter encontrado evidências suficientes da carcinogenicidade do herbicida, porém propôs novas medidas e restrições para o agrotóxico, entre elas a alteração da classificação de “pouco tóxico” para “extremamente tóxico” (CANCIAN, 2019).

1.2.3.2 Detecção do glifosato

A resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (2011), estabelece limites quantitativos de glifosato na água potável (500 µg/L (3 µM)) e no ambiente (65 µg/L (0,4 µM)). A verificação de tais limites é realizada por órgãos públicos pelo método de cromatografia em coluna, a partir da separação do glifosato e de seu produto de degradação, o ácido aminometilfosfônico (AMPA). Nessa técnica é utilizado um cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) (fase estacionária: C18; fase móvel: KH₂PO₄), seguindo a CRL 0541 (INMETRO, 2013a), com um limite de quantificação de 0,2 µg/L.

Segundo Peiter (2017), em razão de propriedades da molécula do herbicida como sua alta solubilidade em água, baixa solubilidade em solventes orgânicos e ausência de grupos cromóforos, a aplicação da técnica de cromatografia líquida necessita de uma derivatização. Tal técnica consiste em uma etapa pós coluna, realizada em meio alcalino e em temperatura superior a 40 °C, na qual é adicionado um marcador, geralmente o o-ftaladeído, e para formação de um composto fluorescente mais estável, a reação é feita também na presença de mercaptoetanol.

A partir das informações de tempo de retenção e espectro UV-Vis das amostras (fluorescência com comprimento de onda de excitação de 340 nm e emissão em 455 nm), é possível identificar e quantificar com uma curva de calibração a presença do herbicida (SILVA, 2009).

Um método alternativo no qual a etapa pós-coluna não é necessária, é a cromatografia iônica (ICS), com limite de quantificação de 10 µg/L, de acordo com a CRL 0309 (INMETRO, 2013b). A desvantagem desse método é o alto custo do equipamento, equivalente a R\$10 milhões e a pequena quantidade de laboratórios habilitados para operá-lo, gerando um problema em relação ao tempo e demanda de amostras. No Paraná, o volume total de amostras analisadas por mês é de mais de 100.000 e, para o glifosato, as análises são realizadas semestralmente a um custo de 60 a 100 reais por amostra (GÓES, 2018).

Tendo em vista os problemas relacionados a tempo e custos das análises exigidas pelas normas, são encontrados na literatura estudos de técnicas alternativas para a detecção do herbicida. Em geral, a técnica mais encontrada na literatura é a cromatografia líquida de alta eficiência, sendo utilizados diferentes detectores, como por exemplo: detector de fluorescência (KIM et al., 2011; ABAKERLI, FAY, 2003; PIRES, 2015), cromatografia de íons e detecção condutométrica (MATOS, 2014; DIMITRAKOPOULOS et al., 2010), espectrometria de massas (HAO et al, 2011; BAUER, KNEPPER, 1999; GOMES et al., 2015), cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa (ABREU et al., 2008), espectroscopia de refletância difusa (SILVA et al., 2011), UV com detector de arranjo de diodos-DAD (CARDINALI et al., 2015; CARDOSO, 2013; PIMENTA, 2016) e a colorimetria via espectroscopia UV-Vis (SILVA, 2009; QIAN et al., 2009; KHROLENKO, WIECZOR EK, 2005; GÓES, 2018).

A técnica de colorimetria consiste na análise da mudança do espectro ótico de uma solução em virtude da interação com o analito de interesse. Tal técnica possui êxito na detecção de contaminantes por meio da sua interação com nanoestruturas

metálicas e na coloração final da solução, a qual pode ser determinada por meio da espectroscopia UV-Vis, assim como pela aparência visual quando comparada a uma escala de cores padrão (VILELA et al., 2012; PATEL et al., 2015; ROHIT et al., 2016).

Góes (2018) fez uso da técnica de colorimetria UV-vis para verificação da interação do glifosato com nanopartículas de prata, e utilizou o espalhamento inelástico Raman com intensificação de superfície (*SERS*) para a detecção do herbicida, obtendo um limite estimado de detecção de cerca de 1,7 mg/L. A técnica consiste na interação entre o analito e nanopartículas metálicas, a qual potencializa o sinal a partir de vibrações moleculares. O estudo mostra a dependência do crescimento do sinal da banda em 1800 cm^{-1} do espectro Raman em função do aumento da concentração de glifosato em solução, porém tal banda não é exclusiva do herbicida, sendo associada às vibrações moleculares de ligação C=O.

1.2.4 Nanotecnologia

Nos últimos anos, em virtude de características como aumento de sensibilidade, redução de custos e de processamento de amostras, a nanotecnologia mostrou-se um importante meio alternativo para a detecção de poluentes ambientais (WEI, ABTAHI, VIKESLAND, 2015). Essa ciência está associada ao processo de construção, síntese, controle e utilização de produtos em escala nanométrica (1 – 100 nm), sendo capaz de gerar materiais com propriedades especiais que podem levar ao avanço em inovação, ciência e tecnologia, sendo um campo crescente de pesquisa em várias áreas de estudo.

Algumas áreas de estudo e aplicações de nanotecnologia são relacionadas na tabela 3.

Tabela 3 – Nanotecnologia e suas aplicações em áreas de estudo

ÁREA DE ESTUDO	APLICAÇÕES
Indústria automotiva e aeronáutica	Fabricação de materiais mais leves e reforçados por nanopartículas
Indústria eletrônica e de comunicação	Telas planas, tecnologias sem-fios, maior velocidade e armazenamento de dados
Indústria química e de materiais	Catalisadores que aumentem a eficiência da combustão dos veículos motores, ferramentas de corte extremamente duras e resistentes, nanocompósitos que combinam propriedades de materiais díspares, como os polímeros
Indústria farmacêutica, biotecnológica e biomédica	Medicamentos baseados em nanoestruturas que atinjam pontos específicos no corpo humano, próteses biocompatíveis, materiais para a regeneração de ossos e tecidos
Meio ambiente	Membranas seletivas capazes de filtrar contaminantes ou ainda eliminar o sal da água; dispositivos nanoestruturados, capazes de retirar os poluentes dos efluentes industriais; caracterização dos efeitos das nanoestruturas sobre o meio ambiente; redução significativa na utilização de materiais e energia; redução das fontes de poluição; novas possibilidades para a reciclagem

Fonte: adaptado de Alves (2004).

De acordo com Schulz (2018), no ano de 1959, Richard Feynman ministrou uma palestra ("*There's Plenty of Room at The Bottom*", em português: "Há mais espaço lá embaixo"), a qual ficou conhecida como o marco inicial da nanotecnologia. Nessa palestra, Feynman sugeriu a manipulação e controle de materiais em escala atômica, citando termos como miniaturização e rearranjo de átomos. Termos esses que podem ser classificados como a essência de processos utilizados como base para a síntese de nanopartículas: os métodos *top-down* e *bottom-up*, respectivamente, os quais serão elucidados no presente trabalho.

1.2.4.1 Sistemas coloidais: nanopartículas

Colóides são misturas heterogêneas dispersas, compostas de pelo menos duas fases diferentes, com a matéria de uma das fases na forma finamente dividida com dimensão entre 1 nm a 1 µm (sólido, líquido ou gás), denominada fase dispersa e uma fase contínua (sólido, líquido ou gás), denominada meio de dispersão (JAFELICCI, VARANDA, 1999).

Segundo Cavalcante (2009), na interface de separação dessas duas fases ocorrem fenômenos de grande importância para a determinação de características

físico-químicas de um sistema, como a adsorção de moléculas e a formação da dupla camada elétrica.

As nanopartículas dispersas em água são um exemplo de sistema coloidal, o qual apresenta propriedades óticas, magnéticas e catalíticas distintas das encontrados no material em macroescala. Essas alterações estão relacionadas a fenômenos quânticos e a alta relação área/volume presente em materiais nanométricos e abre um leque de pesquisas acerca dessas propriedades (CAVALCANTE, 2009).

1.2.4.1.1 Obtenção de nanopartículas

Faraday (1857) apresentou pela primeira vez uma metodologia de síntese de um nanomaterial. A análise consistiu na preparação de Au coloidal monodisperso, a partir de uma solução de cloroaurato (AuCl_4^-) utilizando um sistema bifásico contendo fósforo dissolvido em dissulfeto de carbono CS_2 e observando mudanças na coloração das soluções coloidais após compressão mecânica. Desde então, um grande volume de trabalhos foi publicado que apresentam diferentes métodos e colóides desenvolvidos a fim de pesquisar e mapear as diferentes características dos colóides e a influência de parâmetros como temperatura e pH na agregação de nanomateriais.

Os métodos de sínteses de nanomateriais podem ser divididos em químicos e físicos e estão listados na tabela 4.

Tabela 4 – Métodos químicos e métodos físicos de obtenção de nanopartículas

MÉTODOS QUÍMICOS	MÉTODOS FÍSICOS
Redução química de sais metálicos	Técnica de fio explosivo
Microemulsões	Plasma
Decomposição térmica de sais metálicos	Deposição de vapor químico
Síntese eletroquímica	Irradiação de microondas
	Ablação por laser pulsado
	Fluidos supercríticos
	Redução Sonoquímica
	Radiação gama

Fonte: adaptado de Mirela (2009).

Tais métodos podem ser classificados pelo tipo de técnica para a formação de nanomateriais. Existem duas técnicas as quais podem ser utilizadas: a denominada

bottom up, baseada na combinação e crescimento controlado de átomos e moléculas para a obtenção de nanopartículas, e a *top down*, a qual consiste na quebra de partículas de dimensões maiores para a obtenção de nanomateriais (MIRELA, 2009).

Neste trabalho foi utilizado o método físico de ablação por laser pulsado (*LAL - Laser ablation in liquids*) para formação das nanopartículas, técnica *top down* que será discutida posteriormente.

1.2.4.1.2 Nanopartículas aplicadas no efeito *SERS* e na detecção do glifosato

Segundo Wei, Abtahi, Vikesland (2015) a nanotecnologia mostrou-se um importante meio alternativo para a detecção de poluentes ambientais, devido a diferentes propriedades óticas, magnéticas e catalíticas dos nanomateriais.

Góes (2018) realizou testes de efeito *SERS* com o corante rodamina 6G utilizando soluções aquosas contendo nanopartículas de prata e chegando a um fator de intensificação de 500, calculado a partir da relação com o sinal obtido pela mesma concentração do composto diluído apenas em água. Outros testes com esse corante são encontrados na literatura envolvendo *SERS* (QIU et al., 2008; NGUYEN et al., 2012; KNEIPP et al., 1995; LING et al., 2010), assim como com colóides de outros metais como cobre, alumínio, platina e níquel e cobalto (YANG, 2007) e ligas de vanádio (PARHOODEH, KOWSARI, 2016).

Costa et al. (2012) demonstraram a eficiência do efeito *SERS* na detecção do herbicida glifosato e, de acordo com os autores, a interpretação do espectro *SERS* obtido da interação do herbicida com nanocubos de prata e a análise das atribuições vibracionais da molécula do glifosato possibilitou um sensor de assinatura desse composto. O estudo no entanto não determina o limite de detecção da técnica.

Heidemann et al. (2017) demonstraram um sensor capaz de quantificar a presença do glifosato, o qual consiste em uma fibra ótica com uma rede de período longo revestida por uma película de nanopartículas de ouro, funcionalizada com cisteamina. Esse dispositivo de acoplamento modal opera na faixa espectral do visível, na banda de ressonância de plasmon de superfície e, testado em água contaminada com o herbicida apresentou limite de detecção de 3,381 µg/L.

1.2.4.1.3 Estudos de algumas propriedades e mudança de forma fotoinduzida de nanopartículas

As soluções coloidais de nanopartículas de prata, em razão de suas características óticas distintas, são capazes de apresentar oscilações na frequência de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado (*LSPR*). Essas propriedades relacionadas a fenômenos quânticos e à alta relação área/volume desses materiais são estudados por Cavalcante (2009), assim como por Saade (2013) o qual relaciona em seu trabalho as diferenças nas dimensões com a estabilidade das nanopartículas.

O trabalho de Tsuji et al. (2011) discute sobre diferentes técnicas para a mudança de forma, de dimensão e de carga das nanopartículas, tendo consequências na interação das nanopartículas com o analito de interesse.

Da mesma forma, Langille, Personick, Mirkin (2013) pesquisam fatores químicos e físicos para o controle da forma de nanopartículas, como o controle térmico utilizado por (SUN et al., 2003), a variação na concentração de reagentes (PARNKLANG et al., 2015), (ZHANG et al., 2014) e a incidência de diferentes comprimentos de onda (técnica conhecida como *PISC – Photoinduced shape conversion*). As alterações de tais fatores resultaram na síntese de nanopartículas com diferentes formatos como nanodiscos, nanoesferas, nanotriângulos e nanohexágonos, apresentando diferentes faixas de absorção na região do UV-Vis.

O controle da posição da banda de *LSPR*, variando-se o material de composição ou a forma das nanoestruturas, possibilita a síntese de uma solução específica para cada caso de detecção. A banda de *LSPR* resulta em uma intensa banda de extinção (combinação dos efeitos de absorção e espalhamento), que pode ser da ordem de 10^5 maior do que a de uma partícula da mesma dimensão sem a ocorrência da ressonância plasmônica (JAIN et al., 2006). O uso de substratos com características específicas para uso com intensificação do sinal Raman (*SERS*) é relatado na literatura com intensificações da ordem de 10^{15} (STROBBIA et al., 2015).

1.3. OBJETIVOS

O objetivo geral do estudo é desenvolver técnicas de espectroscopia ótica Raman e UV-Vis para a detecção do herbicida glifosato em água.

Para isso os objetivos específicos são:

- a) estabelecer uma metodologia de ablação a laser para a síntese de nanopartículas de prata eficiente para o processo de fotoconversão de formato das nanopartículas (*PISC*);
- b) realizar a fotoconversão de nanopartículas esféricas a nanopartículas prismáticas, as quais possuam ressonância em torno de 600 nm, próximo ao comprimento de onda do laser utilizado nas análises Raman e *SERS*;
- c) verificar a interação das nanopartículas sintetizadas com o analito de prova, corante rodamina 6G, via espectroscopia UV-Vis e espectroscopia *SERS*;
- d) verificar a interação das nanopartículas sintetizadas com o herbicida glifosato, via espectroscopia UV-Vis e espectroscopia *SERS*;
- e) analisar o efeito dos parâmetros pH e temperatura no comportamento da solução coloidal, assim como na interação da mesma com o analito;
- f) realizar a calibração das técnicas de espectroscopia *SERS* e UV-Vis aplicadas na detecção do contaminante glifosato;

1.4. ESTRUTURA DO TRABALHO

Este trabalho está estruturado em cinco capítulos. O primeiro capítulo aborda as motivações, o estado da arte e os objetivos do trabalho proposto. Apresentam-se em diferentes seções, a necessidade do desenvolvimento de técnicas capazes de identificar o contaminante glifosato em amostras de água, assim como pesquisas recentes que abordam tecnologias aplicadas com o mesmo objetivo. No segundo capítulo consta a fundamentação teórica, na qual estão descritas de maneira sucinta os princípios das técnicas de espectroscopia ótica UV-Vis e Raman, síntese e características de colóides nanoestruturados, assim como técnicas para a mudança de formato e dimensão das nanoestruturas a partir da incidência de radiação eletromagnética na solução coloidal. O terceiro capítulo apresenta as metodologias utilizadas para cada técnica, assim como os reagentes utilizados, o preparo de soluções para análises, os cálculos e a discussão de resultados. O quarto capítulo aborda as conclusões a partir das análises dos resultados obtidos e, por fim, o último capítulo apresenta os trabalhos futuros relacionados à pesquisa.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

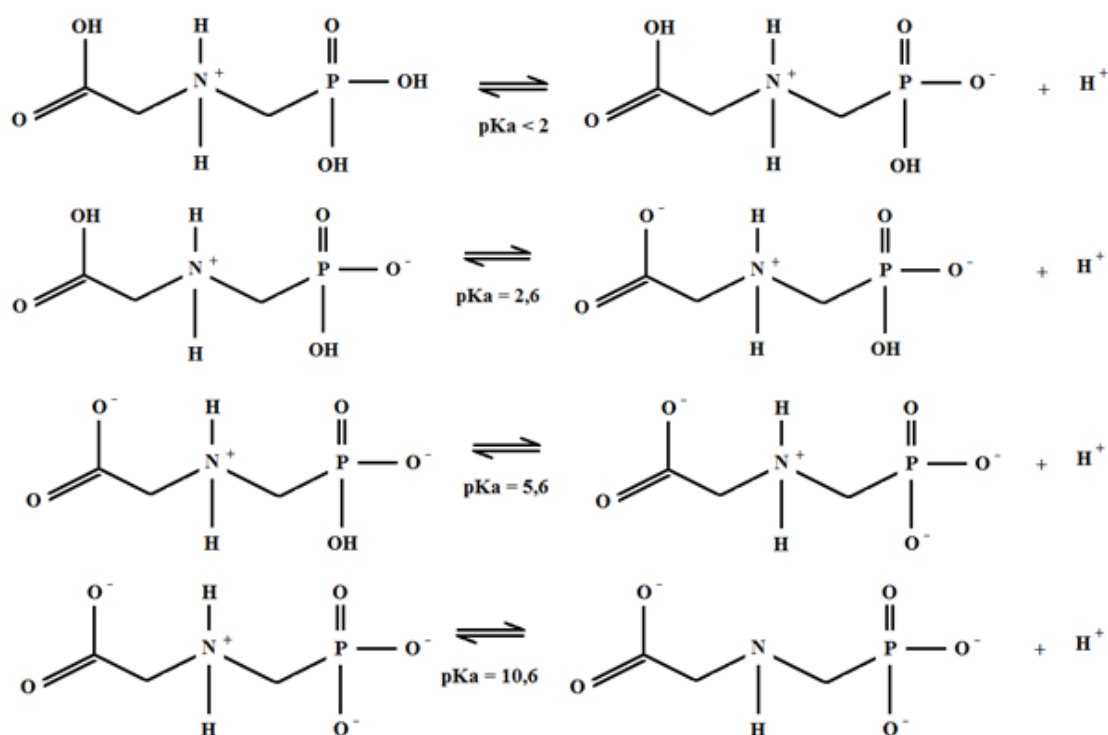
2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO GLIFOSATO

O glifosato (N- (fosfonometil) glicina) possui fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e massa molar de 169,1 g/mol. Esse composto e seus sais apresentam-se como sólidos cristalinos em condições ambientes, com alta solubilidade em água (12 g/L), quase insolúveis na presença de solventes orgânicos e com estabilidade na presença de luz (AMARANTE JUNIOR et al. 2001).

O glifosato em meio aquoso pode apresentar diferentes comportamentos, dependentes do pH do meio. De acordo com Coutinho e Mazo (2005) os mecanismos de reação do glifosato em diferentes pHs conferem diferentes cargas para a molécula do herbicida.

Os valores de pKa e as dissociações da molécula são apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Esquema de comportamento do glifosato em diferentes pHs



Fonte: Adaptado de Coutinho, Mazo (2005).

Segundo o esquema apresentado, adaptado de Coutinho, Mazo (2005), a molécula do glifosato possui comportamento zwitteriônico, sofrendo primeiramente dissociações dos hidrogênios ligados aos oxigênios. Dessa forma, a molécula apresenta carga positiva em pH abaixo de 2 por sua protonação no grupo amina (- NH_2^+ -). Em pH na faixa entre 2 e 2,6 a molécula apresenta ainda a protonação no grupo amina e sofre uma dissociação no grupo fosfato (- PO_2H^+ -). Na faixa entre pH 2,6 e 5,6 a molécula apresenta mais uma dissociação, dessa vez no grupo carboxilato (- COO^- -). Na faixa entre pH 5,6 e 10,6 a molécula apresenta mais uma dissociação, novamente no grupo fosfato (- PO_2^{2-} -) e por fim, em pH superior a 10,6 a molécula atinge um estado trianiônico e sofre a dissociação do hidrogênio ligado ao nitrogênio (- NH^- -).

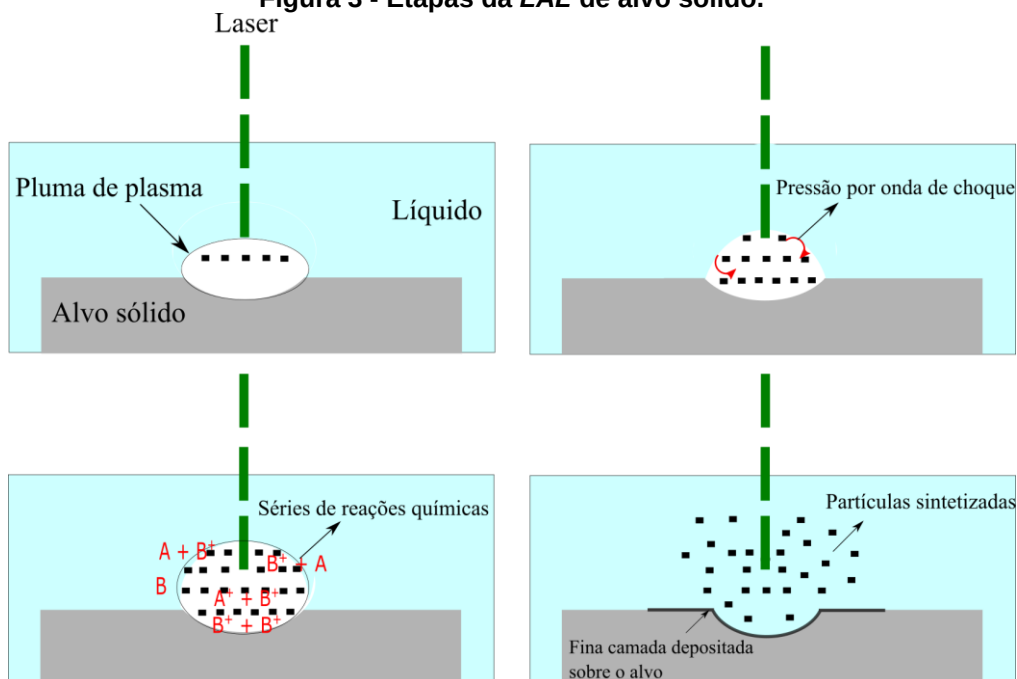
2.2 NANOPARTÍCULAS

2.2.1 Ablação a laser em meio líquido (LAL)

A ablação por laser pulsado de materiais sólidos possui um grande potencial no processamento de materiais como: preparação de filmes finos, crescimento de nanocristais, limpeza de superfícies e fabricação de dispositivos microeletrônicos. Esse método, quando realizado em ambientes líquidos, conhecido pela sigla em inglês *LAL*, permite efeitos físicos como resfriamento e confinamento dos nanocristais formados, além de promover reações químicas que resultam em diferenças nas dimensões e na estabilidade das nanopartículas (NICOLODELLI, 2011).

A técnica consiste na incidência de pulso laser em um alvo sólido, o que resulta na formação de uma pluma de plasma em sua superfície. No interior da pluma ocorre uma série de reações químicas de oxidação e redução de átomos do alvo sólido e de um agente estabilizante adicionado em solução. A presença do líquido resfria e confina a pluma formada que está em expansão, o líquido estabelece determinada pressão sobre a pluma condensando-a, gerando uma fina camada sólida depositada sobre o alvo e a formação de novas moléculas e nucleação de nanopartículas dispersas na solução (SAADE, 2013). Um esquema do processo pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Etapas da LAL de alvo sólido.



Fonte: adaptado de Saade (2013).

A concentração, o tamanho e a forma das nanopartículas produzidas são dependentes do comprimento de onda, fluência e largura temporal de pulso do laser utilizados na ablação (além de outros fatores como concentração de estabilizante, temperatura e etc), pois o processo que ocorre no metal depende da taxa em que o alvo é aquecido (ZENG et al., 2012).

Em relação à estabilidade do colóide, essa pode ser expressa pela teoria DLVO.

2.2.2 Teoria DLVO de interações de um sistema coloidal e potencial zeta

Desenvolvida no final da década de 40 a teoria DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) de interações físicas e dinâmicas de nanopartículas descreve duas diferentes interações eletromagnéticas dos sistemas coloidais com a matéria, são elas: dupla camada de cargas (interação Coulombiana repulsiva) e forças de van der Waals (interações eletrodinâmicas atrativas) (JAFELICCI, VARANDA, 1999).

A carga da superfície da partícula influencia na distribuição dos íons em solução, sofrendo processo de atração e repulsão e gerando diferentes potenciais. As partículas coloidais adquirem cargas elétricas na superfície quando expostas ao contato com solvente polar, por diferentes mecanismos, tais como dissociação de

grupos da superfície e adsorção ou dissolução de íons da superfície. A atração de íons com carga oposta (contra-íons) a essa interface gera a interação de dupla camada elétrica (JAFELICCI, VARANDA, 1999).

A força de atração de van der Waals por sua vez depende do momento de dipolo elétrico das moléculas. Uma molécula com momento de dipolo pode rotacionar livremente e sofrer atração por cargas dispersas em solução, situação de máxima interação em módulo e mínima energia (SAADE, 2013).

De acordo com a teoria DLVO, o sistema coloidal estará no limiar de se desestabilizar, se a força de repulsão entre as cargas for insuficiente diante da força atração de van der Waals, não garantindo a estabilidade das partículas dispersas. Dessa forma, as partículas dispersas podem sofrer processo de agregação rapidamente por suas interações atrativas de van der Waals à medida que as superfícies das partículas se aproximam umas das outras (SAADE, 2013).

Em resumo, a teoria assume que a energia potencial de interação total entre duas partículas é a soma da energia de interação da dupla camada elétrica e da energia de atração de van der Waals (BRAGANÇA, 2008).

Um recurso utilizado para a estabilização de partículas é a adição de sais na solução coloidal, conhecido como estabilização eletrostática. Tal estabilização ocorre com a formação de uma bicamada iônica envolvendo a partícula (camada de Stern e a camada difusa), fenômeno conhecido como capeamento, resultando na formação de três diferentes potenciais: de superfície, de Stern e o potencial zeta (BRAGANÇA, 2008).

O potencial zeta tem papel fundamental para a formação e estabilização das partículas geradas e possui sensibilidade ao parâmetro pH do meio reacional. Dessa forma a carga das nanopartículas pode ser alterada pela alcalinidade ou acidez do meio, característica importante para o processo de crescimento e possível mudança de formato das nanopartículas (SILVA, 2011).

2.2.3 Propriedades óticas de nanopartículas metálicas e teoria de Gustav Mie

O primeiro uso de nanopartículas conhecido na história foi por artesões no século IV, na Mesopotâmia, com o objetivo de criar um efeito brilhante sobre as superfícies de vasos. O método foi utilizado por toda a Idade Média e o Renascimento

para produzir recipientes com cores que remetessem ao ouro, ou gerassem cores vibrantes em artefatos de vidro e na coloração de vitrais das igrejas (CARMO, 2011).

O maior exemplo é uma das mais famosas antiguidades romanas, a taça de Licurgo, fabricada com vidro contendo nanopartículas de ouro (denominado vidro Ruby), essa taça possui a particularidade de mudança de cor ao ser iluminada externa ou internamente, a qual pode ser vista na Figura 4.

Figura 4 - Taça de Licurgo iluminada externa e internamente



Fonte: The Trustees of the British Museum/Art Resource, NY (apud G1, 2013).

Em 1904, Maxwell Garnett descreveu as cores brilhantes observadas em vidros dopados com metal, utilizando a teoria de Drude para metais e as propriedades eletromagnéticas de pequenas esferas desenvolvida por Rayleigh. Quatro anos mais tarde, Gustav Mie, a partir da resolução das equações de Maxwell em coordenadas esféricas para uma partícula isolada submetida a um campo eletromagnético, desenvolveu sua teoria para as propriedades óticas de espalhamento e absorção de luz por partículas metálicas esféricas (MIE, 1908).

Entre suas predições, como a descrição do espectro de extinção que será apresentada nessa dissertação, sua teoria mostra a dependência de características das ressonâncias de plasmon do espectro de extinção em função da forma e do tamanho das nanopartículas metálicas, mostrando que nanopartículas com mesma composição e tamanhos diferentes apresentarão bandas de ressonância distintas.

A dependência entre a frequência de ressonância de plasmon e a dimensão das nanopartículas é tal que: quanto maior a nanopartícula, maior é o desvio da frequência de ressonância de plasmon para o vermelho (CARMO, 2011). A meia largura da banda espectral também possui relação com o tamanho das partículas, sendo que o aumento na dispersão de tamanhos é indicado pelo aumento na meia largura da banda (BORRERO, 2015).

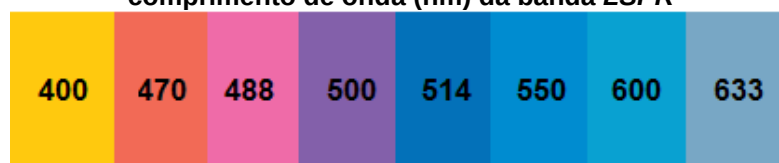
De acordo com resultados experimentais de Borrero (2015), em testes com energias de pulso de 10 mJ e 25 mJ para a síntese de nanopartículas de prata por ablação a laser, para sistemas coloidais com dispersão de tamanhos o estreitamento da meia largura de banda indica uma maior homogeneidade, ou seja, uma menor distribuição de tamanhos das partículas.

Com a teoria de Mie, é possível explicar o efeito na coloração da taça de Licurgo: as nanopartículas de ouro contidas na taça absorvem a luz na região do azul, reflete a luz na região do verde e transmite a luz na região do vermelho. Dessa forma, quando a taça é iluminada pelo lado externo ela apresenta uma coloração esverdeada, pois as cores complementares são absorvidas (azul) e transmitidas para o interior da taça (vermelho). Quando a taça é iluminada pelo interior, ela apresenta uma coloração vermelha, pois a luz transmitida do interior é a vermelha (ALVES, 2014).

As alterações em propriedades físico-químicas de nanoestruturas é um campo de pesquisa que está em expansão, conduzindo a novas aplicações em diferentes áreas do conhecimento (CAVALCANTE, 2009). A alteração de características das nanoestruturas, tais como formato e dimensões, possibilitam o controle de comprimentos de onda de absorção e espalhamento da luz (COSTA, 2012).

As cores correspondentes a alguns comprimentos de onda da banda *LSPR* das nanopartículas de prata em função do comprimento de onda de absorção são apresentadas na Figura 5.

Figura 5: Coloração da solução coloidal de nanopartículas de prata em função do comprimento de onda (nm) da banda *LSPR*



Fonte: Adaptada de Langille, Personick, Mirkin (2013).

2.2.4 Mudança de forma fotoinduzida de nanopartículas

O trabalho de Langille, Personick, Mirkin (2013) apresenta fatores físicos e químicos (como por exemplo temperatura, pH e reações de oxirredução) que podem ser utilizados para o controle da forma e tamanho de nanopartículas de metais nobres, assim como os efeitos das mudanças apresentadas em relação a absorção da luz. De

acordo com os autores, a irradiação em diferentes comprimentos de onda posterior à síntese das nanopartículas resulta em diferentes formatos como nanodiscos, nanoesferas, nanoprismas e nanohexágonos os quais apresentam diferentes faixas de absorção na região do ultravioleta até o início do infravermelho.

O trabalho de Tsuji et al. (2011) discute sobre diferentes técnicas como a fotoindução (PI), a posterior incidência de laser (PLI) e adição de citrato de sódio à ablação LAL. A utilização dessas técnicas mostrou-se eficiente para a mudança de forma, de dimensão e de carga das nanopartículas (NPs), respectivamente. Essas alterações têm consequências na interação das NPs com o analito.

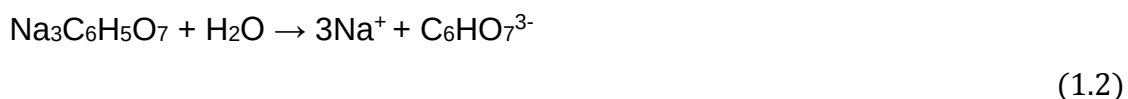
A adição do sal citrato de sódio possui uma dupla funcionalidade na solução, desempenhando o papel de estabilizante por formação da bicamada iônica (discutida no item 2.2.2), a qual favorece o crescimento das nanoestruturas em locais específicos, determinantes no processo de conversão de formato (TSUJI, TSUJI, HASHIMOTO, 2011).

No processo de obtenção de nanopartículas de prata por ablação a laser, na presença de oxigênio, íons de prata (Ag^+) são liberados em solução e passam pelo processo de aglomeração (conhecido como coalescência). A presença do citrato de sódio estabiliza os cátions (Ag^+) gerados durante o processo de ablação a laser pela adição do ânion citrato dissociado em solução aquosa. A estabilização desses cátions diminui as interações de repulsão entre eles, tendo início o processo de aglomeração de átomos (*clusters*) os quais propiciam um sítio para o crescimento e formação de nanopartículas, conhecido como nucleação. O processo de nucleação é interrompido no momento em que a concentração se encontra abaixo da saturação do sistema, dessa forma as partículas continuam em crescimento até que se tornam estáveis e com dimensões nanométricas (BRITO-SILVA, 2011).

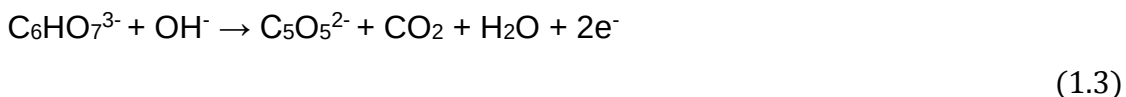
As reações que ocorrem em solução são representadas a seguir:



a prata metálica (Ag^0) em solução aquosa é oxidada a Ag^+ pela presença de gás oxigênio (O_2) e água (H_2O).



o citrato de sódio em solução é dissociado em cátions Na^+ e ânions citrato ($\text{C}_6\text{HO}_7^{3-}$)



os ânions citrato ($\text{C}_6\text{HO}_7^{3-}$) são oxidados pelos grupos hidroxila (OH^-), produto da oxidação da prata metálica (Ag^0) em (1.1), liberando um par de elétrons (2e^-) em solução.

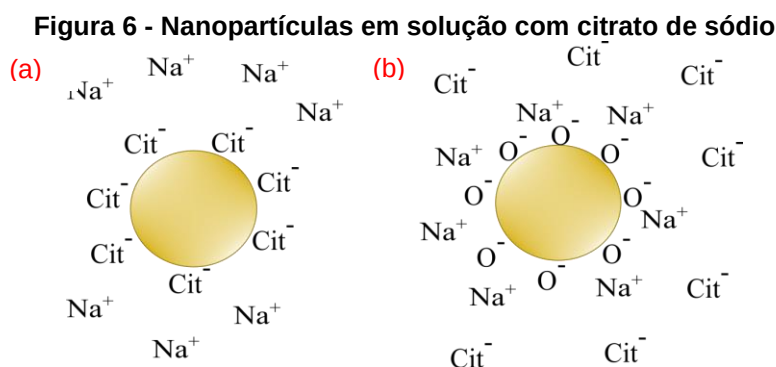


a prata oxidada em (1.1) é agora reduzida a Ag^0 pelos elétrons liberados na oxidação dos ânions citrato em (1.3) tornando-se estável.

De acordo com Tsuji, Tsuji, Hashimoto (2011) sem a presença de citrato de sódio durante a LAL o cátion Ag^+ atrairá para a superfície das nanopartículas os íons oxigênio presentes na solução aquosa, resultando em uma mudança de carga na superfície das nanopartículas. Tal fenômeno prejudica a agregação dos átomos, em virtude da elevada eletronegatividade do oxigênio, variando as características de absorção e espalhamento da luz.

A Figura 6 apresenta esquematicamente a comparação do comportamento das nanopartículas de prata com a adição de citrato durante (Figura 6a) e após o processo de ablação (Figura 6b).

Segundo Zeena, Prashant (2010) os íons citrato influenciam o crescimento das partículas em estágios iniciais por agir como redutor de íons Ag^+ , desempenhando um papel importante ao ditar o tamanho e a forma dos nanocristais por possuir uma alta afinidade pelas nanopartículas de prata.

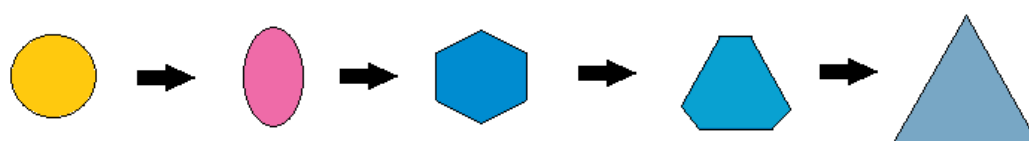


Fonte: Adaptado de Tsuji et al. (2011).

(a) Nanopartículas de prata com a adição de citrato de sódio durante a LAL. (b) Nanopartículas de prata com a adição de citrato de sódio após a LAL.

Para a obtenção de nanopartículas com formato prismático a partir de nanoesferas a evolução sistemática é de esferas (comprimento de onda da banda de plásmon em 400 nm) a discos (480 nm), em seguida hexágonos (540 nm), prismas com bordas retas (580 nm), e finalmente, prismas de bordas afiadas (600 nm), sendo resultado do processo de deposição de prata metálica, reduzida pela ação do citrato nas faces rugosas de nanopartículas gêmeas (união de duas nanopartículas), como mostra a Figura 7 (LEE et al., 2010).

Figura 7 - Evolução do formato de nanopartículas de prata durante o processo de fotoconversão



Fonte: Adaptado de Lee et al. (2010).

Durante o processo de aglomeração os ânions citrato se depositam em sítios específicos nas bordas de nanopartículas gêmeas, estabilizando-as e permitindo a deposição de outras nanopartículas com dimensões menores, (2 – 4 nm de tamanho e *LSPR* com comprimento de onda até 395 nm) denominadas “sementes”, nesses sítios. A importância da presença de nanopartículas sementes pode ser explicada em virtude do processo de oxirredução necessário para o crescimento dos nanoprismas, pois nanopartículas com tamanhos maiores do que 4 nm possuem alto potencial de oxirredução, sendo mais dificilmente oxidadas/reduzidas.

De acordo com Langille, Personick, Mirkin (2013) o processo de formação dos prismas pode ser dividido em três etapas: nucleação das nanopartículas sementes, crescimento de pequenos nanoprismas formados a partir da deposição das nanopartículas sementes nas nanoesferas (5 – 10 nm e *LSPR* com comprimento de onda de 396 – 400 nm, deslocado para o vermelho em relação às sementes) e por fim a conversão total, em que as nanoesferas não estão mais presentes, restando apenas nanoprismas em solução.

É importante ressaltar que tal processo não ocorre na ausência de citrato de sódio, necessário para a redução e deposição das nanopartículas sementes, assim como na ausência de luz ou com irradiação em comprimentos de onda maiores do que 700 nm. Outro fator interessante discutido por Langille, Personick, Mirkin (2013)

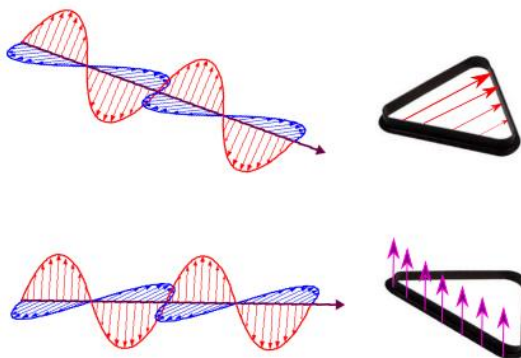
é a adição de um comprimento de onda secundário no processo de fotoconversão. Os autores utilizaram uma lâmpada com comprimento de onda 550 ± 20 nm e obtiveram uma distribuição bimodal de nanoprismas, os menores com 70 nm de dimensão e os maiores com 150 nm. Com a adição de uma nova lâmpada na montagem experimental, com excitação em comprimento de onda de 450 ± 5 nm, a distribuição tornou-se monomodal com prismas de 72 nm de dimensão.

Dessa forma, para um processo de conversão efetivo são necessários 5 componentes: uma fonte de Ag^+ , oxigênio, citrato de sódio, nanopartículas sementes e luz visível.

A mudança no formato e no tamanho das nanopartículas garante diferentes comprimentos de onda de absorção, onde quanto maior as nanopartículas, mais deslocado para a região do vermelho estará o pico de absorção. Langille, Personick, Mirkin (2013) observaram tal fenômeno ao realizarem o processo de conversão de nanopartículas por fotoindução. De acordo com os autores, a partir da análise de absorção e obtenção de imagens por microscopia de transmissão (TEM), as nanopartículas sintetizadas por *LAL* possuem formatos esféricos e banda de absorção em torno de 400 nm, os nanoprismas possuem banda de absorção em torno de 600 nm e nanoprismas maiores possuem comprimento de onda de absorção de 700 nm até 1000 nm. Os resultados obtidos pela análise do espectro de absorção apresentaram também o aparecimento de uma pequena banda na região de 470 nm.

Essa banda foi atribuída a diferentes vibrações dos elétrons livres dos nanoprismas de prata (dipolo e quadrupolo), descritas por Saade (2013), conforme a Figura 8.

Figura 8 - Vibrações eletrônicas dipolo e quadrupolo de nanoprismas.



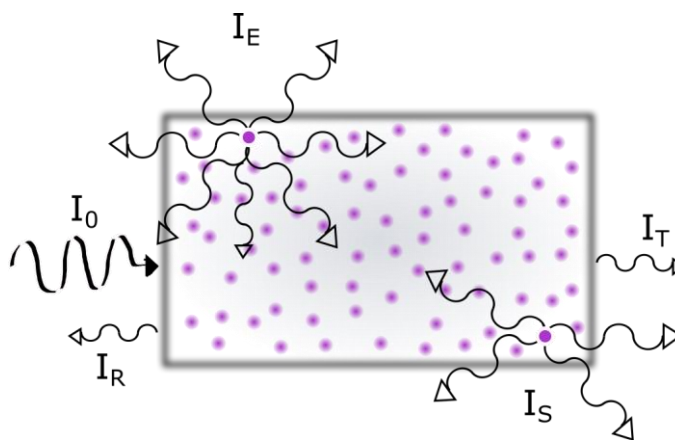
Fonte: Adaptado de Saade (2013).

2.3 TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ÓTICA

2.3.1 Espectroscopia de absorção UV-Vis

A espectroscopia em sua essência é o estudo da interação da radiação com a matéria e, quando a frequência do campo eletromagnético está na faixa de 200 nm a 3000 nm, o estudo é denominado de espectroscopia ótica. Para uma radiação com intensidade I_0 podem ocorrer três diferentes fenômenos: a absorção da energia e posterior emissão I_E , o espalhamento I_S , que pode ser elástico ou inelástico, os quais serão discutidos posteriormente neste trabalho, e a parcela de radiação que não foi absorvida e nem espalhada é denominada radiação transmitida I_T . Há também uma parcela de radiação refletida que pode ser considerada como um espalhamento elástico (HALLIDAY e RESNICK, 2012). A Figura 9 traz um esquema dos fenômenos de interação da radiação descritos.

Figura 9 - Fenômenos de interação da radiação incidente I_0 com a matéria.



Fonte: Adaptada de Solé et al. (2005).

I_R : radiação refletida; I_E : radiação emitida; I_T : radiação transmitida; I_S : radiação espalhada.

A espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica analítica que vem sendo empregada há mais de 50 anos e depende do processo de absorção de radiação eletromagnética na região do ultravioleta (100 - 390 nm) e visível (390 - 770 nm) por sistemas atômicos, capaz de fornecer informações sobre transições eletrônicas. Tal processo ocorre quando um elétron da matéria é promovido de um estado eletrônico de energia a outro de energia mais elevada por incidência de radiação eletromagnética (HOLLAS, 2004).

No processo de análise de absorção, a radiação de uma fonte de banda larga passa por um monocromador, no qual é selecionada uma banda estreita e com comprimento de onda central específico. A radiação em banda estreita passa pela amostra contida em um caminho ótico de comprimento definido e a esse aparato pode ser adicionado um sensor junto ao monocromador, formando assim um espectrofotômetro. Nesse caso a radiação de banda larga interage com a amostra e é mensurada a intensidade resultante para cada comprimento de onda e com a absorção para cada comprimento de onda tem-se o espectro de absorção (HOLLAS, 2004).

A absorção de energia depende da estrutura eletrônica da molécula, e por isso, a espectroscopia de absorção na região do UV-Vis tem ampla aplicação na caracterização de uma série de propriedades de diversas espécies orgânicas, inorgânicas e bioquímicas (GÓES, 2018).

Considerando os fenômenos apresentados na Figura 9, o resultado combinado das medidas de absorção e espalhamento é denominado de espectro de extinção, conforme descrito por Gustav Mie em 1908 e apresentado na equação (1):

$$Q_{abs} = Q_{ext} - Q_{esp} \quad (1)$$

2.3.2 Espectroscopia Raman

O fenômeno de espalhamento no qual a frequência de radiação espalhada é igual à da radiação incidente é denominado como espalhamento *Rayleigh* (espalhamento elástico), e para o caso de espalhamento com frequência de radiação diferente da incidente, o fenômeno é denominado como espalhamento Raman (espalhamento inelástico) (RAMAN, 1928).

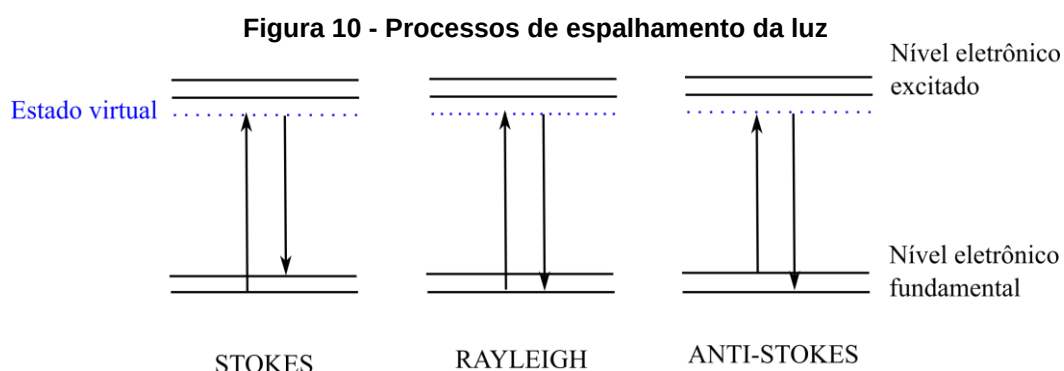
O espalhamento Raman, observado experimentalmente por Raman (1928), ocorre quando a radiação incidente interage com os modos vibracionais e rotacionais moleculares da matéria. Este fenômeno é dividido em dois diferentes casos: *Stokes* e *Anti-Stokes*.

O espalhamento Raman *Stokes* é caracterizado quando ao ceder energia para o sistema, a radiação espalhada tem comprimento de onda maior do que a incidente, sendo quantizada na forma de fótons de menor energia.

Para o espalhamento Anti-Stokes, os modos vibracionais moleculares estão pré-excitados, cedendo energia para a radiação incidente e resultando em um espectro de espalhamento com bandas em comprimentos de onda menores, sendo quantizada na forma de fótons com maior energia (RAMAN, 1928).

Considerando a baixa energia térmica no sistema à temperatura ambiente, a probabilidade de se encontrar moléculas em estados vibracionais pré-excitados é menor e em geral, as linhas Stokes são mais intensas.

Um esquema dos processos descritos pode ser observado na Figura 10.



Fonte: Adaptado de Faria, Santos, Gonçalves (1997).

Da esquerda para a direita: espalhamento inelástico (*Stokes*), espalhamento elástico (*Rayleigh*) e espalhamento inelástico (*anti-Stokes*).

A diferença de energia entre a radiação incidente e a espalhada corresponde à energia com que átomos presentes na região estudada estão vibrando e essa frequência de vibração possibilita a identificação da geometria molecular, arranjo dos átomos e informações das interações moleculares (FARIA, SANTOS, GONÇALVES, 1997).

Essa técnica é vantajosa por possibilitar a obtenção de uma região espectral de assinatura, correspondente aos modos de vibração molecular da substância na região visível do espectro eletromagnético, permitindo a utilização de componentes óticos mais simples em relação à espectroscopia no infravermelho (GÓES et al., 2014).

Como desvantagem da espectroscopia Raman, que pode interferir na execução de pesquisas, pode ser citada a baixa intensidade do sinal, ocasionando uma baixa relação sinal-ruído das amostras. Segundo Chase (1987), estima-se que de cada 10^8 fótons que incidem sobre uma substância, somente 1 seja espalhado inelasticamente.

Outro fator limitante da técnica é a taxa de emissão de fótons por fluorescência ser da ordem de 10^4 a 10^8 vezes mais intensa que o espalhamento Raman.

2.3.2.1 Efeito *SERS*

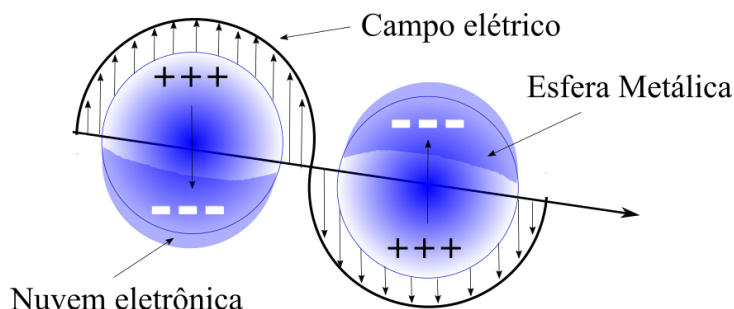
Com o intuito de aumentar a intensidade de sinal em análises utilizando a espectroscopia Raman, foi desenvolvida a técnica de interação do analito com superfícies metálicas especialmente preparadas, conhecida como efeito de espectroscopia Raman intensificada pela superfície, ou *SERS*. Estudos demonstram que essa técnica apresenta a propriedade de intensificar o sinal Raman por fatores da ordem de 10^4 até 10^{15} vezes. A técnica consiste na produção de uma superfície metálica adequada, utilizando nanopartículas metálicas, a qual potencializa o sinal do analito a partir de vibrações moleculares (STROBBIA et al., 2015).

Atualmente, a alta sensibilidade da técnica permite também que sejam obtidos espectros de moléculas em concentrações da ordem de 10^{-10} mol.L⁻¹ garantindo aplicações nas áreas médica e ambiental. O efeito *SERS* pode ocorrer graças a dois mecanismos diferentes que levam à amplificação: químico (transferências de cargas) e eletromagnético (BOTTREL, 2012).

O mecanismo de transferência de cargas está associado à quimissorção da molécula e a transferência de cargas entre o adsorbato e o substrato metálico, a qual forma um complexo de superfície. Essas transferências são favorecidas em regiões rugosas da superfície metálica, nestes sítios metálicos ocorre a formação de um par “elétron-buraco” na superfície metálica, o que leva à transferência ressonante de um elétron para orbitais vazios do adsorbato no estado eletrônico excitado. Quando este elétron retorna ao metal é criado um fóton Raman quando a molécula permanece vibracionalmente excitada (LANGILLE, PERSONICK, MIRKIN, 2013).

Segundo Langille, Personick, Mirkin (2013), o mecanismo eletromagnético consiste na oscilação coerente de elétrons na superfície metálica a partir da incidência de luz em determinada frequência, processo o qual resulta na formação de uma onda progressiva, chamada plasmon de superfície (*SP*). As oscilações de plasmon ocorrem em torno de superfícies nanoestruturadas na frequência de ressonância de plasmon de superfície localizado (*LSPR*), gerando um intenso campo eletromagnético e, conseqüentemente, uma intensificação no sinal Raman (*SERS*), esquema representado na Figura 11.

Figura 11 - Ressonância de plasmon de superfície



Fonte: Adaptada de Langille, Personick, Mirkin, 2013.

O aperfeiçoamento das técnicas *SERS* já possibilitou a detecção do espectro vibracional de uma única molécula de rodamina 6G (R6G), um corante altamente fluorescente usado como marcador para a medida de traços (KNEIPP, 1995).

2.3.2.2 Cálculo do limite de detecção (LOD)

Na avaliação dos métodos analíticos é necessário expressar o limite de detecção da técnica utilizada como forma de validação da capacidade de detecção de determinada substância.

A IUPAC define o limite de detecção (LOD) com uma grandeza de valor quantitativo, obtida por um dado procedimento de medição, a qual expressa a probabilidade do método de alegar falsamente a ausência da substância em um material (falso negativo expresso por β), e a probabilidade de falsamente alegar sua presença (falso positivo expresso por α).

O valor padrão recomendado para as incertezas de tipo I e II (α e β) é de 0,05 (ou seja, 5%) sendo o LOD a verdadeira concentração líquida ou quantidade do analito no material a ser analisado, que possui uma probabilidade de 95 % de mostrar que a concentração ou a quantidade do analito no material analisado é maior do que no material em branco (GÓES, 2018).

As diretrizes da *International Conference on Harmonization* - ICH, estabelecem 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).

No presente estudo foi utilizada a relação sinal ruído na tentativa de sua determinação, essa relação é dada pela intensidade da banda a ser analisada

(calculada do pico até a metade da intensidade do ruído) dividida pela intensidade do ruído pico a pico.

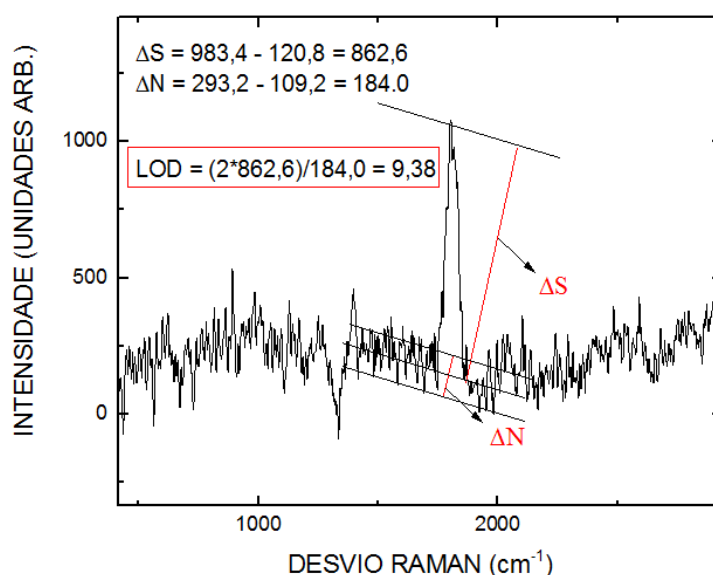
De acordo com Desimoni e Brunetti (2015) para estimar essa relação deve ser determinado o valor da intensidade da banda do ruído excluindo eventuais picos, sendo o LOD determinado pela equação 2:

$$LOD = \frac{2\Delta S}{\Delta N} = 3 \quad (2)$$

na qual ΔS é a intensidade da banda e ΔN é a intensidade do ruído.

A Figura 12 apresenta um exemplo gráfico do cálculo do LOD.

Figura 12 - Exemplo do cálculo do LOD



Fonte: o autor, 2019.

Com a relação sinal ruído multiplicada por dois, considera-se a meia largura da faixa de ruído e, com o LOD fixo em 3, qualquer resultado superior a esse valor indica que a amostra de teste contém o analito, enquanto os resultados inferiores significam que o analito está ausente (ou inferior ao LOD).

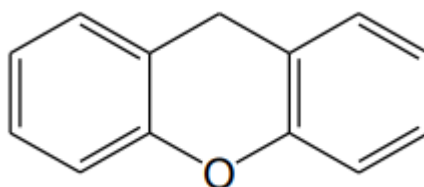
2.4. RODAMINA

Os corantes da classe dos xantenos, um dos mais antigos e mais utilizados corantes sintéticos, tendem a ser fluorescentes, dando cores brilhantes, de amarelos

rosados a vermelhos azulados. Fazem parte dessa classe de corantes as pironinas, fluoresceínas e as rodaminas (CASTRO, 2017).

A Figura 13 mostra a estrutura molecular base dessa classe de corantes.

Figura 13 - Estrutura geral dos xantenos



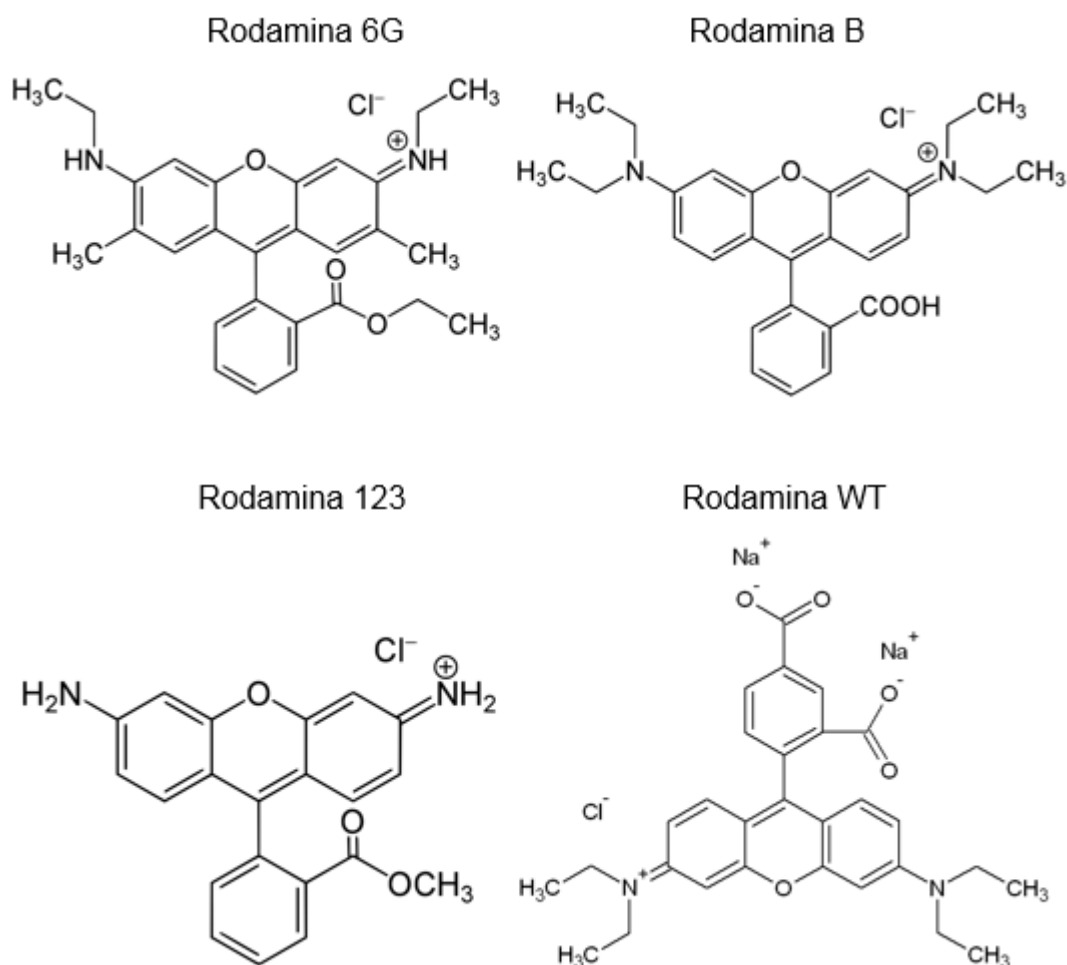
Fonte: Castro (2017).

De acordo com Souza (2013), as propriedades óticas dos corantes dependem do tipo de corante e do solvente utilizado, sendo que suas características de absorção e emissão de luz são determinadas pelos seus grupos cromóforos, os quais correspondem aos grupos funcionais da molécula e, no caso específico das rodaminas, o grupo funcional é a amina.

Devido à sua estrutura, esse grupo cromóforo apresenta vantagens em suas propriedades fotoquímicas e fotofísicas por possuírem eficiência quântica de fluorescência alta e boa fotoestabilidade, garantindo aplicações em setores da medicina. Além dessa aplicação, por causa de suas propriedades óticas e espectroscópicas, esse grupo cromóforo tem sido alvo de estudos na área de laser de corantes, pois, dependendo do solvente usado na solução, pode apresentar uma forte tendência para formar agregados moleculares (SILVA, 2010).

A Figura 14 apresenta alguns corantes da família de rodamina.

Figura 14 - Exemplos de moléculas da família de corantes rodamina



Fonte: Adaptado de Donnici et al. (2009).

A rodamina 6G é um corante catiônico, solúvel em água e em diversos solventes orgânicos, utilizado como corante em indústrias têxteis, de plásticos e de cosméticos. Sua fórmula molecular é $(C_{28}H_{29}N_2O_3Cl)$. Sua massa molar é 479,02 g/mol, possui densidade de 1,26 g/cm³.

No presente trabalho o corante rodamina 6G (R6G) foi utilizado como molécula de prova para testes de efeito *SERS*, utilizando nanopartículas de prata, em virtude de seus traços de espalhamento bem definidos e vários estudos envolvendo essa molécula e o efeito *SERS* como: QIU et al., 2008; KNEIPP et al., 1995; GÓES, 2018.

De acordo com as análises realizadas por Silva (2010), que avaliou as alterações microscópicas sofridas pelo corante por conta de agregações de nanopartículas de ouro, a banda de absorção da rodamina 6G chega a valores de até 570 nm.

3. METODOLOGIA E RESULTADOS

3.1. REAGENTES

A ablação a laser foi realizada em uma lâmina de prata (99,9%) CAS: 6440-22. Sigma Aldrich®, na presença de solução de citrato de sódio 10 mM (0.147 g / 50mL) dihidratado P.A. (99%), Biotec®, LOTE: 40128 e água deionizada de condutividade elétrica a 25°C: 2,75 μ S/cm, Cloroquímica®, LOTE: 27863, com concentrações indicadas em cada experimento.

Aos testes de fotoconversão das nanopartículas de prata foram adicionadas alíquotas indicadas em cada experimento da solução de citrato de sódio previamente citada, e do reagente Peróxido de hidrogênio P.A. (35%), Biotec®, LOTE: 51551.

O pH foi alterado nos testes de interação das nanopartículas com o analito utilizando-se alíquotas de ácido acético glacial (99.7 %), Biotec®, LOTE: 42383 e reagente hidróxido de sódio, Biotec®, LOTE:32872.

Uma solução tampão pH = 4 foi preparada com água deionizada adicionando-se 2,9 mL de ácido acético glacial, previamente citado, e 1,237 g de acetato de sódio (99%), Biotec® em um balão volumétrico classe B com 50 mL de capacidade.

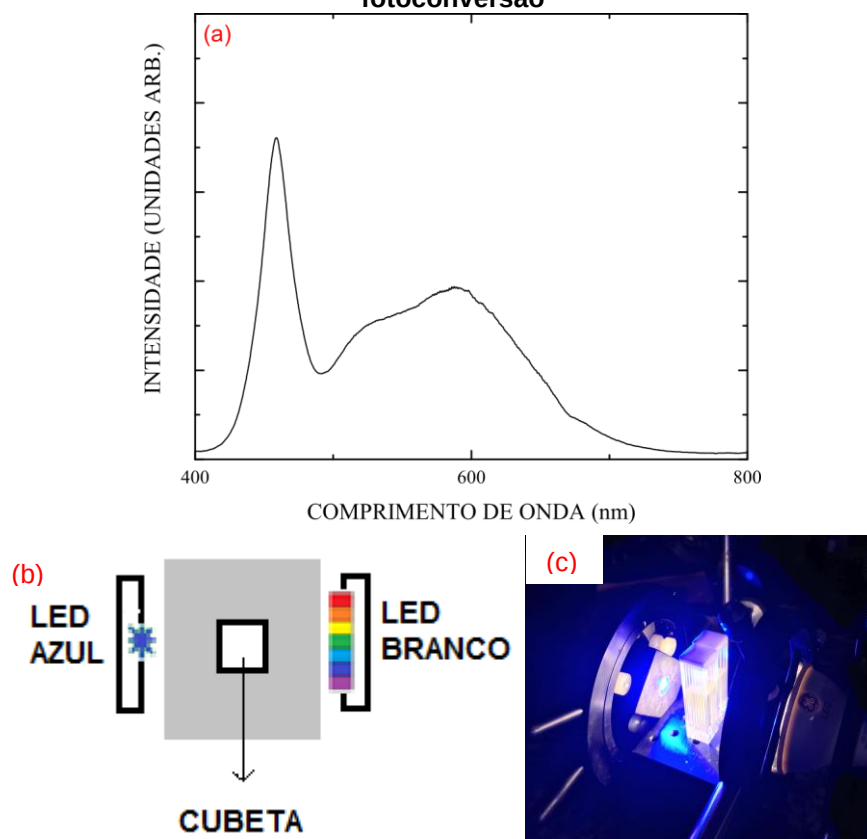
Aos testes de interação das nanopartículas por espectroscopia Raman foram adicionadas alíquotas de solução 10^{-3} mM do reagente rodamina 6G, CAS: 83697, Sigma Aldrich®, LOTE: BCBM3142V, e solução 4 mM (0,0338 g / 50 mL) do reagente glifosato CAS 1071-83-6, Sigma Aldrich®, LOTE: # SZBF243XV.

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

As nanopartículas foram produzidas por rota física de *LAL* com laser Nd: YAG 532 nm pulsado New Wave Tempest 20 (Figura 16a), pulsos de duração de 3-5 ns, taxa de repetição e energia de pulsos indicadas em cada experimento.

A fotoconversão das nanopartículas de prata foi realizada utilizando-se a combinação de um LED branco (GE 5W 4500 K) e um LED azul 470 nm, 240 mW na saída (4 V/500 mA). A Figura 15a apresenta os gráficos de emissão combinada dos LEDs, o esquema de irradiação de luz (15b) e uma imagem da estrutura experimental (15c).

Figura 15 - Espectros de emissão combinados e esquema de irradiação de luz para fotoconversão



Fonte: o autor, 2017.

(a) espectro combinado das luzes utilizadas no processo de fotoconversão, (b) esquema da disposição das luzes para irradiação da solução e (c) montagem experimental, LED azul à esquerda, ao centro duas cubetas tampadas de 4,5mL e LED branco à direita.

Os espectros de extinção foram obtidos em um espectrômetro UV/VIS Ocean Optics HR4000 e uma fonte de luz de banda larga (lâmpada halógena de filamento de tungstênio), modelo LS-01 também fabricada pela Ocean Optics, que permitem a obtenção de espectros óticos de extinção na região entre 200 nm e 1100 nm. Para os experimentos foi utilizada uma fibra ótica de 200 μm de diâmetro do núcleo, modelo P200-2-UV-VIS fornecido pela Ocean Optics, a qual leva a luz da lâmpada até um suporte para cubetas, modelo CUV-ALL-UV com quatro portas, fabricado também pela Ocean Optics. Outra fibra ótica foi utilizada com 200 μm de diâmetro do núcleo, resultando em uma resolução de aproximadamente 6,6 nm (HR4000), (Figura 16b e c), a qual leva a luz do suporte até o espectrômetro HR4000. O tempo de integração utilizado foi de 5 ms, com média de 100 espectros e taxa de aquisição de 5 vezes.

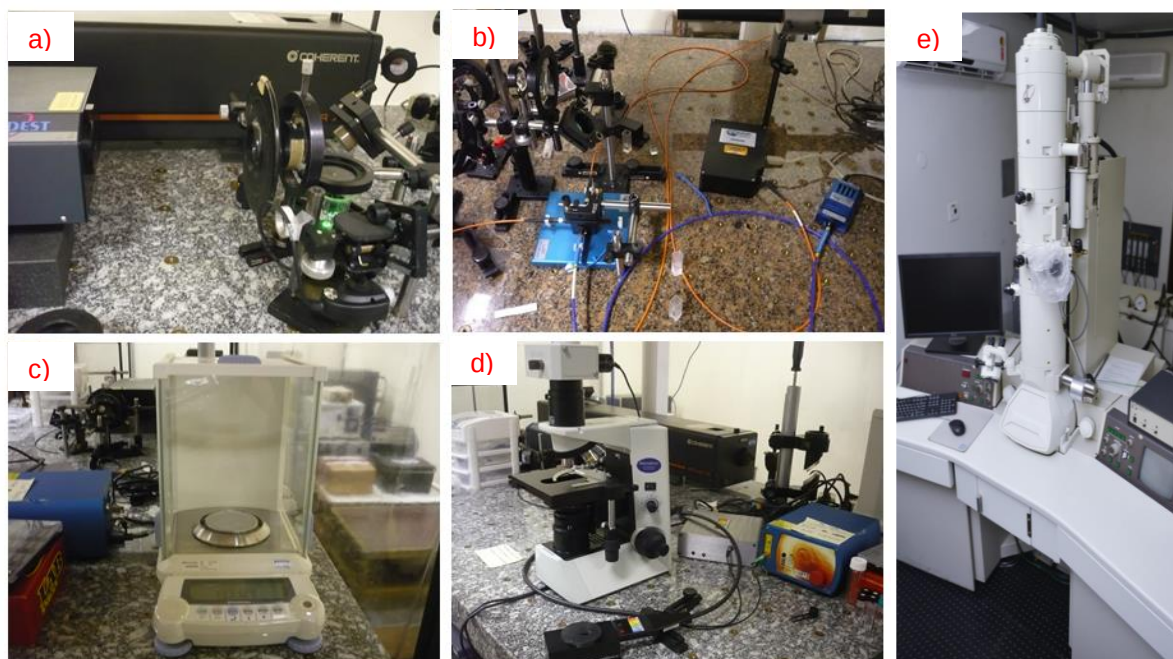
Os espectros Raman foram obtidos utilizando-se o espectrômetro da StellarNet Raman-HR-TEC-X2 (resolução de 4 cm^{-1}), laser 638 nm, 50mW, 200-3900 cm^{-1} (Figura 16d), o qual pode ser acoplado a um microscópio ótico Olympus CX31

para medir amostras sólidas e a um suporte de vial para amostras líquidas, via a ponta de prova da StellarNet Raman-Probe-638. Os parâmetros de tempo de integração e médias são descritos a cada experimento.

As massas dos reagentes sólidos foram obtidas com balança analítica Shimadzu AUW 220D, resolução de 0,01 mg (Figura 16c).

Para verificação da morfologia e tamanho das nanopartículas produzidas utilizou-se um microscópio eletrônico de transmissão (MET) marca JEOL, modelo 1200EX-II, disponível no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Este equipamento com resolução de 0,5 nm permite magnificações de até 600 kX e análises com temperatura controlada de -180 a +110°C. O registro das imagens é feito através da câmera CCD Gatan (BioScan) e da câmera de alta resolução CCD Gatan (Orius SC1000B). As imagens foram obtidas pingando-se alíquotas de 10 μ L das soluções em grades de cobre revestidas com carbono, após o período de secagem à temperatura ambiente (Figura 16e).

Figura 16 – Equipamentos utilizados para análises



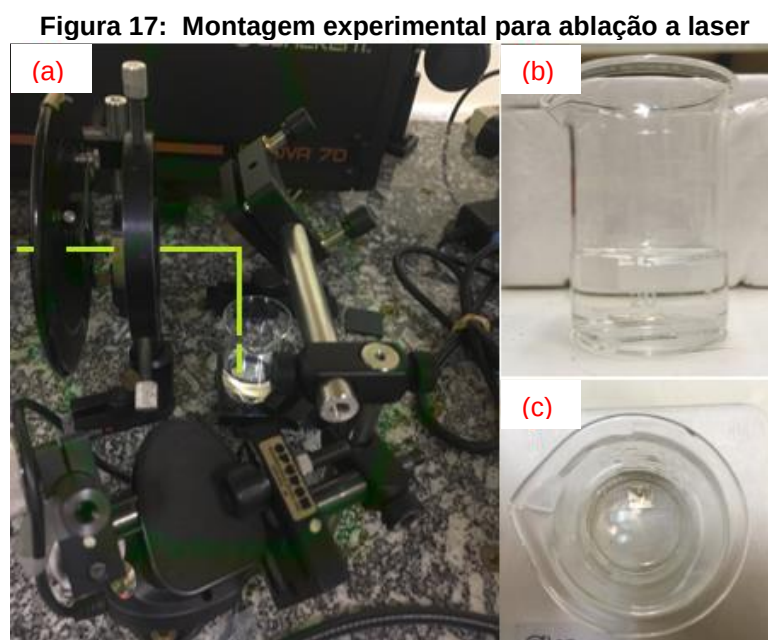
Fonte: o autor, 2019.

- (a) esquema de incidência do Laser Nd:YAG focalizado em um béquer de 20 mL. (b) disposição dos equipamentos para análise de extinção, espectrofotômetro UV/VIS Ocean Optics HR4000, fonte de luz de banda larga (lâmpada halógena de filamento de tungstênio), modelo LS-01 e fibra ótica. (c) balança analítica Shimadzu AUW 220D. (d) espectrofotômetro Raman StellarNet-HR-TEC-X2, microscópio óptico Olympus CX31 e ponta de prova Raman-Probe-638. (e) Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200EX-II – imagem do acervo digital CME UFPR.

3.3. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR ABLAÇÃO A LASER

A metodologia de síntese de Ag NPs para análises do corante rodamina 6G foi baseada no estudo de Góes (2018), realizada por ablação a laser de uma lâmina de prata.

O alvo estava submerso, com o auxílio de uma lâmina de vidro para evitar sua movimentação durante a *LAL*, em um béquer (capacidade de 25 mL) contendo 10 mL de solução 0,1 mM de citrato de sódio. O laser foi focalizado por uma lente convergente de 15 cm de distância focal e o feixe direcionado ao fundo do béquer por um espelho, conforme mostra a Figura 17.



Fonte: o autor, 2017.

(a) Béquer contendo a peça de prata e 10 mL de H₂O deionizada, posicionado para o alcance do laser Nd:YAG New 532 nm. O caminho do feixe laser é indicado em verde. (b) Vista lateral do béquer contendo a peça de prata e 10 mL de H₂O deionizada. (c) Vista superior do béquer contendo a peça de prata e 10 mL de H₂O deionizada.

A fim de definir a melhor metodologia de ablação para a síntese de solução homogênea e com a presença de nanopartículas sementes (dimensões de até 5 nm), ideais para o processo de fotoconversão conforme item (2.2.4), foram testados os parâmetros de energia de pulso do laser, taxa de repetição, tempo de ablação e temperatura ambiente.

A tabela 5 apresenta a relação dos parâmetros e dos valores escolhidos para os testes.

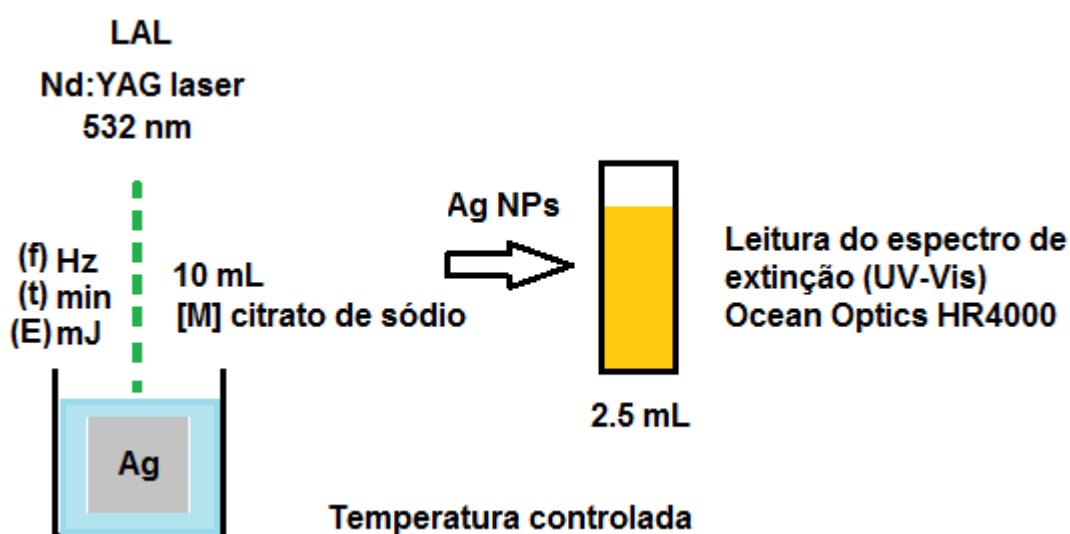
Tabela 5 - Parâmetros testados para definição de metodologia de ablação a laser

PARÂMETROS AVALIADOS	VALORES
Energia de pulso (mJ)	12 e 17
Taxa de repetição (Hz)	10 e 15
Tempo de ablação (min)	20 e 30
Temperatura ambiente ($\pm 0,6^{\circ}\text{C}$)	16, 18, 20 e 22

Fonte: o autor, 2018.

A Figura 18 apresenta o diagrama das análises realizadas.

Figura 18 - Diagrama de análises realizadas para definição da metodologia de ablação



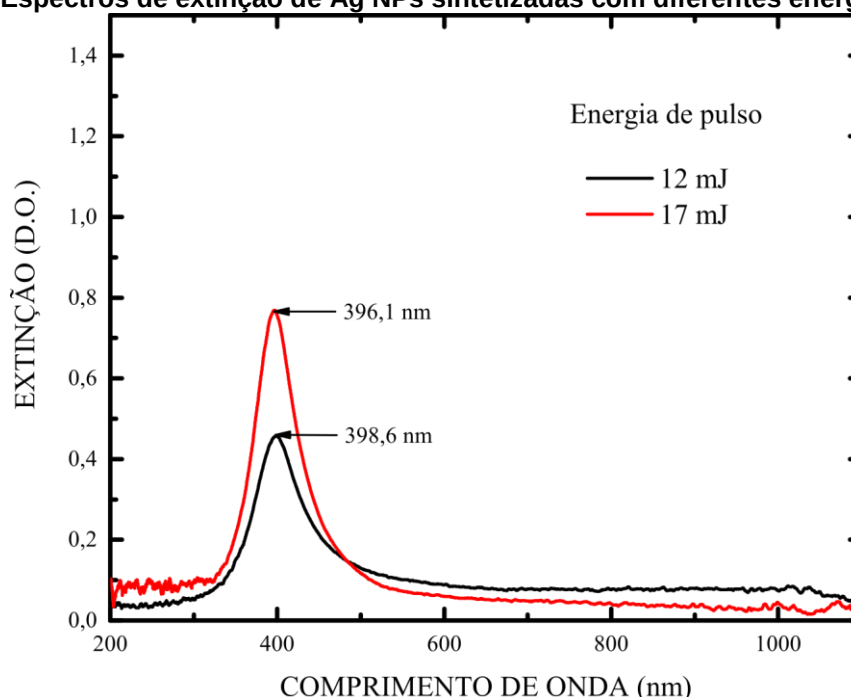
Fonte: o autor, 2018.

3.3.1 Resultados da síntese de nanopartículas de prata por ablação a laser

3.3.1.1 Resultados do parâmetro energia de pulso do laser

Os espectros de extinção para diferentes energias de pulso do laser e os comprimentos de onda de pico são apresentados na Figura 19.

Figura 19 - Espectros de extinção de Ag NPs sintetizadas com diferentes energias de pulso



Fonte: o autor, 2018.

Nota: as setas indicam os comprimentos de onda de pico de cada amostra.

Conforme a Figura 19, para a energia de pulso de 12 mJ, o espectro de extinção apresenta comprimento de onda de pico em 398,6 nm (nanopartículas com 5 – 10 nm de dimensão) e densidade ótica de 0,46.

Para a energia de pulso do laser de 17 mJ, o espectro de extinção mostra um comprimento de onda de pico em 396,1 nm (5 – 10 nm) e densidade ótica de 0,77.

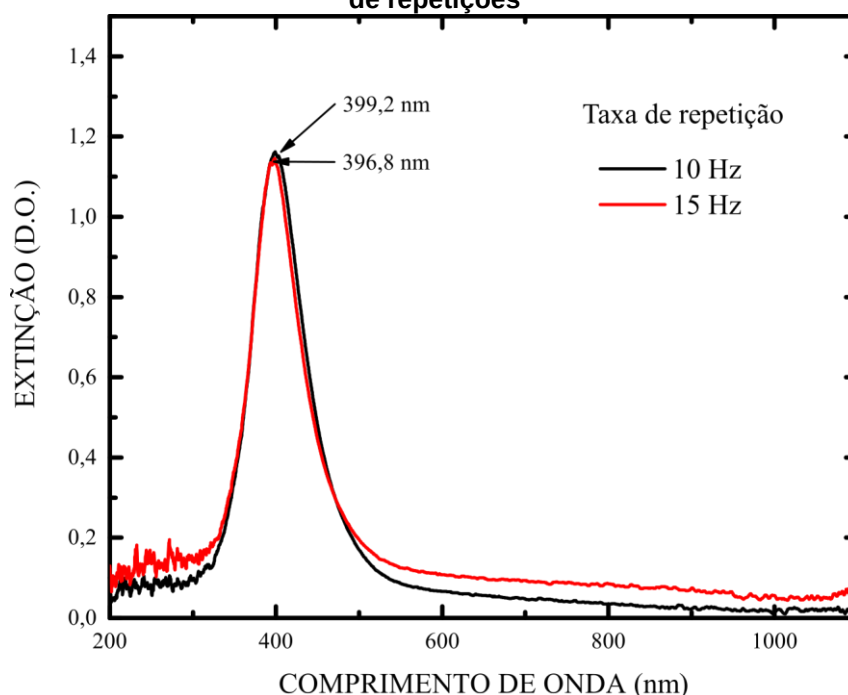
Verifica-se o desvio para o azul da banda *LSPR* da amostra de 17 mJ, quando comparado ao espectro obtido para a energia de pulso de 12 mJ, o que, de acordo com a teoria de Gustav Mie (1908), indica a síntese de nanopartículas menores.

A densidade ótica mais elevada por sua vez indica uma maior concentração de nanopartículas em solução. Além disso, a largura de 32,6 nm (FWHM) da banda da solução com 17 mJ mostra-se mais estreita, quando comparada às nanopartículas sintetizadas com 12 mJ de energia de pulso com largura de 39,1 nm (FWHM). Esses resultados foram observados também por Borrero (2015) em seus testes com energias de pulso de 10 e 25 mJ, e é atribuído à síntese de nanopartículas com uma distribuição de tamanhos mais homogênea para pulsos de maior energia.

3.3.1.2. RESULTADOS DO PARÂMETRO TAXA DE REPETIÇÃO DE PULSO DO LASER

Os resultados do parâmetro taxa de repetição de pulso do laser podem ser observados na Figura 21.

Figura 20 - Espectros de extinção de nanopartículas de prata sintetizadas com diferentes taxas de repetições



Fonte: o autor, 2018.

Nota: as setas indicam os comprimentos de onda de pico de cada amostra.

Conforme a Figura 20, para a taxa de repetição de 10 Hz, o espectro de extinção apresentou comprimento de onda de pico em 399,2 nm (nanopartículas com 5 – 10 nm de dimensão) e densidade ótica de 1,16.

Para a taxa de repetição de 15 Hz, o espectro de extinção mostra um comprimento de onda de pico em 396,8 nm (5 – 10 nm) e densidade ótica de 1,14, variação de apenas 0,02 em relação à primeira ablação mencionada.

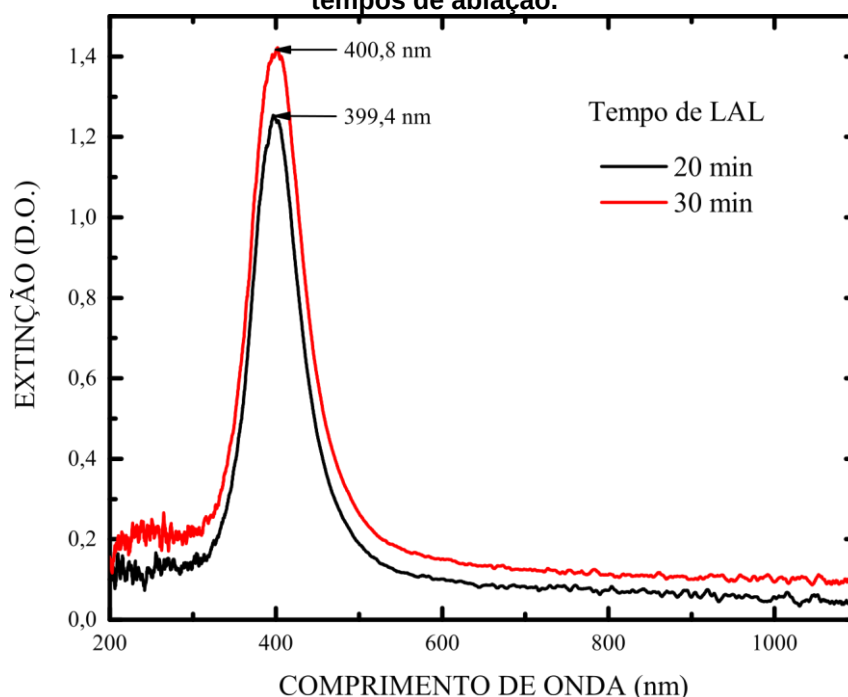
A comparação dos espectros obtidos permite observar que com o aumento da taxa de repetição na ablação ocorreram discretas alterações no espectro de extinção das nanopartículas de prata, com uma proximidade na concentração de nanopartículas em solução, analisadas pela densidade ótica dos espectros. Pode-se verificar também que para a maior taxa de repetição ocorreu a síntese de nanopartículas menores, caracterizadas pelo menor comprimento de onda de pico

deslocado para o azul, e com distribuição de tamanhos mais homogênea, com uma largura de 37,3 nm (FWHM), menor quando comparada às nanopartículas sintetizadas com 10 Hz de taxa com uma largura de 40,0 nm (FWHM). Uma desvantagem para o aumento da taxa de repetição durante o processo de ablação foi a grande movimentação da peça de prata mesmo com a lâmina de vidro auxiliando na segurança da peça submersa.

3.3.1.3 Resultados do parâmetro tempo de ablação

Os resultados do parâmetro tempo de ablação podem ser observados na Figura 21.

Figura 21 - Espectros de extinção de nanopartículas de prata sintetizadas com diferentes tempos de ablação.



Fonte: o autor, 2018.

Nota: as setas indicam os comprimentos de onda de pico de cada amostra.

Para o tempo de ablação de 20 minutos, o espectro de extinção apresentou comprimento de onda de pico em 399,4 nm (5 – 10 nm) e densidade ótica de 1,25.

Para o tempo de ablação de 30 minutos, o espectro de extinção mostra um comprimento de onda de pico em 400,8 nm (nanopartículas com dimensões superiores a 10 nm) e densidade ótica de 1,41, indicando uma maior concentração de nanopartículas de prata em solução.

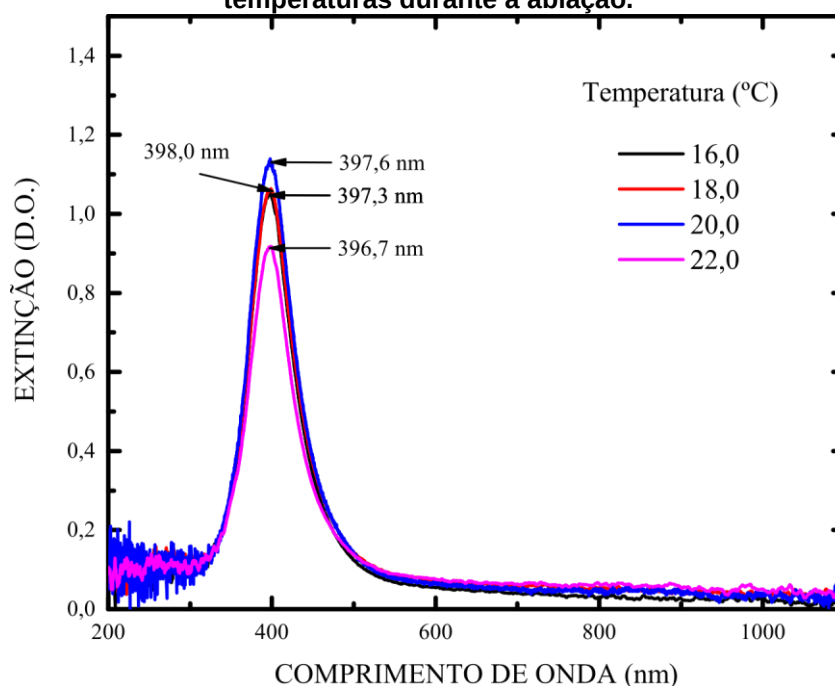
A comparação dos espectros permite observar que com o aumento do tempo de ablação ocorreu a síntese de uma maior concentração de nanopartículas de prata, analisada pela densidade ótica dos espectros. Pode-se verificar também que para o tempo de ablação menor ocorreu a síntese de nanopartículas menores, devido ao menor comprimento de onda de pico, e mais homogêneas, apresentando uma largura de banda de 37,4 nm (FWHM), mais estreita quando comparadas às nanopartículas sintetizadas com 30 minutos com largura de banda de 40,0 nm (FWHM).

Tal fato pode ser explicado pelo processo de agregação das nanopartículas de prata apresentados no item 2.2.2. Com um maior tempo de ablação, mais nanopartículas serão sintetizadas, porém as nanopartículas que já estão em solução sofrem agregação e resultam em um comprimento de onda de pico deslocado para maiores valores.

3.3.1.4 Resultados do parâmetro temperatura ambiente

Os espectros de extinção para diferentes temperaturas ambiente e os comprimentos de onda de pico são apresentados na Figura 22.

Figura 22 - Espectros de extinção de nanopartículas de prata sintetizadas com diferentes temperaturas durante a ablação.



Fonte: o autor, 2018.

Nota: as setas indicam os comprimentos de onda de pico de cada amostra.

A sequência crescente de comprimento de onda de pico é: 22,0 °C, 20,0 °C, 18,0 °C e 16,0 °C, com valores de 396,7, 397,3, 397,6 e 398,0 nm, respectivamente. As temperaturas de 22,0 °C e 16,0 °C apresentaram largura de banda de 33,2 nm (FWHM) e as temperaturas de 18,0 °C e 20,0 °C apresentaram o valor de 34,9 nm. Por fim, a sequência crescente de densidade ótica é: 22,0 °C, 16,0 °C, 18,0 °C e 20,0 °C, com valores de 0,92, 1,05, 1,07 e 1,14, respectivamente. De acordo com as sequências apresentadas, foi constatado que para a síntese de solução coloidal com maior homogeneidade de tamanhos e que apresentem nanopartículas “sementes”, a temperatura de 22,0 °C é a mais adequada, com a desvantagem de uma menor concentração de nanopartículas em solução.

Esse resultado também foi observado por Romani (2011), e foi explicado com base na teoria de Mie (1908), a qual mostra a dependência da banda de ressonância com o fator de preenchimento (relação entre os volumes da nanopartícula e total da amostra). De acordo com a teoria, um aumento no fator de preenchimento resulta num desvio para o azul da banda de ressonância. Considerando que o aumento na temperatura ocasiona em um aumento de volume das nanopartículas metálicas, maior do que a dilatação volumétrica do líquido, o fator de preenchimento também será aumentado e o pico deslocado para menores comprimentos de onda.

Considerando os resultados apresentados, foi determinada a metodologia de síntese de nanopartículas de prata, apresentada na tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros definidos após a realização dos testes

PARÂMETROS	VALORES
Energia de pulso (mJ)	17
Taxa de repetição (Hz)	10
Tempo de ablação (min)	20
Temperatura ambiente ($\pm 0,6^\circ\text{C}$)	22,0

Fonte: o autor, 2018.

Foi definido um menor tempo de ablação para a síntese de nanopartículas sementes com dimensões de 2 – 4 nm, temperatura da sala controlada a 22,0 °C para obtenção de nanopartículas homogêneas e uma maior energia de pulso, de maneira a compensar a baixa densidade ótica apresentada com menores tempos e maiores temperaturas e também por apresentar nanopartículas com distribuição de tamanhos mais homogênea e com menores comprimentos de onda de pico. A taxa de repetição

em 10 Hz foi mantida, por causa da grande movimentação da peça de prata com uma maior taxa e por não apresentar uma variação significativa no espectro de extinção.

3.4. MUDANÇA DE FORMA FOTOINDUZIDA DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA (PISC)

A síntese de nanopartículas de prata com diferentes formatos foi baseada no estudo de Ciou et al. (2009) a qual foi realizada a partir da rota física *LAL* com posterior irradiação de diferentes comprimentos de onda para conversão de nanoesferas à nanoprismas.

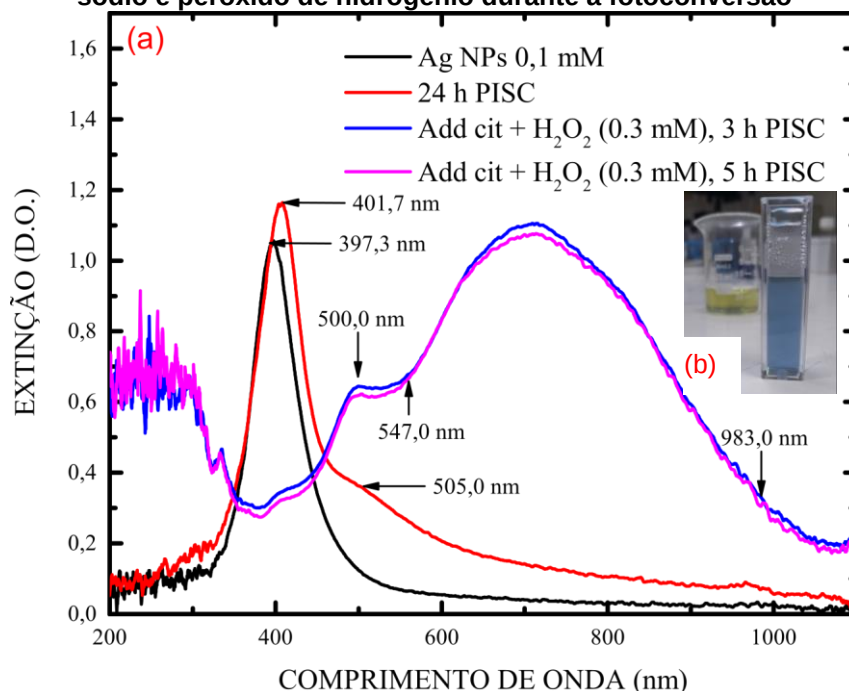
Após a definição dos parâmetros da *LAL*, a concentração de citrato de sódio e a concentração de peróxido de hidrogênio foram avaliadas no processo de fotoconversão.

O citrato de sódio e o peróxido de hidrogênio são reagentes limitantes para o processo de fotoconversão, pois atuam como agentes redutor e oxidante das nanopartículas sementes, as quais geram as nanopartículas prismáticas (reações 1.1, 1.2, 1.3 e 1.4). A falta desses componentes em solução resultaria em uma fotoconversão incompleta.

A fim de confirmar essa hipótese, foi realizada a fotoconversão de uma alíquota de 3 mL de solução de Ag NPs com uma concentração inicial de 0,1 mM de sal citrato de sódio e 0,5 μ L de peróxido de hidrogênio. Após o período de 24 horas de irradiação, foram adicionados à solução mais 50 μ L de citrato de sódio e 1 μ L de peróxido de hidrogênio, resultando em uma solução de 0,3 mM de citrato de sódio e 1,5 μ L de peróxido de hidrogênio e analisados os espectros de extinção após os períodos adicionais de fotoconversão de 3 e 5 horas.

A leitura do espectro de extinção é apresentada na Figura 23.

Figura 23 - Espectros de extinção da solução com variação da concentração de citrato de sódio e peróxido de hidrogênio durante a fotoconversão



Fonte: o autor, 2018.

(a) os espectros foram coletados após a ablação e após 24 h de fotoconversão para as concentrações de 0,1 mM de citrato de sódio e 0,5 μ L de H₂O₂, e 3h e 5h após a adição de mais 50 μ L do sal e 1 μ L de H₂O₂. (b) comparação da coloração das soluções antes e após a fotoconversão.

O comprimento de onda de pico da solução após a ablação estava em 397,3 nm e, após o período de 24 horas de fotoconversão, esse pico deslocou-se para 401,7 nm, indicando a diminuição das nanopartículas com menores dimensões (“sementes”) em solução, e o surgimento de uma pequena banda, com comprimento de onda de pico em 505 nm, como prevê a teoria de conversão de formato apresentada no item 2.2.4. Tal comportamento indica o crescimento de nanodiscos em função do consumo das nanopartículas sementes, as quais se depositam em sítios específicos das nanopartículas com maiores dimensões e geram novas estruturas. A presença da banda de nanoesferas com maiores dimensões após o período de irradiação mostra uma fotoconversão incompleta.

Após a adição dos reagentes e um período adicional de 3 horas de fotoconversão, a amostra já apresentava coloração azul (Figura 23b), desaparecimento da banda com pico em 401,7 nm, indicando uma conversão completa e surgimento de pico em 500 nm, abrangendo a faixa de comprimento de onda de nanodiscos, intermediários na conversão de nanoesferas a nanoprismas. Os nanohexágonos e nanoprismas são indicados por uma banda larga com alcance de

547 nm a 983 nm, indicando uma distribuição heterogênea de tamanhos, conforme a teoria de Gustav Mie e o estudo de Langille, Personik e Mirkin (2013).

Após a análise dos resultados e, com o objetivo de verificar a influência de cada reagente, eles foram adicionados isoladamente no processo de fotoconversão.

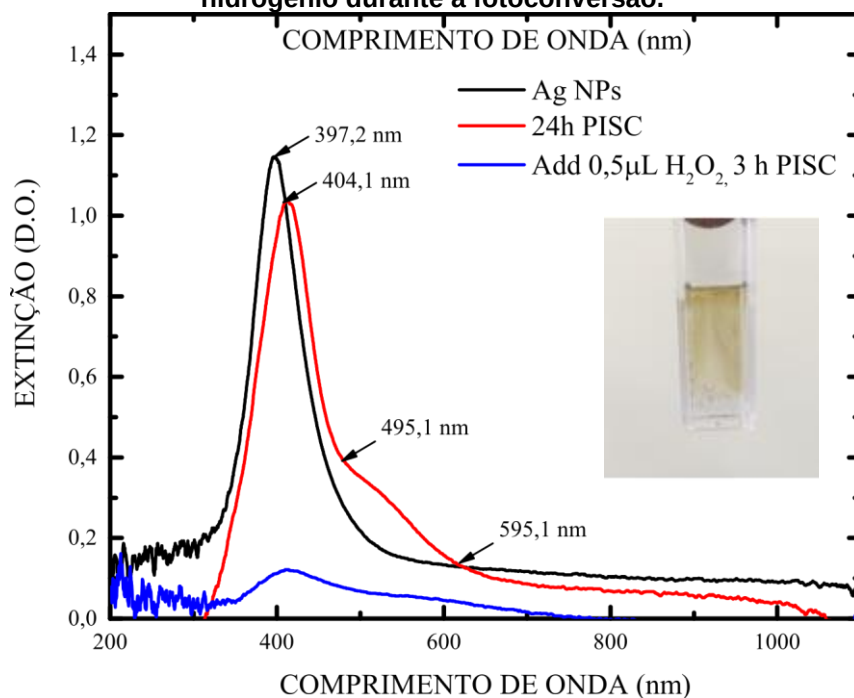
3.4.1 Análise da influência de peróxido de hidrogênio

Foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução de Ag NPs contendo 0,1 mM de citrato de sódio, transferida para uma cubeta e levada para irradiação. Foi adicionada uma alíquota de 0,5 μ L de peróxido de hidrogênio.

Após o período de 24 horas de fotoconversão e leitura do espectro de extinção, a concentração de peróxido de hidrogênio foi aumentada com a adição de 1 μ L do reagente e após o período adicional de três horas de fotoconversão a leitura do espectro de extinção foi realizada novamente.

A Figura 24 apresenta a leitura dos espectros de extinção e imagem da solução após o período adicional de fotoconversão.

Figura 24 - Espectro de extinção e imagem da solução com diferentes alíquotas de peróxido de hidrogênio durante a fotoconversão.



Fonte: o autor, 2018.

O espectro após o período de 24 horas (espectro de cor vermelha) apresentou um comportamento semelhante ao espectro apresentado na Figura 23, com o deslocamento do comprimento de onda de pico das nanoesferas de 397,2 nm para 404,1 nm, comportamento atribuído à diminuição na concentração de nanopartículas sementes em solução, e o crescimento de uma nova banda na região de 495 nm a 595 nm, atribuída a nanodiscos e nanohexágonos em solução. A presença da banda das nanoesferas indica uma fotoconversão incompleta.

Após três horas da adição de H_2O_2 (espectro de cor azul) a solução perdeu a coloração amarela, característica das nanoesferas de prata (Figura 24) e é possível observar pela leitura do espectro de extinção a diminuição significativa das bandas apresentadas no espectro após 24 horas de irradiação (cor vermelha). Esse resultado foi atribuído à oxidação quase total das nanopartículas em solução pelo excesso de agente oxidante H_2O_2 .

3.4.2 Análise da influência de citrato de sódio

Conforme apresentado no item 2.2.4, o sal citrato de sódio possui uma dupla função no processo: estabilizante e redutor de íons Ag^+ , essenciais para a fotoconversão.

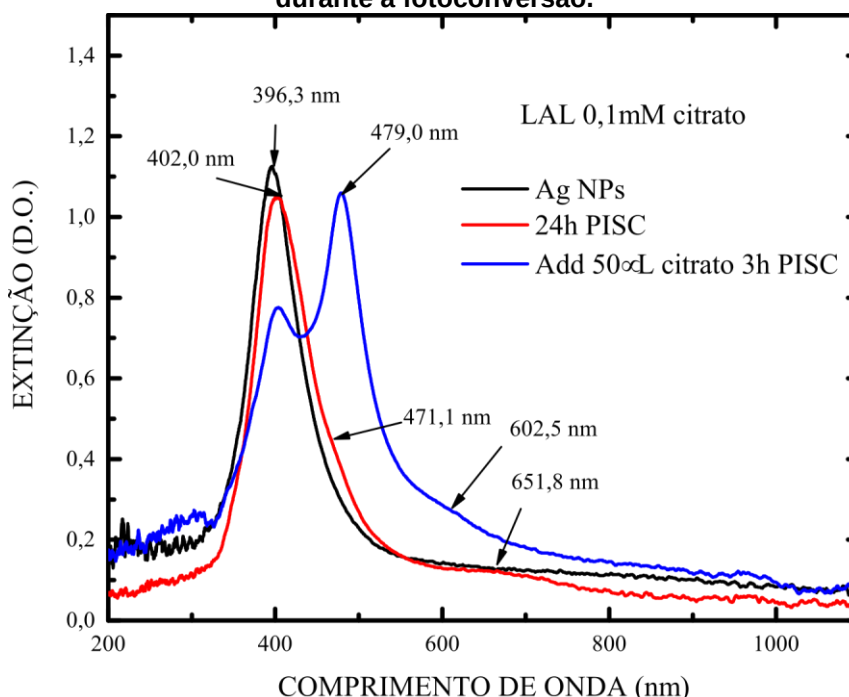
Foram realizados testes de concentração de citrato de sódio para a verificação de suas funções.

3.4.2.1 Citrato de sódio como redutor de íons ag^+

Foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução de Ag NPs contendo 0,1 mM de citrato de sódio, transferida para uma cubeta e levada para irradiação. Foi adicionada uma alíquota de 0,5 μL de peróxido de hidrogênio. Após o período de 24 horas de fotoconversão e leitura do espectro de extinção, a concentração de citrato de sódio foi aumentada com a adição de 50 μL do reagente, resultando em uma solução com concentração 0,3 mM de citrato de sódio e, após o período adicional de 3 horas de fotoconversão, a leitura do espectro de extinção foi realizada novamente.

Os espectros são apresentados na Figura 25.

Figura 25 - Espectros de extinção da solução com diferentes concentrações de citrato de sódio durante a fotoconversão.



Fonte: o autor, 2018.

(a) espectro de extinção do teste de adição de peróxido de hidrogênio. (b) espectro de extinção do teste de adição de citrato de sódio.

Notas: os espectros foram coletados após a ablação e passadas 24 h de fotoconversão para os dois testes e após 3 h da adição dos reagentes. As setas pretas indicam o comprimento de onda de pico das bandas de plasmon.

O espectro de extinção após 24 horas de irradiação apresentou um deslocamento do comprimento de onda de pico para um maior valor, indicando o consumo das nanoesferas sementes, a formação de banda secundária na base da banda de nanoesfera com comprimento de onda em 471 nm atribuída a nanodiscos, e a formação de uma pequena banda com pico em 652 nm que abrange a faixa de comprimentos de onda de nanoprismas.

Após 3 horas da adição do sal (espectro azul) a da banda em 402 nm atribuída às nanoesferas apresentou um decréscimo na densidade ótica, e ocorreu o surgimento de uma banda com pico em 479 nm e densidade ótica de 1,06, atribuída à combinação dos comprimentos de onda indicadores de nanodiscos e vibrações quadrupolo de nanoprismas, e uma pequena banda em 602 nm, característica de vibrações dipolo de nanoprismas, descritas por Saade (2013), conforme Figura 8. Esse resultado demonstra que a adição de apenas citrato de sódio à solução não foi capaz de converter completamente as nanoesferas em nanoprismas, resultando em uma alta concentração do produto intermediário.

Considerando os resultados apresentados, concluiu-se que para uma fotoconversão completa é necessária a oxidação das nanoesferas pelo reagente H_2O_2 , com uma concentração suficiente a qual evitasse a oxidação total das nanopartículas e possibilitasse a posterior redução por ação do sal citrato de sódio.

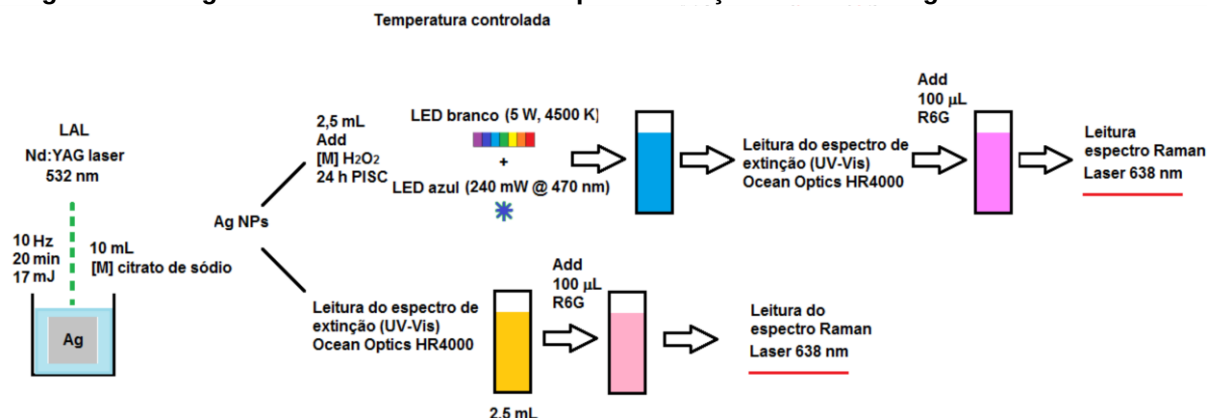
3.4.2.2 Citrato de sódio como estabilizante e SERS da rodamina 6G

Conforme apresentado no item 2.2.2, o sal citrato de sódio estabiliza as nanopartículas por meio do processo de capeamento, evitando a agregação e crescimento das nanoesferas. Para avaliação dessa função estabilizante utilizou-se espectroscopia Raman para verificação da interação das nanopartículas com a molécula de prova corante rodamina 6G por efeito SERS, após a ablação e após a fotoconversão.

Foram sintetizadas soluções de nanopartículas de prata com diferentes concentrações de sal citrato de sódio de 0,1, 0,3 e 0,6 mM e realizadas as leituras em espectrômetro de extinção e Raman.

A Figura 26 apresenta o diagrama de análises.

Figura 26 - Diagrama de análises realizadas para definição da metodologia de fotoconversão

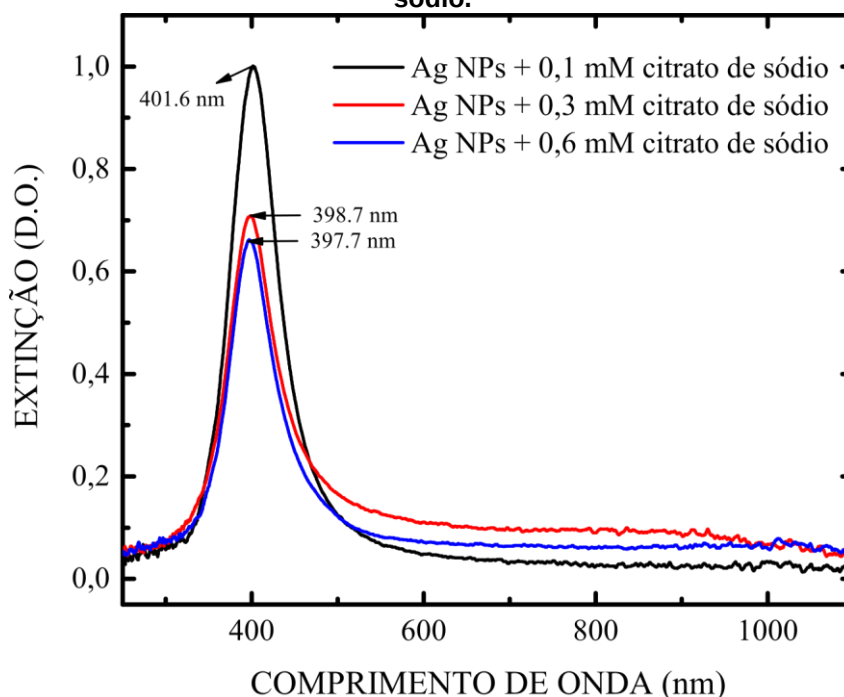


Fonte: o autor, 2018.

3.4.2.2.1 Resultados para a amostra após a ablação

Primeiramente uma alíquota de 2,5 mL foi retirada de cada solução de Ag NPs contendo 0,1, 0,3 e 0,6 mM de citrato de sódio após a ablação, transferida para uma cubeta e realizada a leitura do espectro de extinção (Figura 27).

Figura 27 - Espectros de extinção das soluções contendo 0,6 mM, 0,3 mM, 0,1mM de citrato de sódio.



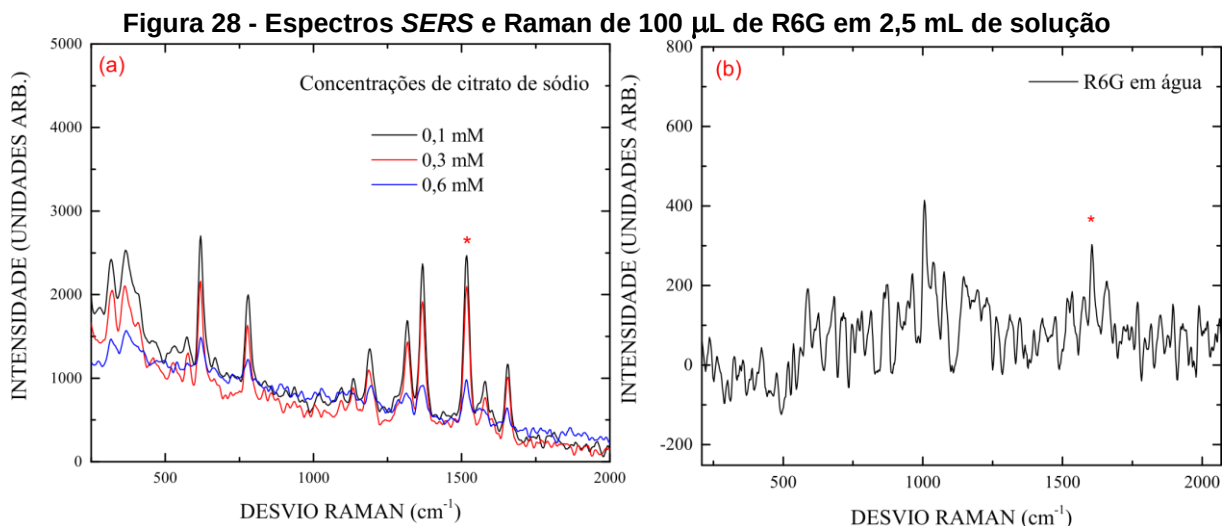
Fonte: o autor, 2018.

O espectro de extinção para a concentração de 0,1 mM de citrato de sódio (em preto) apresentou comprimento de onda de pico em 401,6 nm (nanopartículas com dimensões superiores a 10 nm) e densidade ótica de 1,00. Para a concentração de 0,3 mM (cor vermelha) o comprimento de onda de pico foi 398,7 nm (5 – 10 nm) e a densidade ótica de 0,71. Por fim, para a concentração de 0,6 mM (cor azul) o comprimento de onda de pico estava centrado em 397,7 nm (5 – 10 nm) e a densidade ótica foi de 0,67.

A partir dos dados de comprimento de onda de pico mencionados, é possível observar que com o aumento da concentração de citrato o comprimento de onda de pico desloca-se para o azul, indicando a síntese de nanopartículas com menores dimensões. Tal comportamento concorda com a teoria de estabilização do sal citrato de sódio, pois quanto mais capeadas as nanopartículas estiverem, menor será a agregação, resultando em nanopartículas com dimensões menores.

Porteriormente foram adicionados a essas soluções 100 μ L de solução 10^{-3} mM de rodamina 6G e realizada a leitura do espectro *SERS*. A mesma análise foi realizada com uma cubeta contendo 2,5 mL de água e 100 μ L de rodamina para comparação do espectro Raman do corante.

Para as interrogações utilizou-se um tempo de integração de 2000 ms e 5 médias, apresentadas na Figura 28.



Fonte: o autor, 2018.

(a) Espectro SERS para as soluções de nanopartículas de prata com concentrações de 0,1 mM, 0,3 mM, 0,6 mM de citrato de sódio, (b) espectro Raman do corante rodamina em água. Nota: os espectros foram separados para uma melhor visualização da banda utilizada como referência, indicada por (*)

As intensidades, com referência na banda na região de 1517 cm^{-1} , foram calculadas pela subtração da intensidade do pico pela intensidade da base da banda. Adicionalmente foi realizado o cálculo da relação das intensidades, determinado pela divisão da intensidade da banda em 1517 cm^{-1} (SERS) pela equivalente Raman da Figura 28b. Os valores constam na tabela 7.

Tabela 7 – Comparação entre os valores de intensidade da banda em 1517 cm^{-1} para diferentes amostras contendo $100\text{ }\mu\text{L}$ de R6G

AMOSTRA	INTENSIDADE DO PICO (unidades arbitrárias)	INTENSIDADE DA BASE (unidades arbitrárias)	INTENSIDADE DA BANDA EM 1517 cm^{-1}	RELAÇÃO DAS INTENSIDADES (SERS/Raman)
R6G em água	303	26	277	-
0,1 mM	2469	547	1922	6,94
0,3 mM	2104	457	1647	5,95
0,6 mM	4693	3282	517	1,87

Fonte: o autor, 2018

A comparação das intensidades dos espectros SERS das soluções evidencia que com o aumento da concentração do sal na solução, o SERS da rodamina torna-se

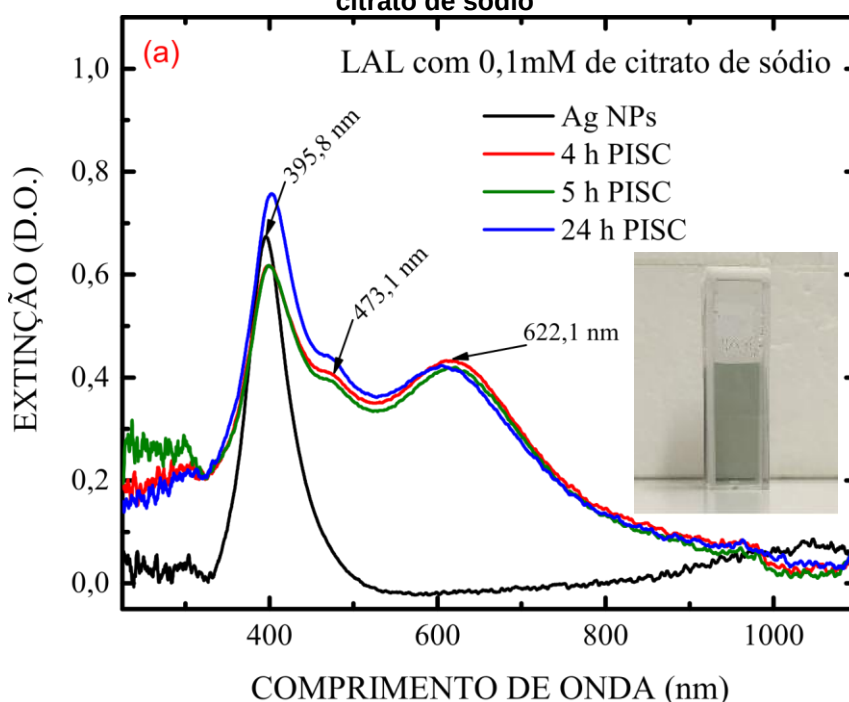
menos intenso. Esse comportamento concorda com a discussão dos resultados apresentados pelos espectros de extinção (Figura 27) sobre o processo de estabilização das nanopartículas. Concluiu-se que o aumento de citrato de sódio em solução resulta na síntese de nanopartículas menores, porém mais estáveis, dessa forma o efeito *SERS* é prejudicado pela diminuição da interação das nanopartículas com o analito. Considerou-se a intensidade apresentada pelas três soluções e a concentração de 0,6 mM foi descartada dos testes devido à pequena intensificação apresentada por essa solução.

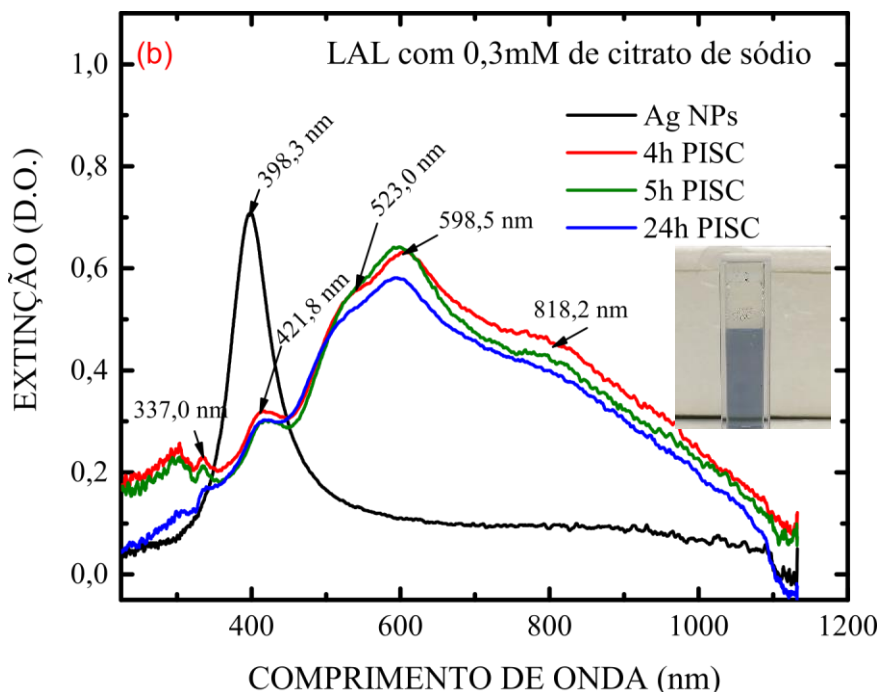
3.4.2.2.2 Resultados para a amostra após a fotoconversão

Novas alíquotas de 2,5 mL das soluções contendo 0,1 e 0,3 mM de citrato de sódio foram transferidas para cubetas e passaram por irradiação de 24 horas com alíquotas de 0,5 e 1,5 μL de peróxido de hidrogênio, respectivamente, de forma a manter constante a relação com a concentração de citrato de sódio.

Foram realizadas as leituras dos espectros de extinção, após os períodos de 4, 5 e 24 horas, apresentados na Figura 29.

Figura 29 - Espectros de extinção e imagens das soluções testes para a concentração de citrato de sódio





Fonte: o autor, 2018.

(a) os espectros foram retirados passados 4 h, 5 h e 24 h para a amostra contendo 0,1 mM de citrato de sódio, à direita: imagem da solução após 24 h de fotoconversão. (b) os espectros foram retirados passados 4 h, 5 h e 24 h para a amostra contendo 0,3 mM de citrato de sódio, à direita: imagem da solução após 24 h de fotoconversão.

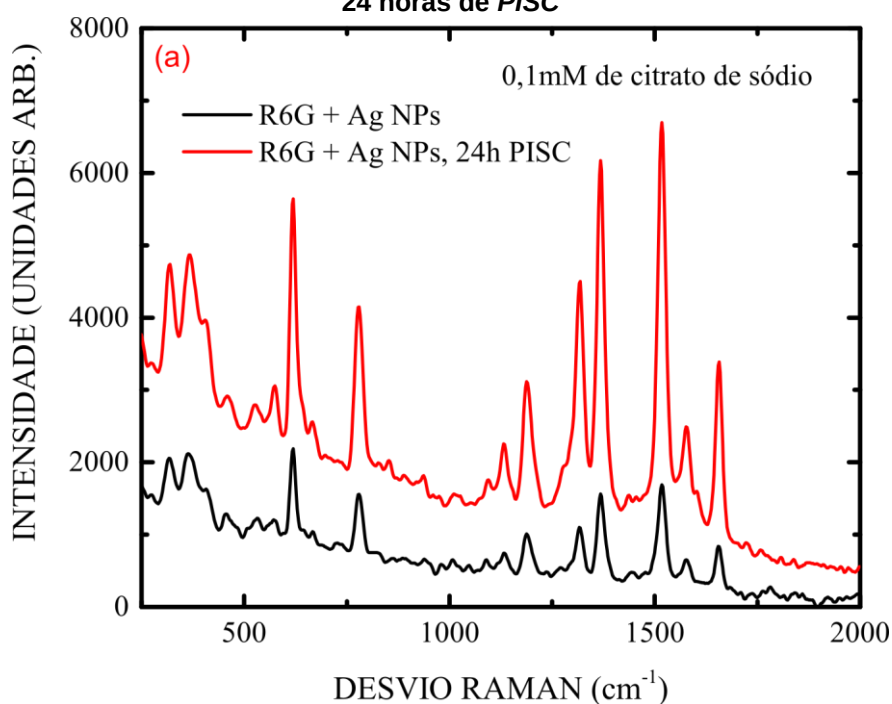
Para a amostra de 0,1 mM de citrato de sódio, o espectro de extinção apresentou um comprimento de onda de pico de 395,8 nm (nanopartículas com dimensões na faixa de 2 – 4 nm) e densidade ótica de 0,68. Após o período de fotoconversão a solução apresentou uma coloração esverdeada e com a análise do espectro de extinção é possível observar o surgimento de duas bandas distintas à banda de nanopartículas esféricas, já na 4ª hora de acompanhamento, com picos em 473,1 e 622,1 nm, característicos de diferentes vibrações de nanoprismas de prata (quadrupolo e dipolo, respectivamente), conforme Figura 8. Mesmo após o período de 24 horas de fotoconversão as bandas permanecem e a presença da banda em torno de 400 nm indica um processo de conversão incompleto, pois as nanoesferas ainda estavam presentes em solução.

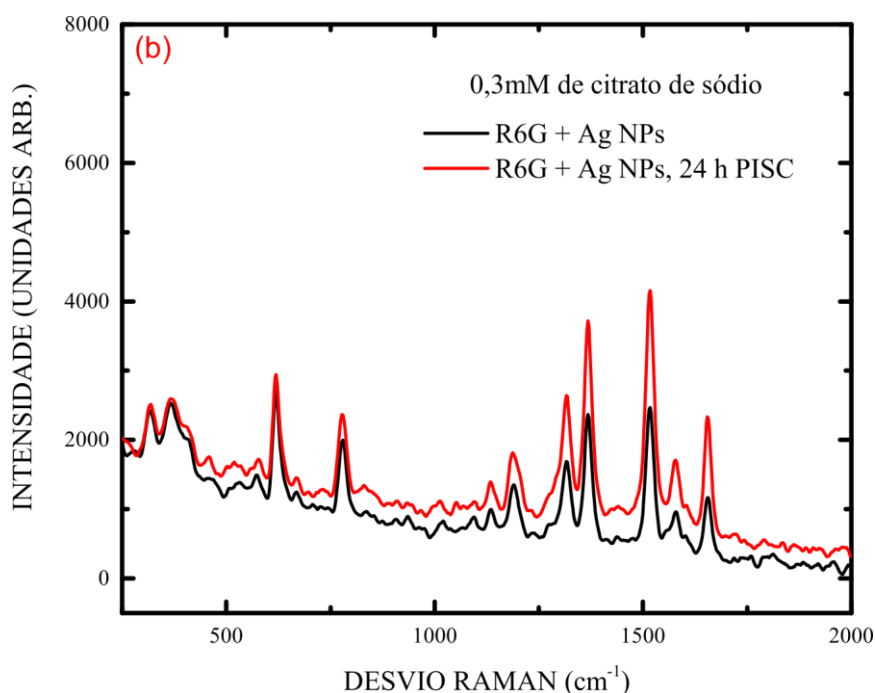
Para a amostra de 0,3 mM de citrato de sódio o comprimento de onda de pico foi 398,3 nm (5 – 10 nm) e densidade ótica de 0,71. Após o período de fotoconversão a solução apresentou uma coloração azul e a partir da análise do espectro de extinção já na 4ª hora de fotoconversão, é possível observar o surgimento de duas bandas com comprimento de onda de pico em 337,0 nm e 421,8 nm e uma banda larga com 3 picos: 523,0 nm, 598,5 nm e 818,2 nm. As pequenas bandas com picos em 337,0 nm e 421,8

nm foram atribuídas às vibrações de ressonâncias plasmônicas quadrupolo e dipolo de nanoprismas fora do plano. A banda larga foi atribuída à presença de nanoprismas em solução com grande variedade de tamanhos. Após o período de 24 horas de fotoconversão as bandas citadas permaneceram e o desaparecimento do pico em 398,3 nm indica um processo de conversão completo.

Posteriormente foram realizadas as leituras de espectroscopia Raman para as soluções contendo alíquotas de 100 μL de rodamina 6G. A Figura 30 apresenta a comparação dos espectros obtidos antes (já apresentados na Figura 28a) e após o processo de fotoconversão.

Figura 30 - Espectros Raman das soluções contendo 100 μL de R6G antes e após o período de 24 horas de PISC





Fonte: o autor, 2018.
(a) 0,1 mM e (b) 0,3 mM de citrato de sódio.

A banda em 1517 cm⁻¹ foi utilizada como referência para os cálculos de intensificação, realizados conforme a mesma metodologia apresentada no item 3.4.2.2.1.

Os valores constam na tabela 8.

Tabela 8 – Intensidade da banda na região de 1517 cm⁻¹ antes e após a fotoconversão.

CITRATO DE SÓDIO (mM)	INTENSIDADE (unidades arb.)		RELAÇÃO (antes/após)
	<i>Antes da PISC</i>	<i>Após a PISC</i>	
0,1	1442	5709	4,0
0,3	1824	3133	1,7

Fonte: o autor, 2019.

Os resultados mostram que o efeito de intensificação *SERS* foi mais eficiente para a amostra com 0,1 mM de citrato de sódio, apesar da amostra não exibir o processo total de conversão de formato. A explicação para tal comportamento foi baseada na função capeadora do sal, a qual diminui a interação das nanopartículas com o analito em solução. Essa hipótese é sustentada pelo fato de que anterior ao processo de *PISC* a intensificação de sinal da rodamina 6G já era superior para a amostra com 0,1 mM em relação a de 0,3 mM (Figura 28a).

A leitura dos espectros também permite a observação de que ambas as soluções apresentaram um acréscimo no efeito *SERS* para as soluções após o processo de fotoconversão, atribuído às interações químicas e físicas com os nanoprismas em solução que possuem bordas afiadas as quais geram uma região de intenso campo eletromagnético e banda de plasmon (*LSPR*) próxima ao comprimento de onda do laser utilizado para as interrogações (638 nm).

Considerando os resultados apresentados foi definida a concentração de citrato de sódio de 0,1 mM para os experimentos, com o objetivo de evitar a agregação das nanopartículas sem prejudicar a interação com o analito, mesmo com a desvantagem de uma fotoconversão incompleta.

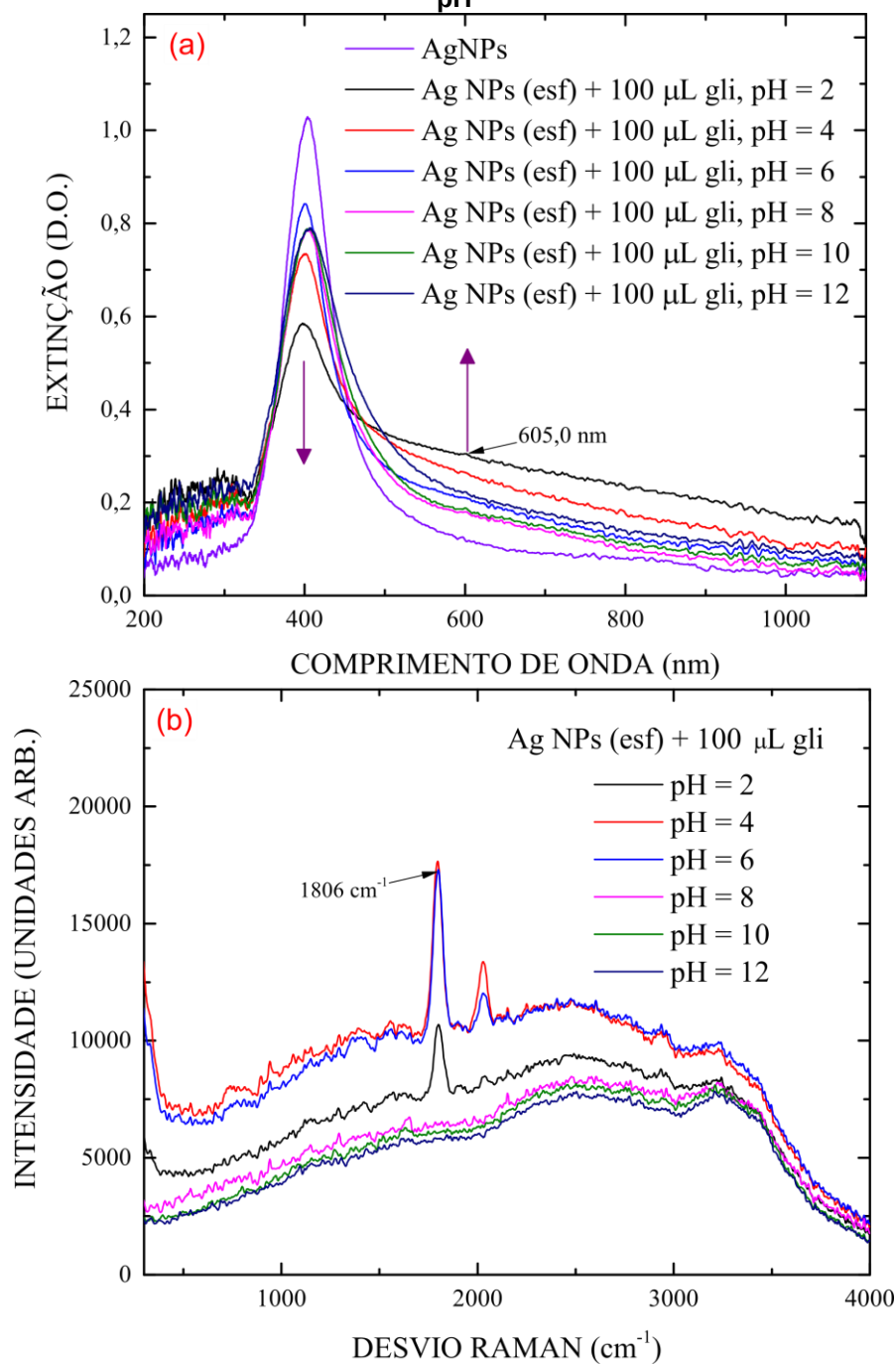
3.4.3 Utilização de nanopartículas de prata para *SERS* do glifosato

Após a definição da metodologia de ablação e fotoconversão, a molécula de prova rodamina 6G foi substituída pelo analito de interesse, herbicida glifosato.

3.4.3.1 Definição do pH da solução

Considerando o comportamento do herbicida em diferentes condições de pH, de acordo com o item 2.1, foram realizados testes de espectroscopia de extinção e *SERS* para uma solução contendo nanopartículas esféricas de prata na presença de 100 µL de solução 4 mM de glifosato, em diferentes condições de pH (2, 4, 6, 8, 10 e 12), obtidos por acidificação com reagente ácido acético e alcalinização com reagente hidróxido de sódio. Os resultados são apresentados na Figura 31.

Figura 31 - Espectros das soluções contendo 100 μL de glifosato em diferentes condições de pH



Fonte: o autor, 2019.

(a) espectro de extinção (b) espectro SERS.

Nota: as setas roxas indicam o comportamento da banda de plasmon no espectro de extinção.

A partir da análise do espectro de extinção é possível observar uma diminuição na densidade ótica da banda de plasmon das nanoesferas de prata, assim como o

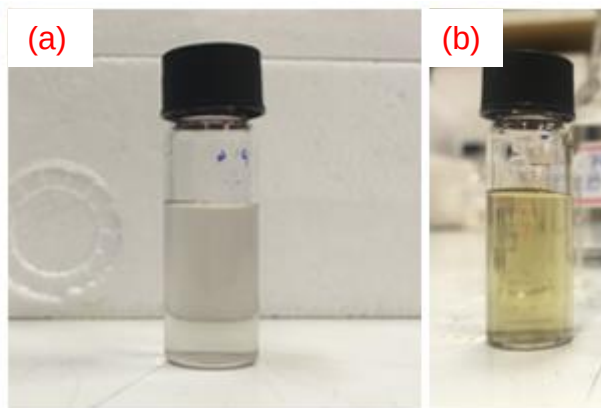
crescimento de uma nova e larga banda com pico em torno de 605 nm, atribuída à interação do glifosato com as nanopartículas, em função da diminuição do pH do meio.

Para o espectro *SERS* a diminuição do pH resulta no aparecimento de uma banda na região de 1806 cm^{-1} , observada também por Góes (2018) e Costa (2012) e atribuída às vibrações da ligação C = O do grupo carboxílico presente na molécula do herbicida (regiões de $1680 - 1820\text{ cm}^{-1}$). Deve ser notado mais uma vez que esta banda não é exclusiva do glifosato, e, portanto, não constitui uma assinatura espectral do herbicida.

Conforme prevê a teoria, a interação do glifosato com as Ag NPs que possuem cargas negativas (Figura 6) apresenta melhores resultados em pH ácido, em virtude da protonação apresentada pela molécula do herbicida em valores de pH inferiores (Figura 2). Esse comportamento justifica o fato de que em pH básico as bandas de interação para os dois espectros não aparecem, pois em pH elevado a molécula do herbicida possui excesso de cargas negativas.

De acordo com os espectros apresentados, a melhor interação do herbicida com as nanopartículas ocorreu em pH = 4 (cor vermelha), sendo mais intensa do que em pH = 2 (em preto). Tal fato foi atribuído ao processo redutivo de destruição das nanopartículas em pH muito ácido, que pode ser observado no espectro de extinção para o valor de pH = 2, o qual apresenta a menor densidade ótica das nanopartículas esféricas e uma pequena banda atribuída à interação, o que indica a diminuição de nanopartículas em solução. Além disso a coloração da solução tornou-se acinzentada, conforme mostra a Figura 32.

Figura 32 - Comparação da coloração da solução de Ag NPs + glifosato em diferentes pH



Fonte: o autor, 2019.

(a) Ag NPs + 100 μL de glifosato, pH = 2 e (b) Ag NPs + 100 μL de glifosato, pH = 4.

Dessa forma o pH = 4 foi definido para utilização nos experimentos.

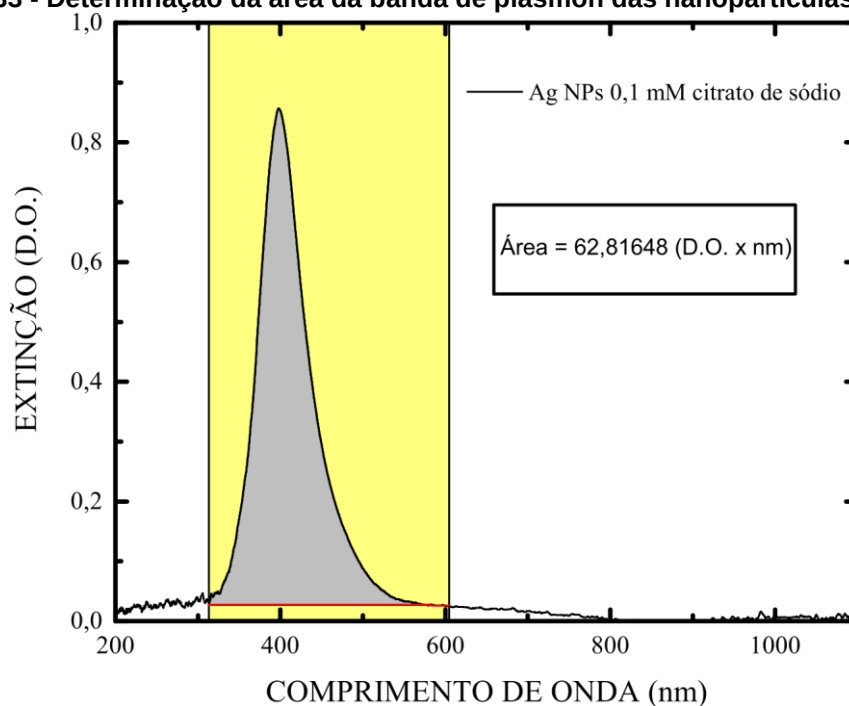
3.4.3.2 Definição da alíquota de peróxido de hidrogênio para *PISC*

Conforme apresentado no item 3.4.1 a adição de peróxido de hidrogênio em excesso resulta na oxidação total das nanopartículas. Adicionalmente, considerando as flutuações do laser utilizado na ablação da peça de prata, a concentração de nanopartículas pode variar, mesmo que em pequenos valores, para cada solução sintetizada, conforme apresentado no item 2.2.1.

A fim de estabelecer uma relação da concentração de nanopartículas em solução e da alíquota de peróxido de hidrogênio a ser adicionada no processo de fotoconversão, foi utilizado um espectro de extinção em que a fotoconversão foi eficiente, para uma dada concentração de peróxido de hidrogênio proporcional à concentração de citrato de sódio de 0,1 mM.

Foi verificada a área da banda em torno de 400 nm do espectro de extinção das nanopartículas de prata após a ablação, conforme mostra a Figura 33.

Figura 33 - Determinação da área da banda de plasmon das nanopartículas de prata



Fonte: o autor, 2019.

De acordo com a teoria apresentada no item 2.2.3., a área da banda de plasmon está relacionada com a concentração de nanopartículas em solução.

Para essa amostra contendo uma alíquota de 3 mL de solução de Ag NPs, a alíquota do reagente peróxido de hidrogênio adicionada foi de 0,7 µL e para a determinação empírica das alíquotas nos testes para o herbicida glifosato, mantendo o volume constante da alíquota de Ag NPs de 3 mL, o mesmo tratamento de determinação de área foi realizado para as bandas apresentadas nos espectros e utilizou-se uma proporção simples e direta, apresentada a seguir:

$$\frac{\text{ÁREA}}{62,81648 \text{ (D.O. x nm)}} = \frac{\text{ALÍQUOTA}}{0,7 \text{ µL}}$$

$$\frac{\text{ÁREA DA BANDA DE PLASMON}}{\text{ÁREA DA BANDA DE PLASMON}} = \frac{\text{(x) ALÍQUOTA DE H}_2\text{O}_2}{\text{ÁREA DA BANDA DE PLASMON}}$$

3.4.3.3 Metodologia de análises com o herbicida glifosato

Após o período de 24 horas de *PISC* e leitura do espectro de extinção, foram transferidas alíquotas de 0,9 mL da solução à três diferentes cubetas com capacidade de 4,5 mL cada, para análises de espectroscopia.

Foi adicionada em todas as cubetas uma alíquota de 33 µL de solução tampão pH = 4 e realizada a leitura do espectro de extinção para a solução.

Posteriormente foram adicionadas diferentes alíquotas da solução 4 mM de glifosato para cada cubeta: 20 µL, 50 µL e 75 µL. O volume das soluções foi completado com H₂O deionizada em alíquotas de 180 µL, 150 µL e 125 µL, totalizando 1,133 mL de solução, com concentrações de 15 mg/L, 30,1 mg/L e 44,6 mg/L, respectivamente.

A concentração da solução mãe foi determinada de acordo com a equação (3):

$$C_{sol} = \frac{m}{V_{sol}} \quad (3)$$

na qual *m* é a massa de glifosato adicionada, e *V_{sol}* é o volume do balão volumétrico utilizado para a produção da solução.

A concentração para cada amostra C_{gli} foi determinada conforme a equação (4):

$$C_{gli} = \frac{C_{sol} * Valí}{V_t} \quad (4)$$

na qual C_{sol} é a concentração da solução mãe de glifosato, $Valí$ é o volume da alíquota retirada da solução mãe, e V_t é o volume total da amostra.

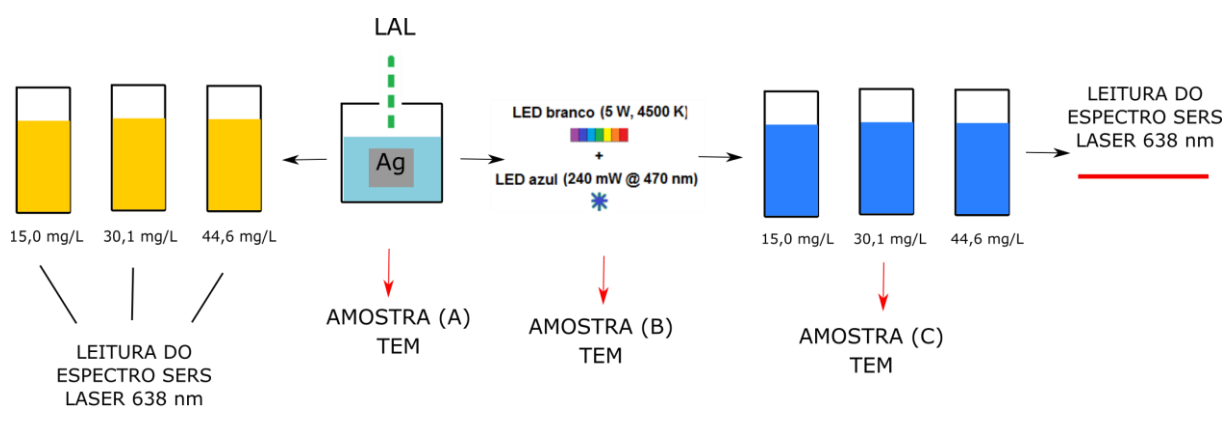
Após agitação foram realizadas as leituras do espectro de extinção para verificação da interação das nanopartículas com diferentes concentrações do herbicida e, por fim, as soluções foram transferidas para vials com capacidade de 5 mL e realizadas as leituras em espectrômetro Raman, com tempo de integração de 20000 ms e 5 médias, para a verificação do efeito *SERS*.

A mesma metodologia de análise foi realizada para a solução de nanopartículas de prata após ablação para comparação da interação do glifosato com nanopartículas sem fotoconversão (esféricas) e após a fotoconversão (hexágonos e prismas).

Utilizando um microscópio eletrônico de transmissão foram obtidas imagens de três soluções de nanopartículas de prata, são elas: amostra após a ablação, amostra após a fotoconversão e amostra após a fotoconversão contendo uma concentração de 30,1 mg/L do herbicida.

O diagrama de análises é apresentado na Figura 34.

Figura 34 - Diagrama de análises realizadas para testes com o herbicida glifosato

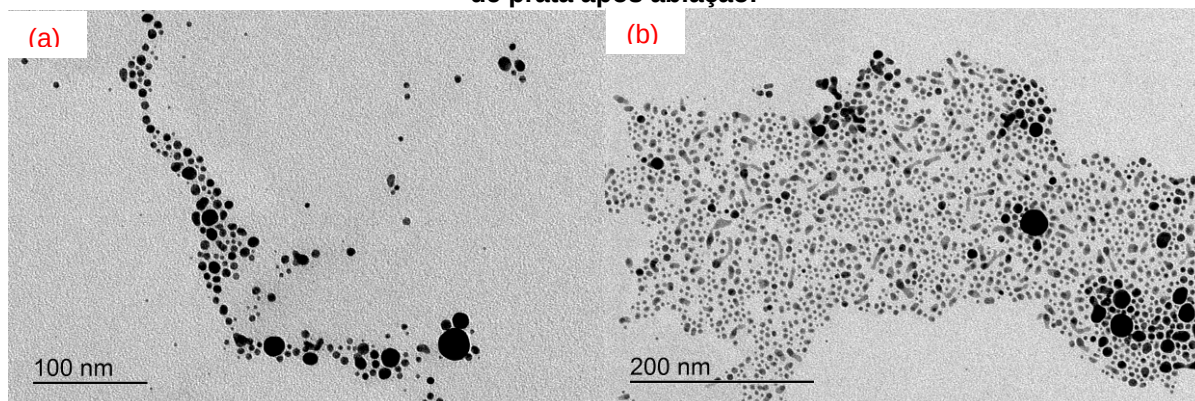


Fonte: o autor, 2019.

3.4.3.4 Resultados para a amostra após a ablação (amostra A)

As imagens obtidas da primeira solução, a qual continha Ag NPs após o processo de ablação, é apresentada na Figura 35.

Figura 35 - Imagens por microscopia eletrônica de transmissão da solução de nanopartículas de prata após ablação.

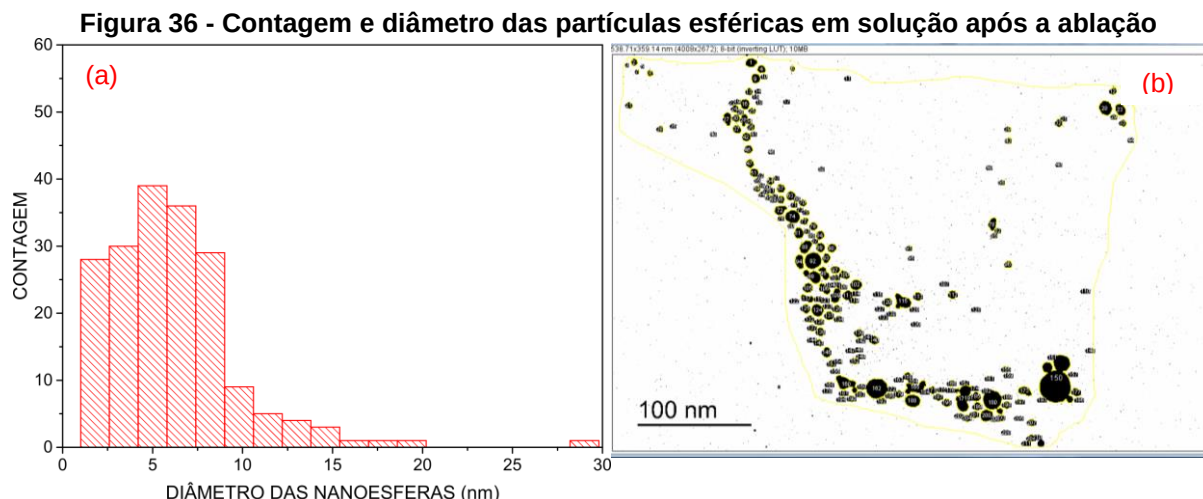


Fonte: o autor, 2019.

(a) Região isolada, magnificação de 50 kx (b) região capturada com magnificação de 40 kx

Utilizando o software ImageJ® foi realizado o tratamento da imagem por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 35 (a)) e analisada a distribuição de tamanhos e contagem das nanoesferas.

A Figura 36 apresenta a análise das partículas após o ajuste e o histograma com a contagem e diâmetro das partículas.



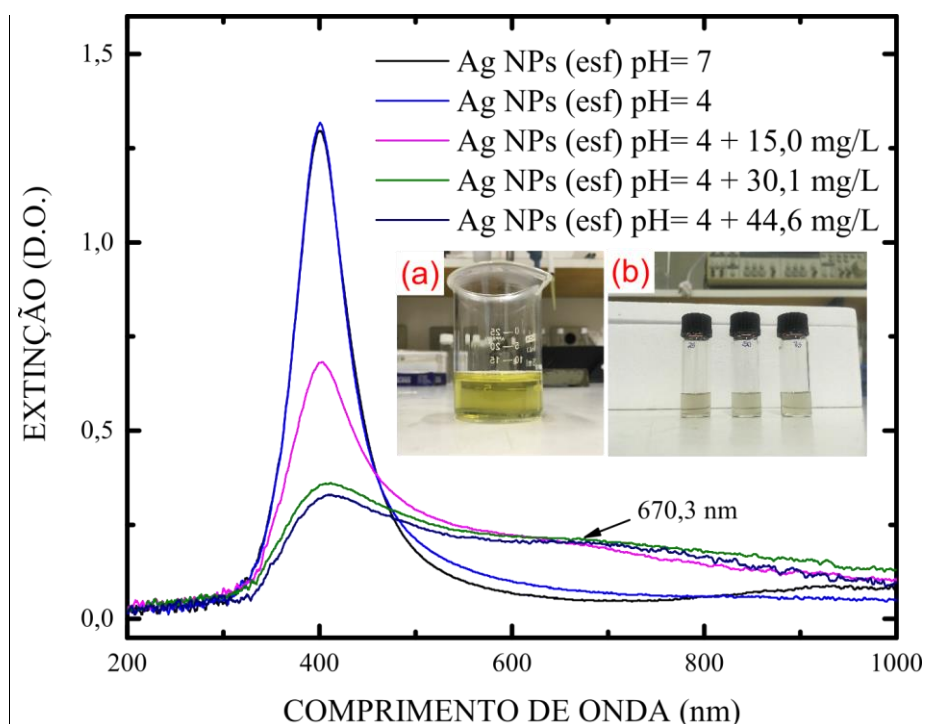
Fonte: o autor, 2019.

- (a) Histograma com a contagem e o diâmetro das nanoesferas após a ablação (amostra A) e
(b) tratamento da imagem TEM (Figura 35a) utilizando software ImageJ®.

A partir da observação das Figuras 35 e 36, concluiu-se que a solução apresentava uma distribuição heterogênea de tamanhos para as nanoesferas de prata, nanopartículas com diâmetros inferiores a 5 nm (sementes) e nanopartículas com diâmetros superiores a 5 nm, ambas essenciais para o processo de fotoconversão, conforme apresentado no item 2.2.4.

A Figura 37 apresenta o espectro de extinção da solução contendo nanopartículas esféricas, caracterizadas pelo comprimento de onda de pico da banda de plasmon próximo a 400 nm, e os espectros da mesma solução com a adição de diferentes alíquotas de glifosato e em diferentes valores de pH.

Figura 37 - Espectros de extinção e imagens de nanopartículas esféricas na presença de glifosato



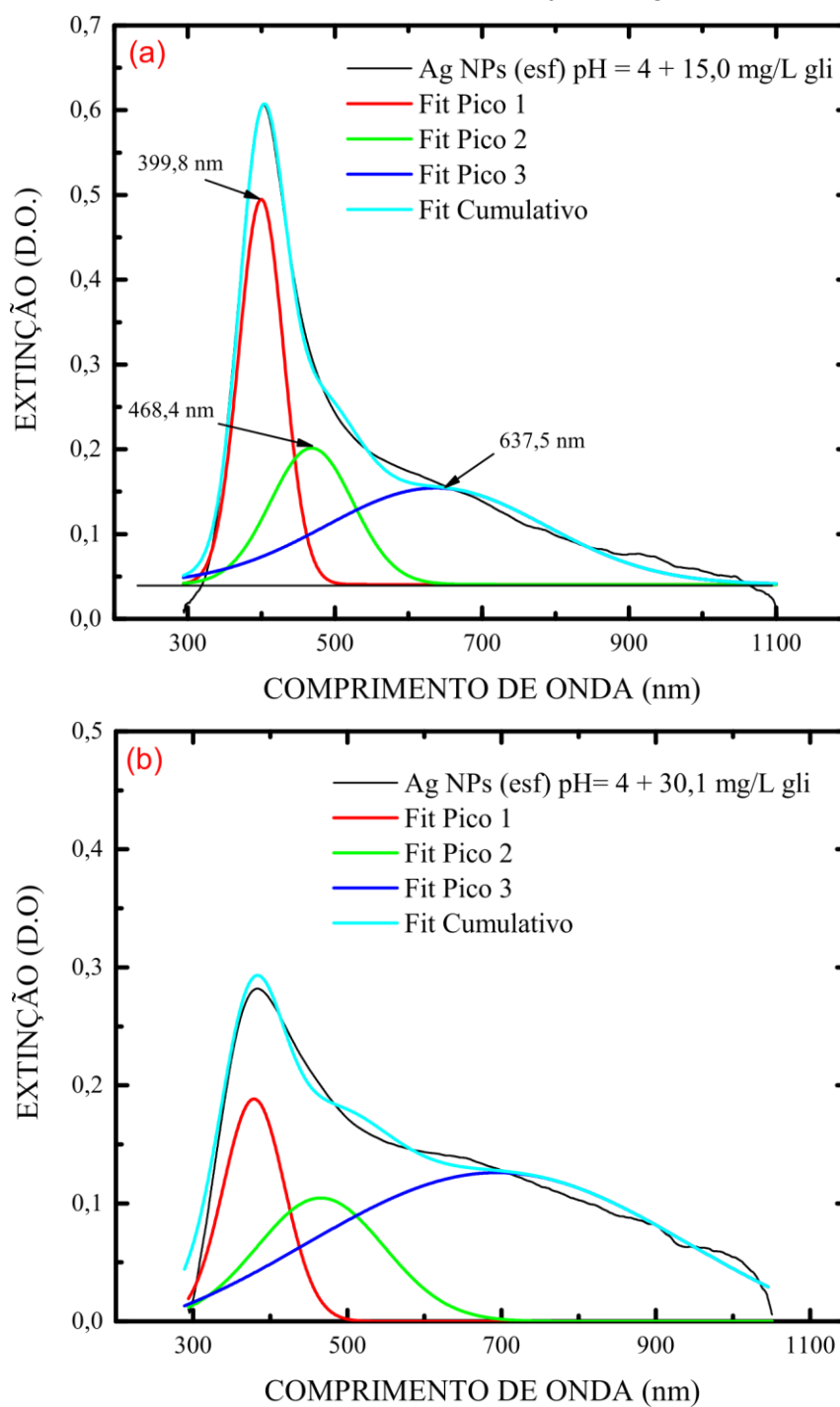
Fonte: o autor, 2019.

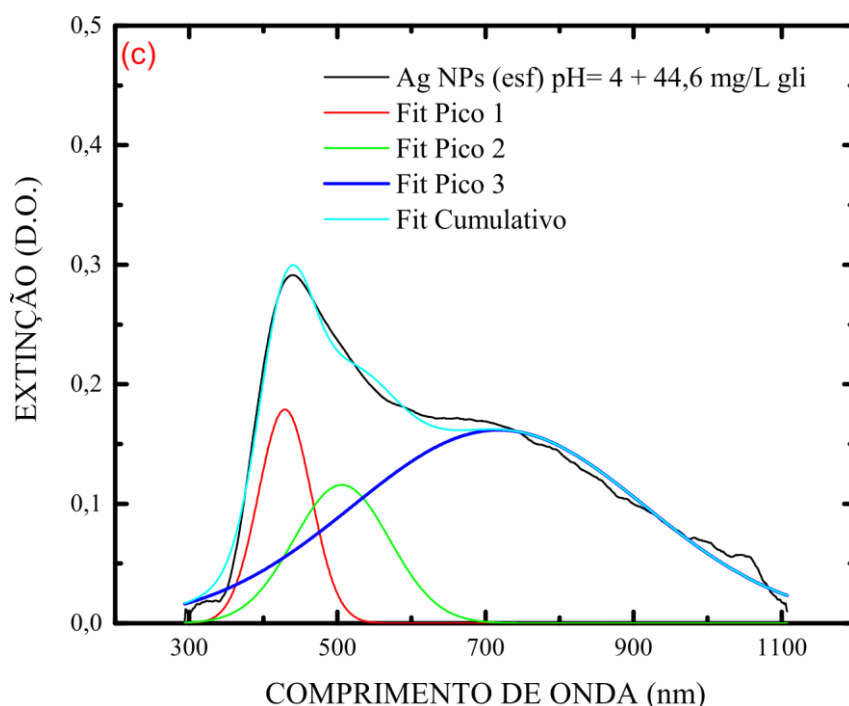
(a) Ag NPs após ablação e (b) Ag NPs com a adição das alíquotas de glifosato, em ordem crescente de concentração.

Nos espectros de extinção contendo herbicida em solução é visível o aparecimento de uma nova banda de plasmon (próximo a 670 nm) e a diminuição da banda característica das nanoesferas com o aumento da concentração de glifosato em solução.

Utilizando o software OriginPro®, os espectros foram decompostos em três gaussianas para observação do comportamento das bandas de plasmon, conforme mostra a Figura 38.

Figura 38 - Espectros de extinção decompostos em gaussianas de solução de Ag NPs esféricas com diferentes concentrações de glifosato





Fonte: o autor, 2019.

(a) 15 mg/L, (b) 30,1 mg/L e (c) 44,6 mg/L.

A primeira gaussiana (vermelha), inicialmente com comprimento de onda em 399,8 nm, foi atribuída à ressonância de nanoesferas de menores diâmetros (sementes e Ag NPs com diâmetro de até 10 nm), a segunda gaussiana (verde) com comprimento de onda em 468,4 nm foi atribuída às nanoesferas de diâmetros superiores a 10 nm e a terceira gaussiana (azul), referente à banda na região de 670 nm do espectro (Figura 36) atribuída à aglomeração do analito com as nanopartículas esféricas em solução, após a decomposição apresentou um desvio no comprimento de onda de pico para 637,5 nm.

A tabela 9 apresenta a amplitude das gaussianas em função do aumento da concentração de glifosato.

Tabela 9 – Amplitude das gaussianas para as diferentes concentrações de glifosato em solução.

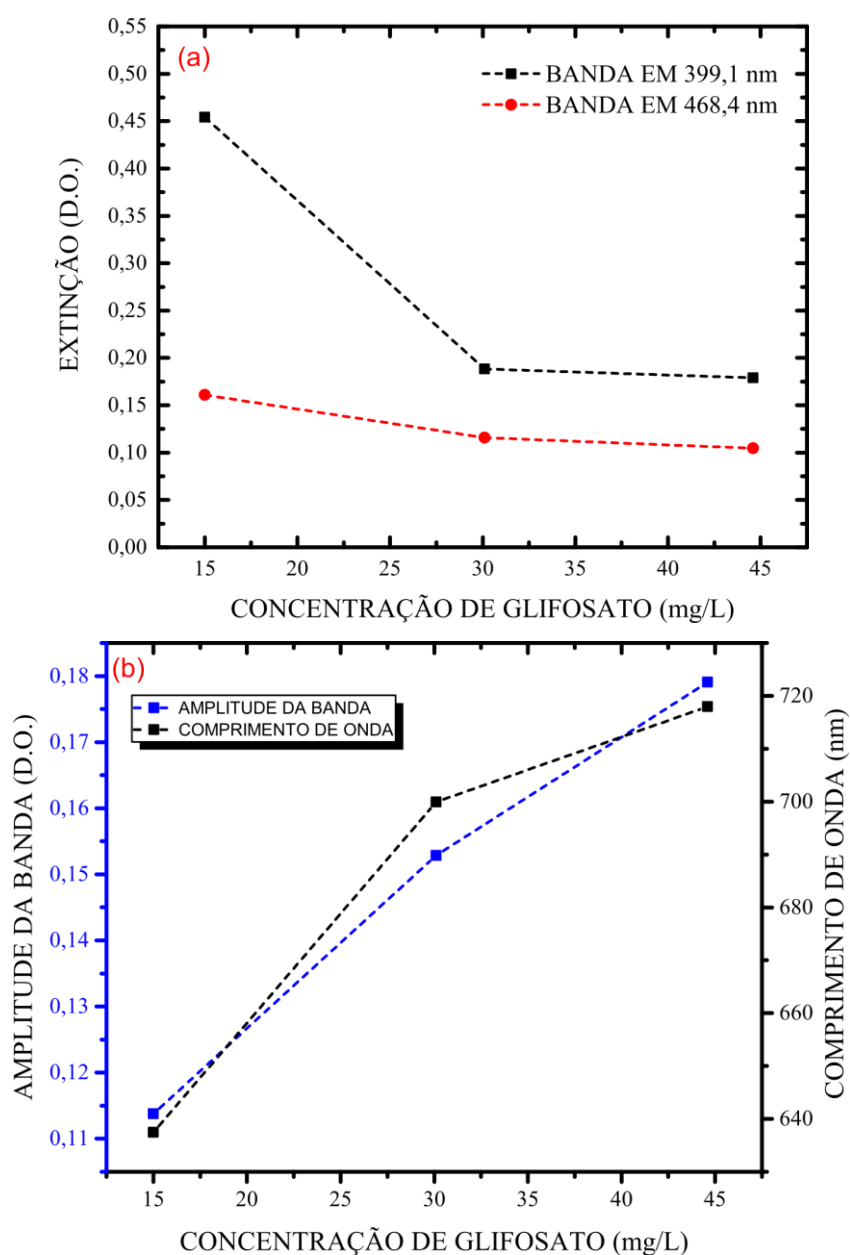
CONCENTRAÇÃO DE GLIFOSATO (mg/L)	BANDA EM 399,1 nm (D.O.)	BANDA EM 468,4 nm (D.O.)	BANDA EM 637,5 nm (D.O.)
15	0,45411	0,16079	0,11377
30,1	0,18844	0,11572	0,15283
44,6	0,17883	0,10455	0,17905

Fonte: o autor, 2019

Nota: amplitudes das gaussianas obtidas por software OriginPro®

Com o aumento da concentração do herbicida, as amplitudes das bandas de plasmon de nanopartículas esféricas de diferentes tamanhos decrescem e a da banda de plasmon com centro em 637,5 nm cresce. Os comportamentos dessas bandas de plasmon são apresentados na Figura 39, assim como o deslocamento da banda *LSPR* para a banda atribuída à aglomeração.

Figura 39 - Comportamento das bandas de plasmon para cada concentração de glifosato adicionada



Fonte: o autor, 2019.

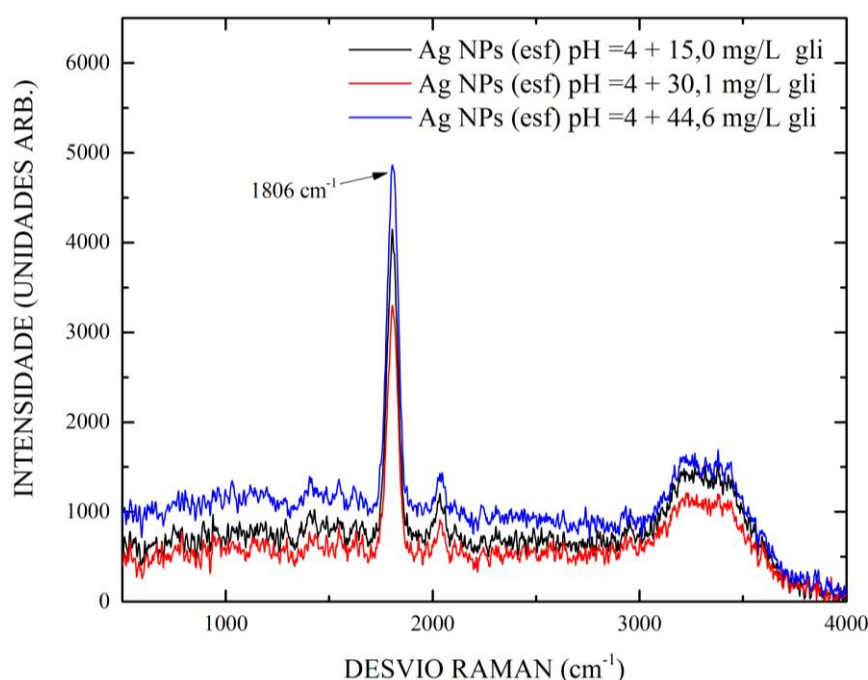
(a) comportamento das bandas atribuídas às nanoesferas (b) comportamento da banda atribuída à interação com o herbicida.

Nota: as linhas pontilhadas foram adicionadas para melhor visualização do comportamento.

É possível observar também que a taxa de crescimento da banda inicialmente em 637,5 nm é reduzida na concentração de 44,6 mg/L do analito, assim como é reduzida a taxa de diminuição das bandas de plasmon das nanopartículas esféricas, tais comportamentos indicam a saturação da solução.

A análise por espectroscopia Raman da interação do analito com as soluções é apresentada na Figura 40.

Figura 40 - Espectros Raman da solução contendo nanopartículas esféricas na presença de glifosato



Fonte: o autor, 2019.

Nota: a seta indica a região de pico das bandas.

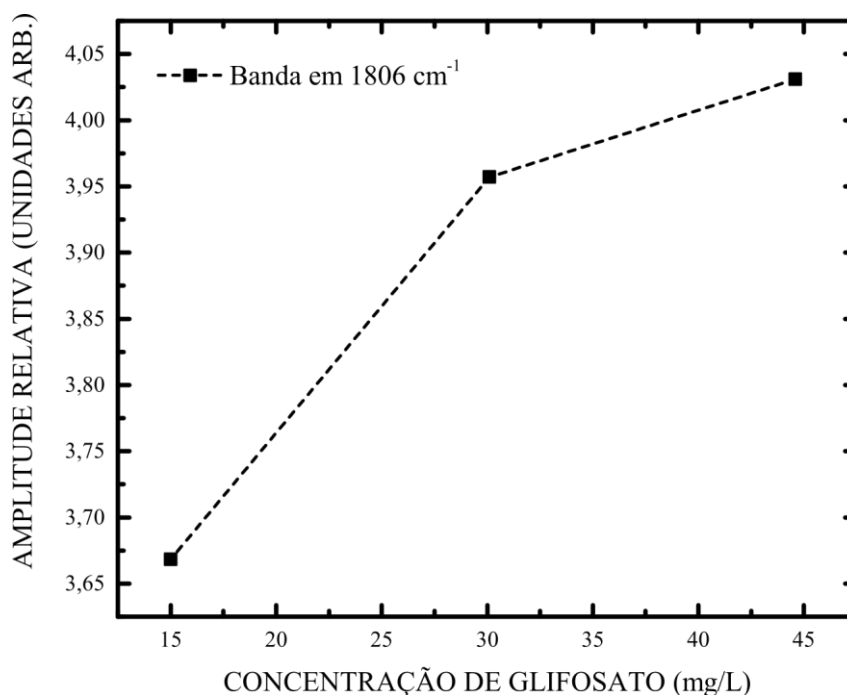
A amplitude do sinal Raman em unidades arbitrárias da banda em 1806 cm^{-1} , atribuída às ligações $\text{C}=\text{O}$, foi determinada realizando a relação entre as intensidades das bandas do analito (ΔS) e de uma das bandas de vibração da água (ΔA), a qual se inicia na região de 2857 cm^{-1} e chega até 3667 cm^{-1} do espectro, com as variações calculadas pela intensidade do pico até a base da banda espectral. Assim, a amplitude do sinal Raman, denominada como amplitude relativa, pode ser expressa pela equação (5):

$$A_R = \frac{\Delta S}{\Delta A}$$

(5)

Dessa forma, a amplitude relativa em função da concentração do glifosato em solução é apresentada na Figura 41.

Figura 41 - Amplitude relativa da banda em 1806 cm^{-1} para cada concentração de glifosato adicionada



Fonte: o autor, 2019.

A taxa de crescimento da banda também foi reduzida na concentração de $44,6\text{ mg/L}$, adequando-se ao comportamento observado nas leituras dos espectros de extinção.

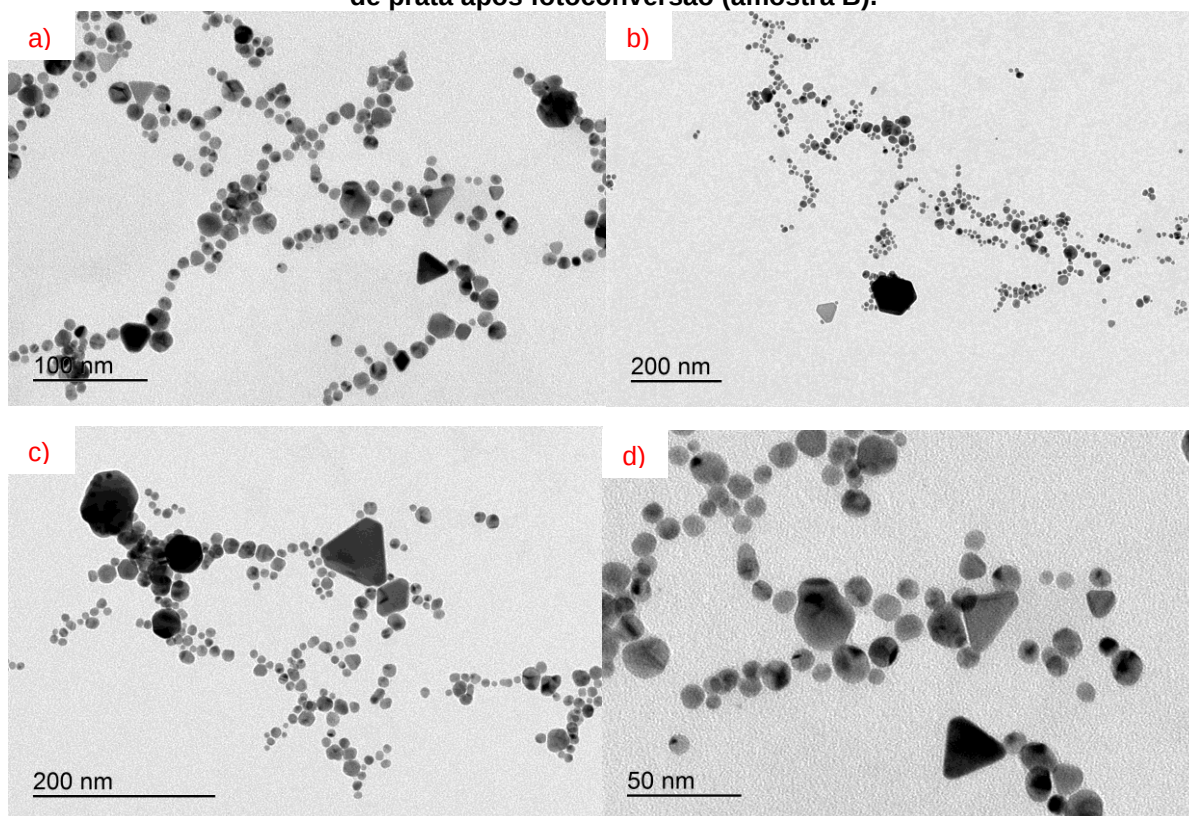
Considerando o deslocamento do comprimento de onda de pico da banda de plasmon atribuída à interação apresentado na Figura 39b, as análises por espectroscopia de extinção não foram utilizadas para detecção do glifosato, por não ser uma assinatura do herbicida. Nesse sentido, a análise UV-Vis foi importante para estudar e otimizar a interação das nanopartículas com o analito, mas seu uso como sensor colorimétrico é limitado.

Da mesma forma, apesar de demonstrar uma dependência com a concentração do herbicida, a banda na região de 1806 cm^{-1} não é considerada uma assinatura do glifosato por estar relacionada às vibrações de ligações $\text{C}=\text{O}$, presentes também na solução tampão de ácido acético e no sal citrato de sódio.

3.4.3.5 Resultados para a amostra após a fotoconversão (amostra B)

As imagens obtidas da segunda solução, a qual continha nanopartículas de prata após o processo de fotoconversão, são apresentadas na Figura 42.

Figura 42 - Imagens por microscopia eletrônica de transmissão da solução de nanopartículas de prata após fotoconversão (amostra B).



Fonte: o autor, 2019.

(a) Região isolada, magnificação de 50 kx (b) região capturada com magnificação de 20 kx, (c) região capturada com magnificação de 40 kx e (d) região capturada com magnificação de 100 kx.

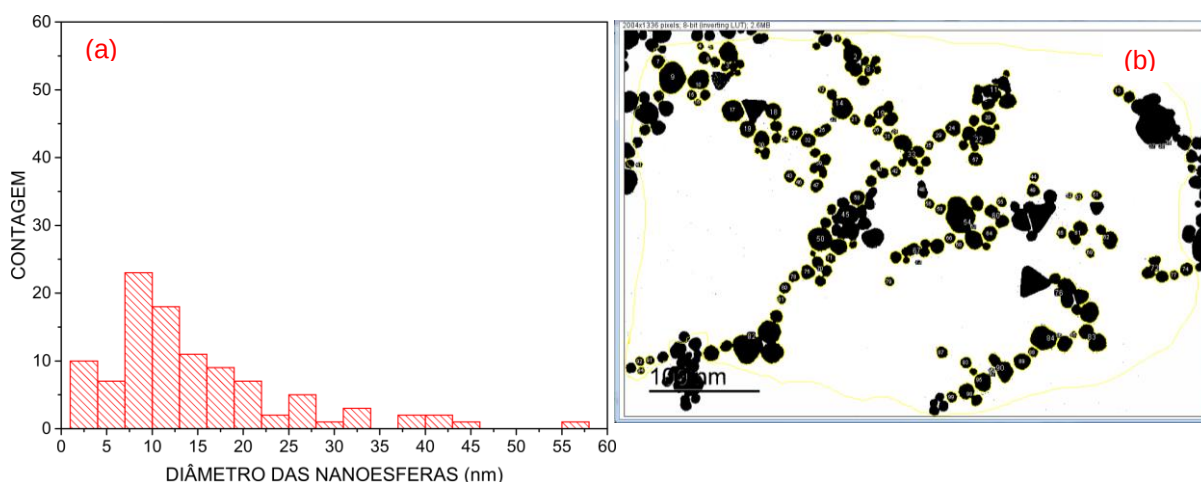
É possível observar uma distribuição de formato distintos de nanopartículas, sendo identificados os formatos: nanoesferas, nanohexágonos, nanoprismas de bordas retas e nanoprismas de bordas afiadas.

Utilizando o software ImageJ® foi realizado o mesmo tratamento das imagens obtidas por microscopia de transmissão (Figura 36 (b)) para a amostra após a fotoconversão. Foi analisada a distribuição das nanoesferas da imagem apresentada

na Figura 42a, com a esfericidade ajustada para o valor de 1, dessa forma a contagem de partículas considerou apenas as esferas na imagem.

A Figura 43 apresenta a análise das partículas após o ajuste e o histograma com a contagem e diâmetro das partículas.

Figura 43 - Contagem e diâmetro das partículas esféricas em solução após a fotoconversão



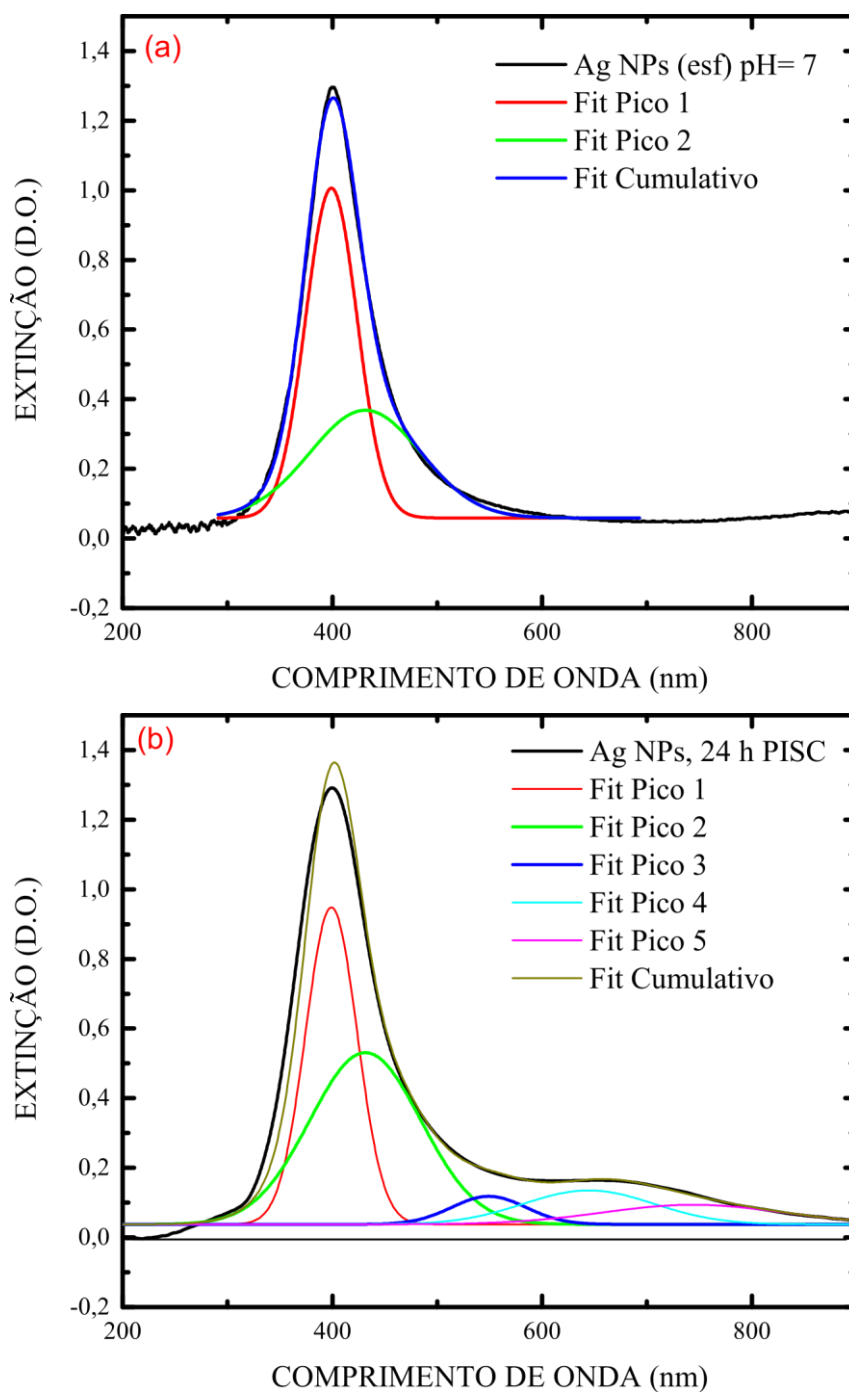
Fonte: o autor, 2019.

(a) Histograma com a contagem e o diâmetro das nanoesferas após a fotoconversão (amostra B) e (b) tratamento da imagem TEM (Figura 42a) utilizando software ImageJ®.

A comparação do histograma da amostra B com o hitograma apresentado na Figura 36a, para a amostra após a ablação, permite observar que a concentração de nanopartículas sementes diminui após a fotoconversão e, por outro lado, a concentração de nanopartículas com maiores diâmetros aumenta.

Foram realizadas as leituras do espectro de extinção da solução e realizado o tratamento de decomposição em gaussianas. A fim de comparação o espectro de extinção da amostra A, sem fotoconversão, também foi decomposto em gaussianas (Figura 36, linha preta). O tratamento é apresentado na Figura 44.

Figura 44 - Espectros de extinção da amostra sem fotoconversão (A) e da amostra após a fotoconversão (B).



Fonte: o autor, 2019.

(a) amostra (A) e (b) amostra (B).

É possível observar que após o período de *PISC* ocorreu o surgimento de uma nova banda de plasmon composta por três gaussianas distintas. A tabela 10 apresenta uma comparação dos comprimentos de onda, amplitudes e áreas das gaussianas antes e após o processo de fotoconversão.

Tabela 10 - Comparação da área e amplitude das gaussianas antes e após o processo de *PISC*.

COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	AMPLITUDE (D.O.)	ÁREA (D.O. x nm)	AMPLITUDE (D.O.)	ÁREA (D.O. x nm)
	SEM PISC		COM PISC	
399,05529	0,94725	58,30764	0,91055	56,04876
431,44782	0,30929	41,01187	0,49308	65,38165
549,18648	0,00000	0,00000	0,08032	7,14164
644,42419	0,00000	0,00000	0,09744	15,16760
743,95480	0,00000	0,00000	0,05612	12,11640

Fonte: o autor, 2019.

A primeira gaussiana (vermelha), com comprimento de onda em 399,1 nm, foi atribuída à ressonância de nanoesferas de menores diâmetros (sementes e Ag NPs com diâmetro de até 10 nm) e a segunda gaussiana (verde) com comprimento de onda em 431,4 nm foi atribuída às nanoesferas de diâmetros superiores a 10 nm, pois para ambos os espectros essas bandas estão presentes.

As três novas gaussianas na amostra após a fotoconversão foram atribuídas às ressonâncias de plasmon de nanohexágonos (azul escuro), nanoprismas com bordas retas (azul claro) e nanoprismas com bordas afiadas (rosa) observados nas imagens de microscopia de transmissão (TEM), com comprimentos de onda próximos aos descritos por Lee et al. (2010) e Langille, Personick, Mirkin (2013).

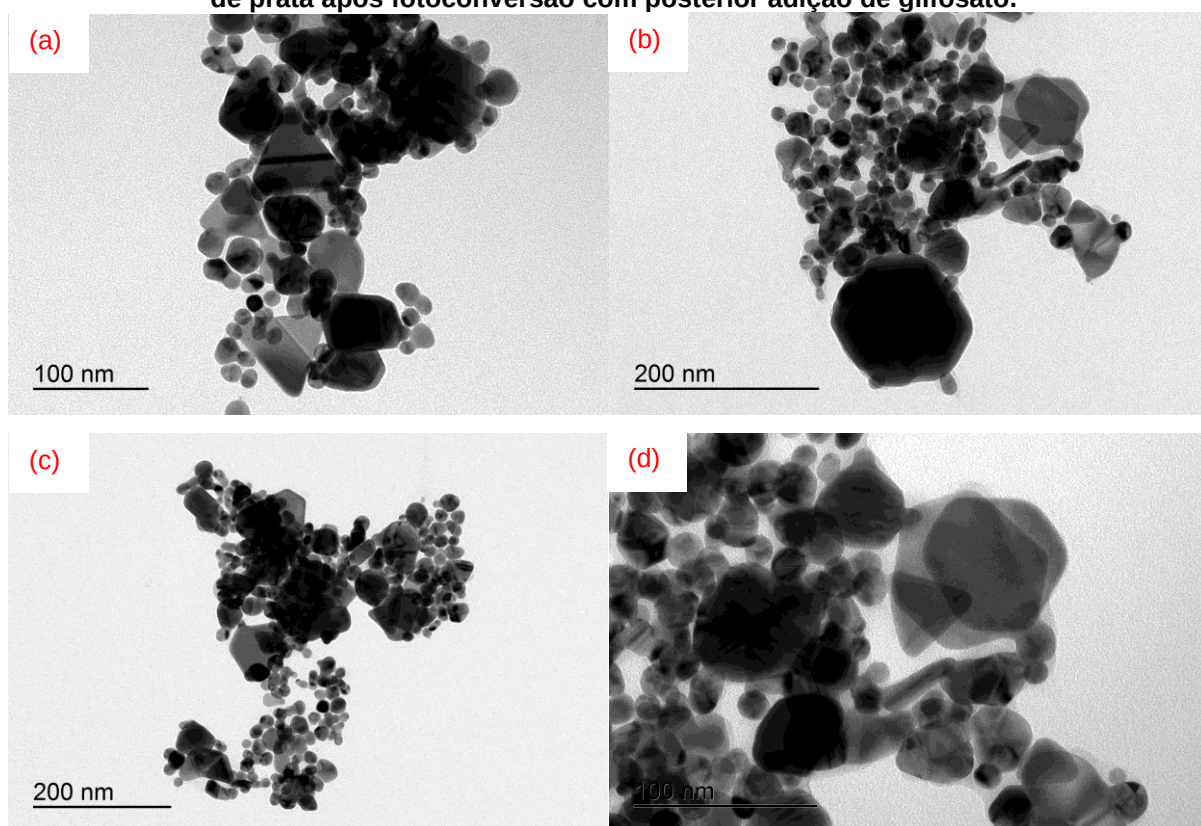
De acordo com a Tabela 10, a concentração de nanoesferas sementes diminui e ocorre o crescimento das outras quatro bandas. Tal comportamento é adequado considerando o processo de formação e crescimento de nanoestruturas com diferentes formatos, apresentado no item 2.2.4, no qual as nanoestruturas crescem em função das reações de oxirredução das nanopartículas sementes e do sal citrato de sódio.

O comportamento das gaussianas concorda também com os histogramas apresentados nas Figuras 36a e 44a, indicando uma diminuição na concentração de nanopartículas sementes e um aumento na concentração de nanoesferas com diâmetro superior a 10 nm.

3.4.3.6 Resultados para a amostra após a fotoconversão com posterior adição de glifosato (amostra C)

Com o objetivo de visualizar a interação das nanopartículas com o glifosato, a terceira solução analisada por microscopia continha a solução após a fotoconversão com uma concentração de 30,1 mg/L do herbicida (amostra C), apresentada na Figura 45.

Figura 45 - Imagens por microscopia eletrônica de transmissão da solução de nanopartículas de prata após fotoconversão com posterior adição de glifosato.



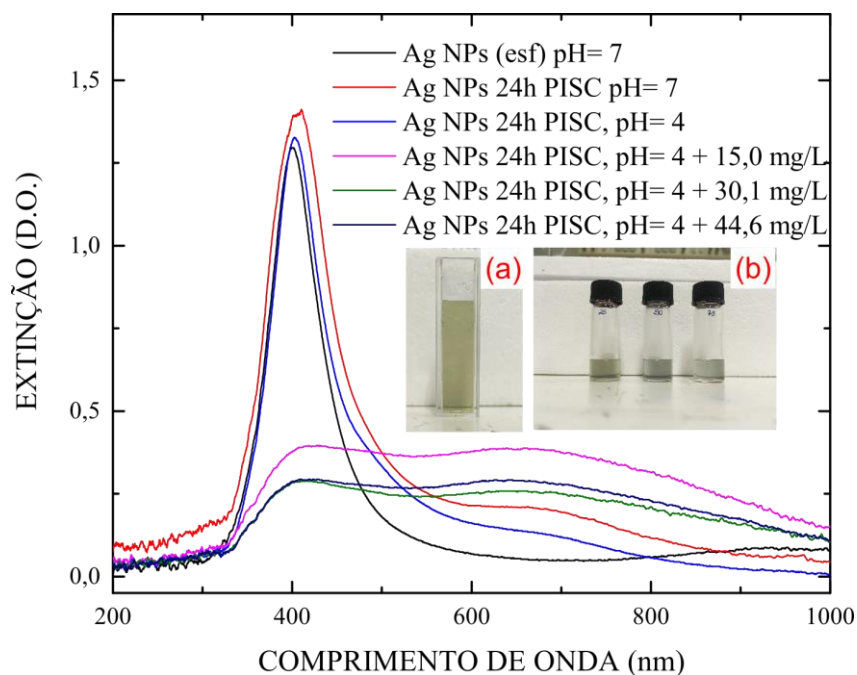
Fonte: o autor, 2019.

(a) Região isolada, magnificação de 50 kx (b) região capturada com magnificação de 40 kx, (c) região capturada com magnificação de 30 kx e (d) região capturada com magnificação de 80 kx.

As imagens mostram a interação das nanoestruturas com a molécula do herbicida, formando grandes aglomerados nos quais são identificados os diferentes formatos de nanopartículas de prata.

A Figura 46 apresenta os espectros de extinção e imagens da solução contendo nanopartículas após o processo de fotoconversão e com a posterior a adição de diferentes concentrações de glifosato e diferentes condições de pH.

Figura 46 - Espectro de extinção de Ag NPs após PISC e na presença de glifosato

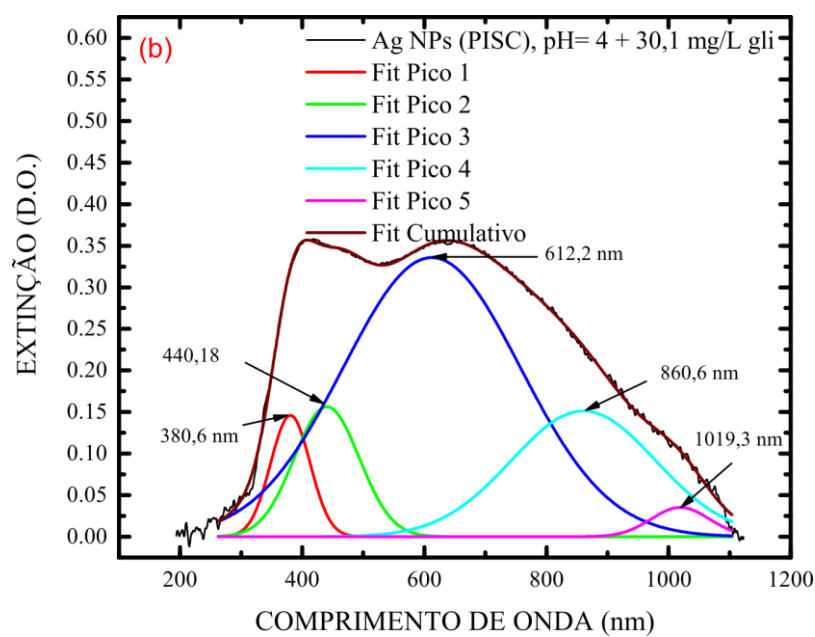
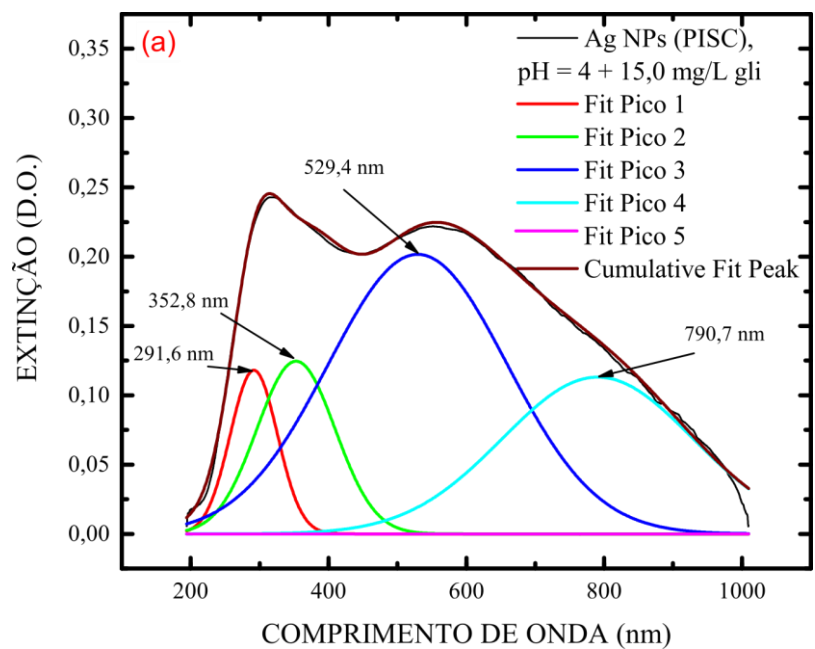


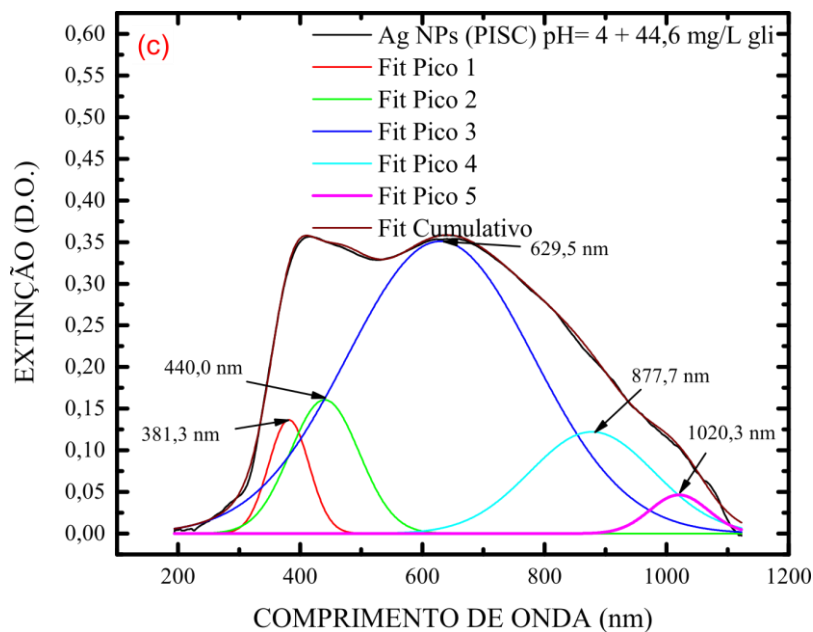
Fonte: o autor, 2019.

Espectro completo com acompanhamento da amostra após ablação, fotoconversão (a), acidificação e adição de glifosato (b).

Os espectros apresentam o surgimento uma nova banda de plasmon em torno de 680 nm com a adição do glifosato em solução. Os espectros foram decompostos em gaussianas conforme mostra a Figura 47.

Figura 47 - Espectros de extinção decompostos em gaussianas de solução de Ag NPs após PISC com a adição posterior de diferentes concentrações de glifosato.



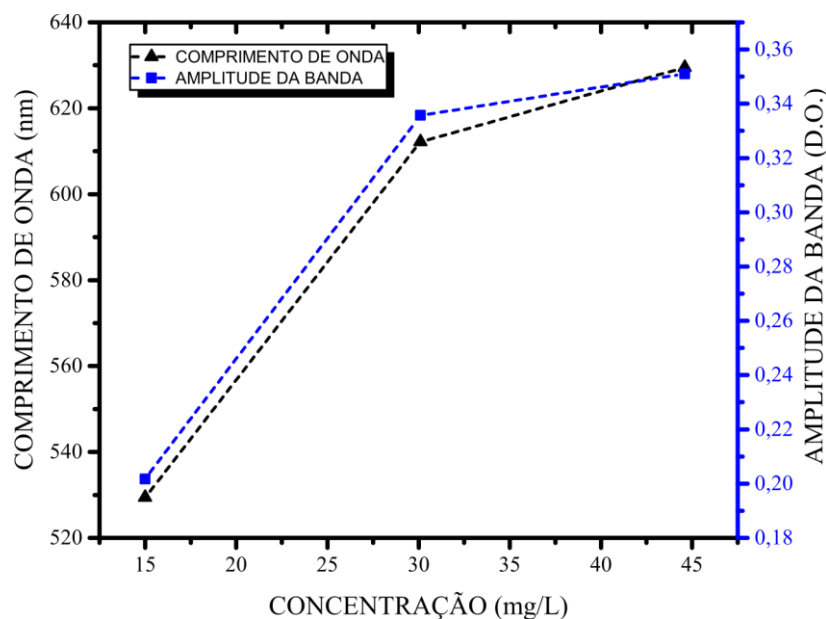


Fonte: o autor, 2019.

(a) 15,0 mg/L, (b) 30,1 mg/L e (c) 44,6 mg/L.

Uma análise adicional é feita para a gaussiana 3 (azul escuro), com comprimento de onda inicialmente em 529,4 nm, a qual apresentou uma amplitude dependente da concentração de analito em solução, assim como um desvio para o vermelho, indicando um aumento na dimensão das nanopartículas. Tal comportamento foi atribuído ao processo de aglomeração das nanopartículas com a adição do herbicida e mudança no pH da solução, dessa forma, essa gaussiana foi atribuída à interação. A análise desse comportamento é apresentada na Figura 48.

Figura 48: Amplitude e deslocamento da gaussiana 3 para cada concentração de glifosato adicionada

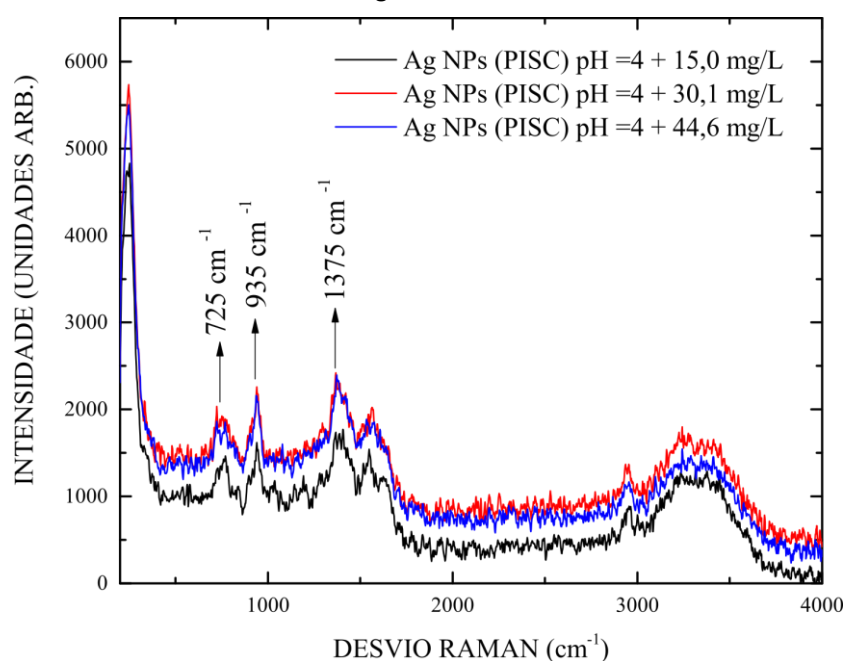


Fonte: o autor, 2019.

Assim como para a amostra sem fotoconversão, o comportamento para a concentração de 44,6 mg/L indica uma saturação da solução.

A análise por espectroscopia Raman da interação das nanoestruturas com a molécula do glifosato é apresentada na Figura 49.

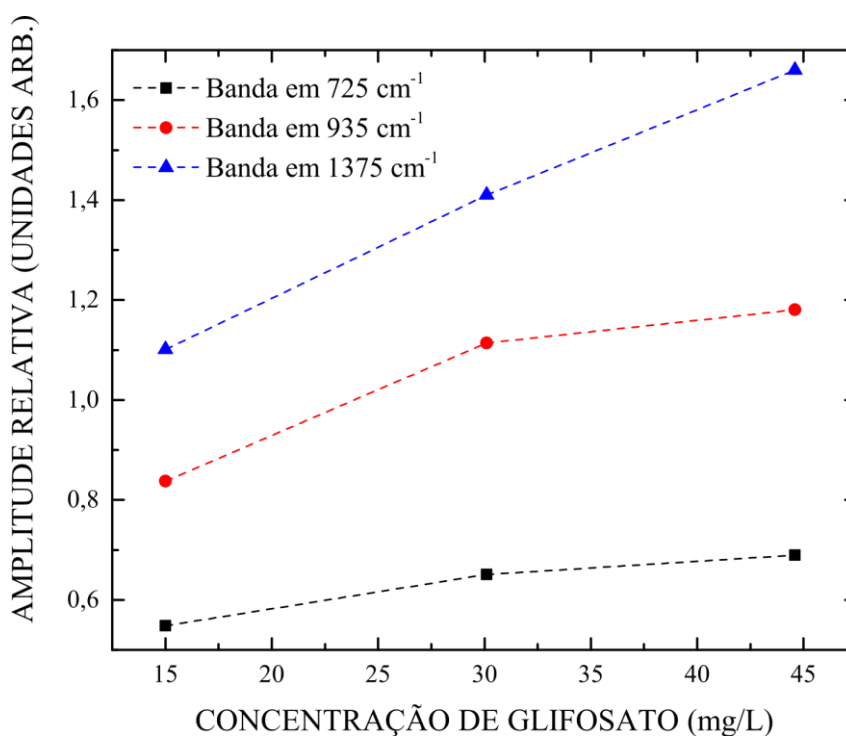
Figura 49 - Espectros SERS da solução contendo nanoestruturas de prata na presença de glifosato



Fonte: o autor, 2019.

A leitura apresentou o surgimento de três bandas em regiões de assinatura da molécula do glifosato, conforme descrito por Costa (2012), sendo elas: 725 cm^{-1} (associada a vibrações de estiramento de ligação C – P e de flexão N - H), 935 cm^{-1} (associada a vibrações do tipo balanço de ligação H – C – H) e 1375 cm^{-1} (associada a vibrações de oscilações de ligação H – C – H e estiramento de ligação C - C). A amplitude dessa banda em relação à amplitude da banda da água, conforme a equação (5), em função da concentração do glifosato em solução é apresentada na Figura 50.

Figura 50 - Amplitude relativa das bandas SERS para cada concentração de glifosato adicionada



Fonte: o autor, 2019.

As bandas mostram dependência com a concentração de analito em solução e comportamento similar ao observado na análise de espectroscopia UV-Vis para a gaussiana 3 (Figura 48).

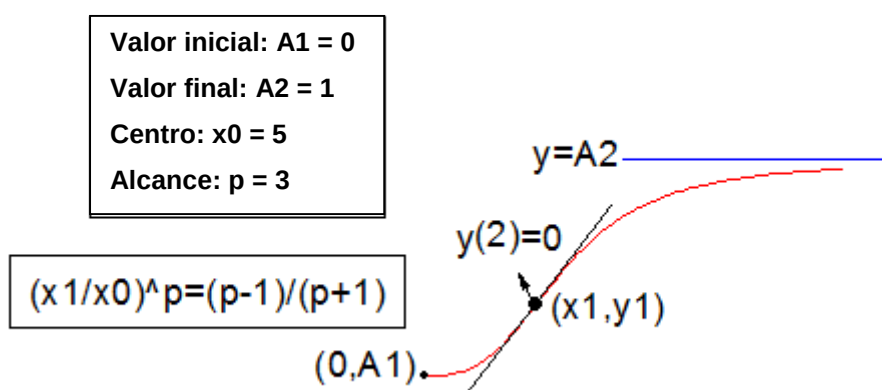
3.5. CURVA DE CALIBRAÇÃO

A curva de calibração foi determinada utilizando o software OriginPro® utilizando-se uma curva logística de crescimento, em virtude do comportamento

esperado da curva de amplitude do sinal SERS em função do aumento na concentração de analito, conforme os parâmetros:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

(6)



Foram consideradas as regiões de mínimo como limite de detecção e as regiões de máximo como saturação da solução.

Para a realização da curva contendo 7 pontos, foi transferida uma alíquota de 0,5 mL de solução de nanopartículas de prata para uma cubeta de 2,5 mL de capacidade. Foi adicionada uma alíquota de 18,5 µL de solução tampão pH 4 e as alíquotas da solução mãe de glifosato utilizadas foram de 3 µL, 5,5 µL, 8,5 µL, 11 µL, 19,5 µL, 28 µL e 41,5 µL. O volume foi completado com H₂O deionizada totalizando 0,629 mL de solução com concentrações de glifosato de 3,2 mg/L, 5,4 mg/L, 9,1 mg/L, 11,8 mg/L, 20,9 mg/L, 30,1 mg/L e 44,6 mg/L, respectivamente.

As incertezas relacionadas à concentração de glifosato foram avaliadas e constam no Apêndice A.

As avaliações das incertezas relacionadas às amplitudes relativas das análises Raman são apresentadas nos Apêndices B e C.

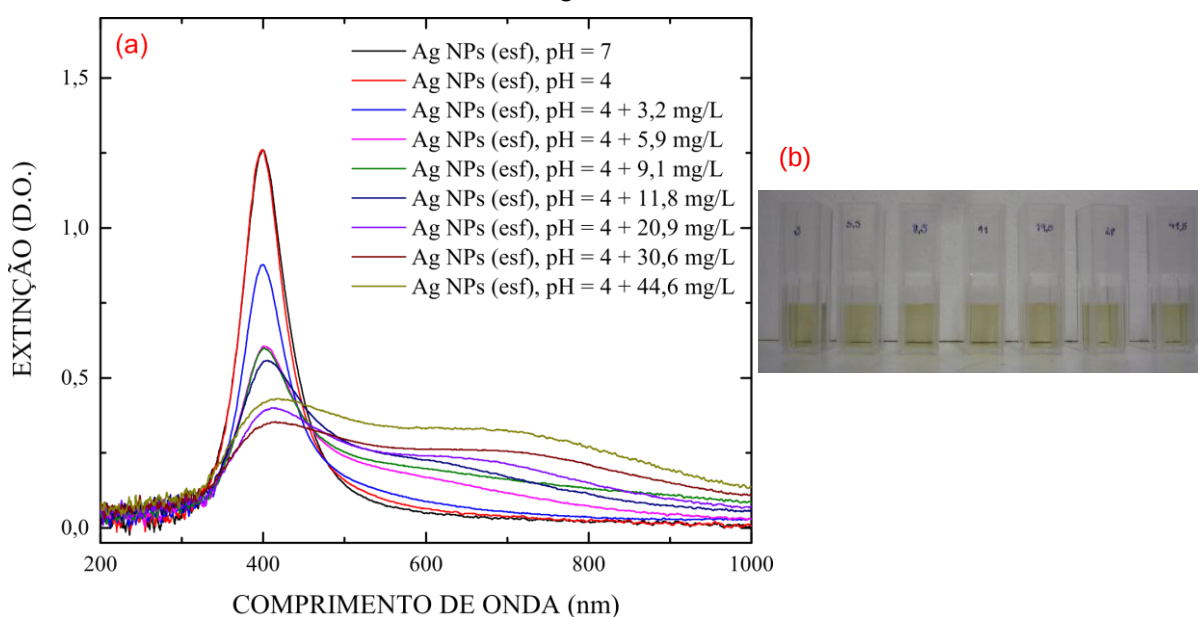
A determinação do limite de detecção foi realizada segundo a equação (2) apresentada no item 2.3.2.2 e os cálculos constam no Apêndice B.

3.5.1. Resultados das curvas de calibração

3.5.1.1 Curvas de calibração amostra sem fotoconversão

A Figura 51 apresenta os espectros de extinção para a amostra após o processo de ablação e com as sete diferentes concentrações de glifosato.

Figura 51 - Espectro de extinção de NPs após ablação e com diferentes concentrações de glifosato



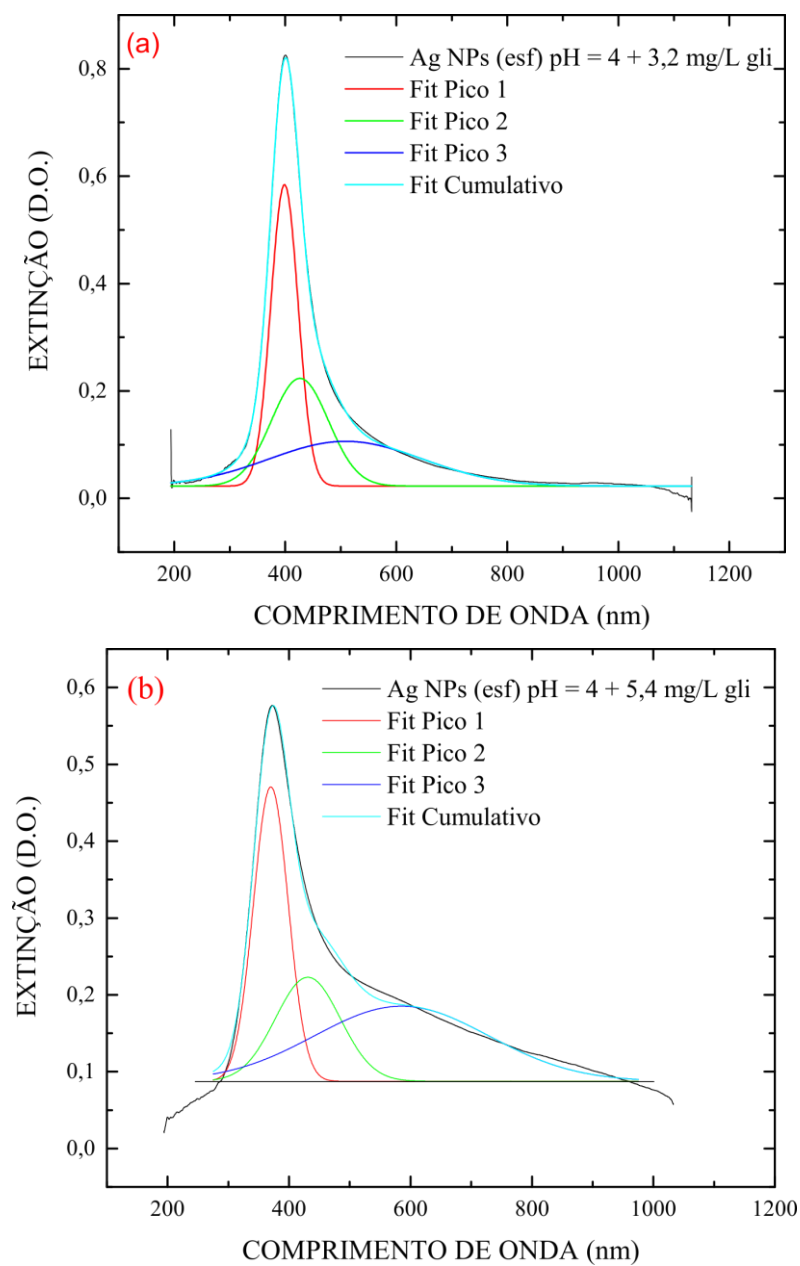
Fonte: o autor, 2019.

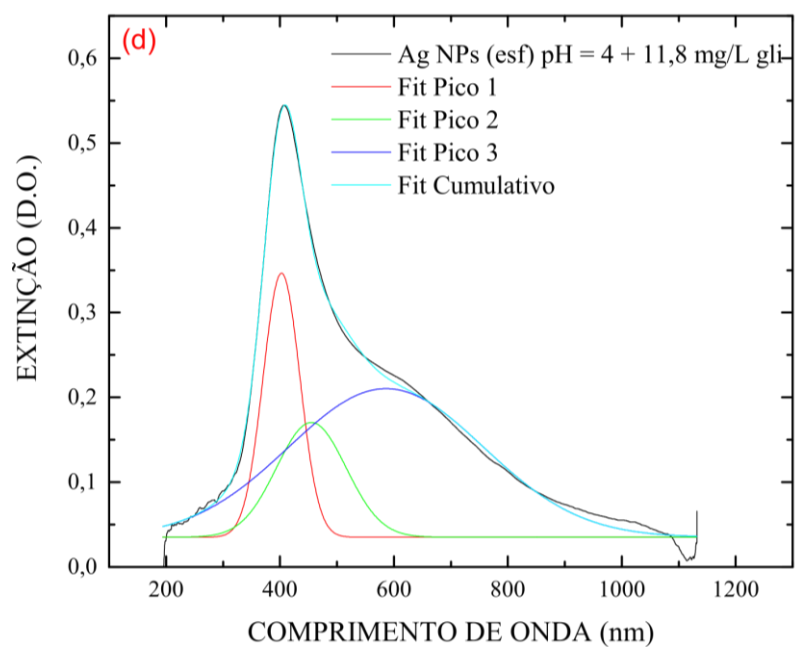
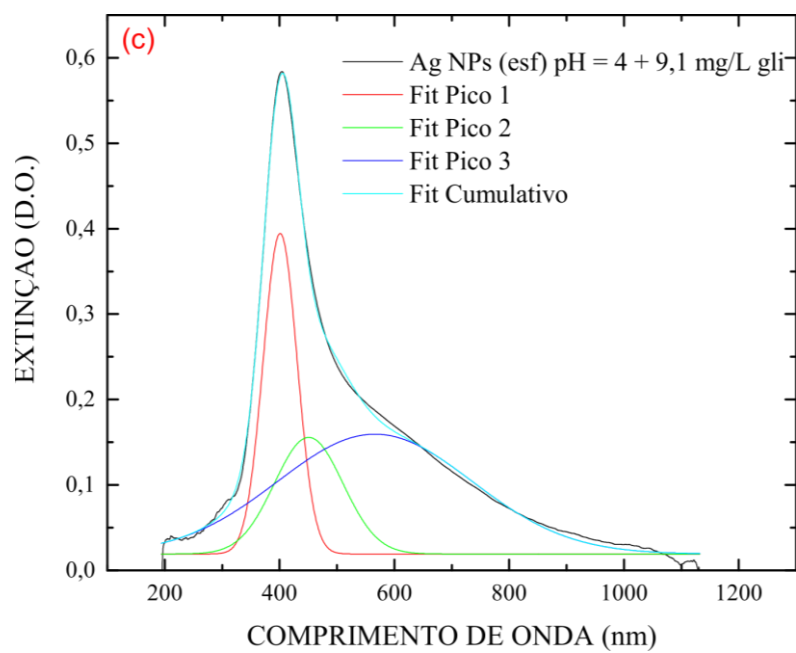
(a) espectros de extinção e (b) as 7 cubetas em ordem crescente de concentração de glifosato.

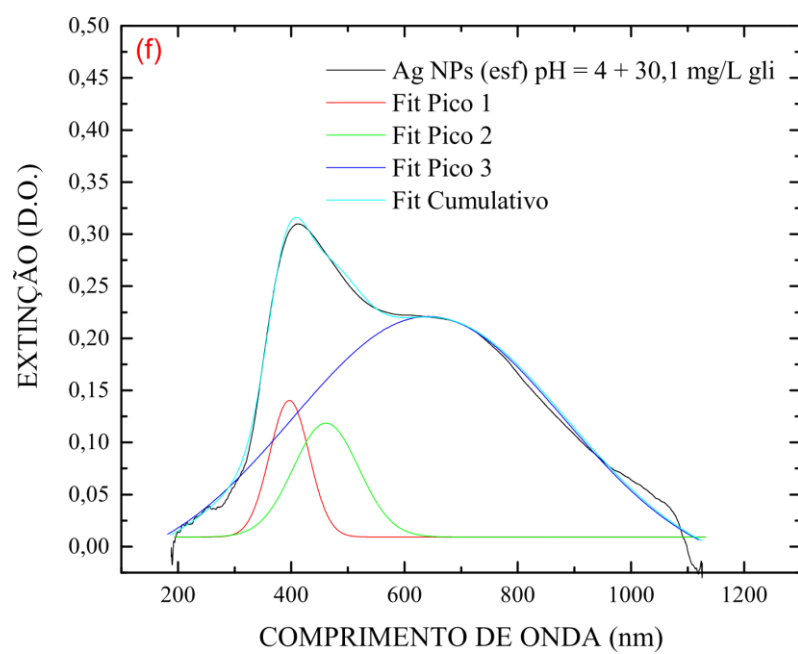
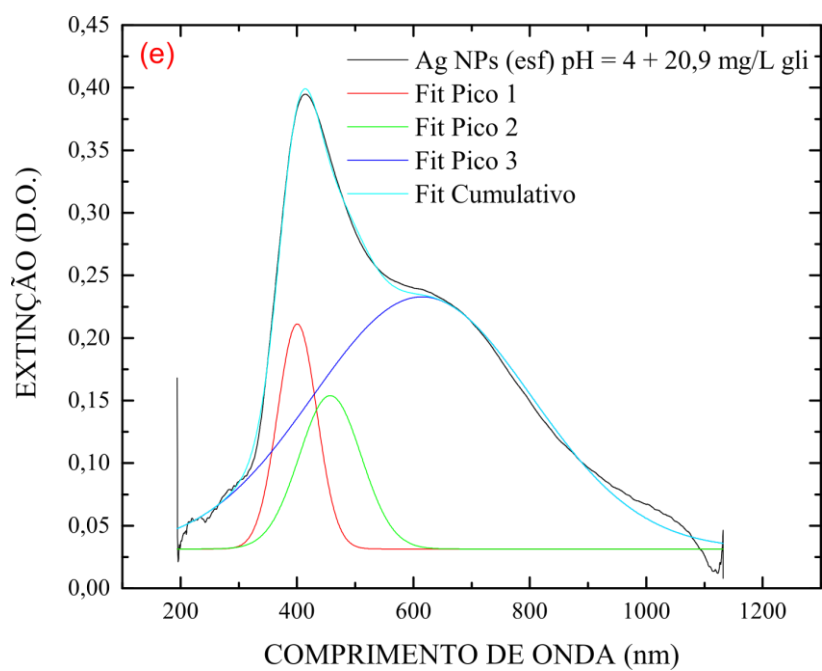
Nota: as marcações nas cubetas são referentes às alíquotas adicionadas de solução 4 mM de glifosato, a quais resultam em soluções com concentrações finais indicadas no gráfico de extinção.

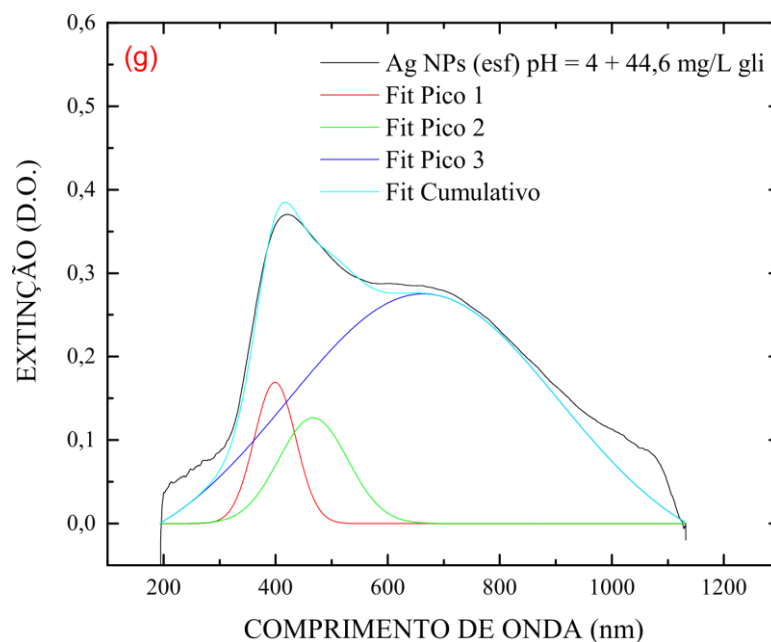
As bandas de plasmon apresentam o mesmo comportamento já observado na Figura 36 para três diferentes concentrações de glifosato.

Os espectros foram decompostos em gaussianas, apresentadas na Figura 52.

Figura 52 - Espectros de extinção em gaussianas para diferentes concentrações de glifosato.





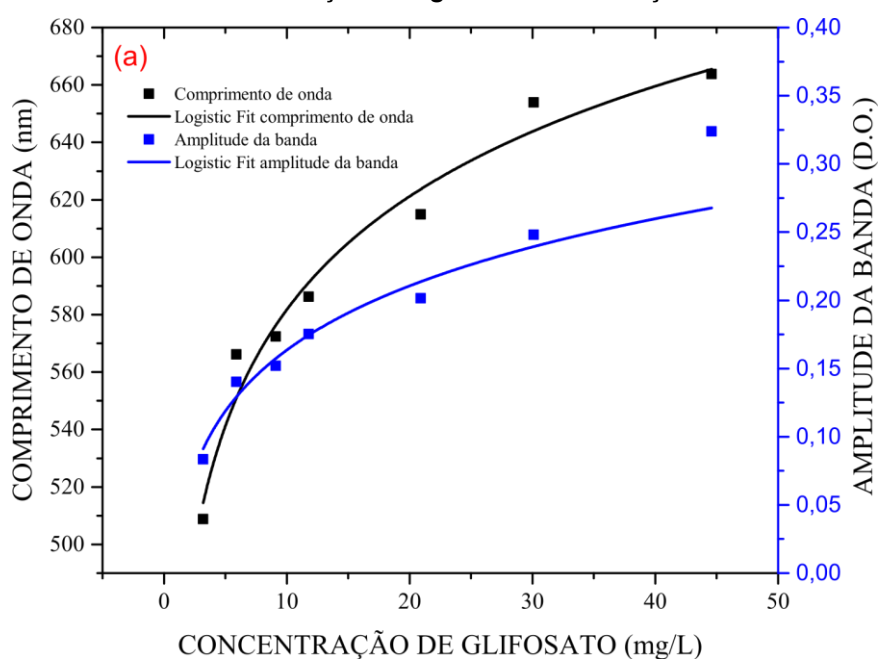


Fonte: o autor, 2019.

(a) 3,2 mg/L, (b) 5,4 mg/L, (c) 9,1 mg/L, (d) 11,8 mg/L, (e) 20,9 mg/L, (f) 30,1 mg/L e (g) 44,6 mg/L.

A amplitude e o comprimento de onda da terceira gaussiana, representada pela cor azul escuro, foram analisados em função do aumento da concentração de glifosato, realizando o ajuste para a curva logística de crescimento conforme a equação (6). Os resultados são apresentados na Figura 53.

Figura 53: Curvas ajustadas do comportamento da gaussiana 3 em função de diferentes concentrações de glifosato em solução



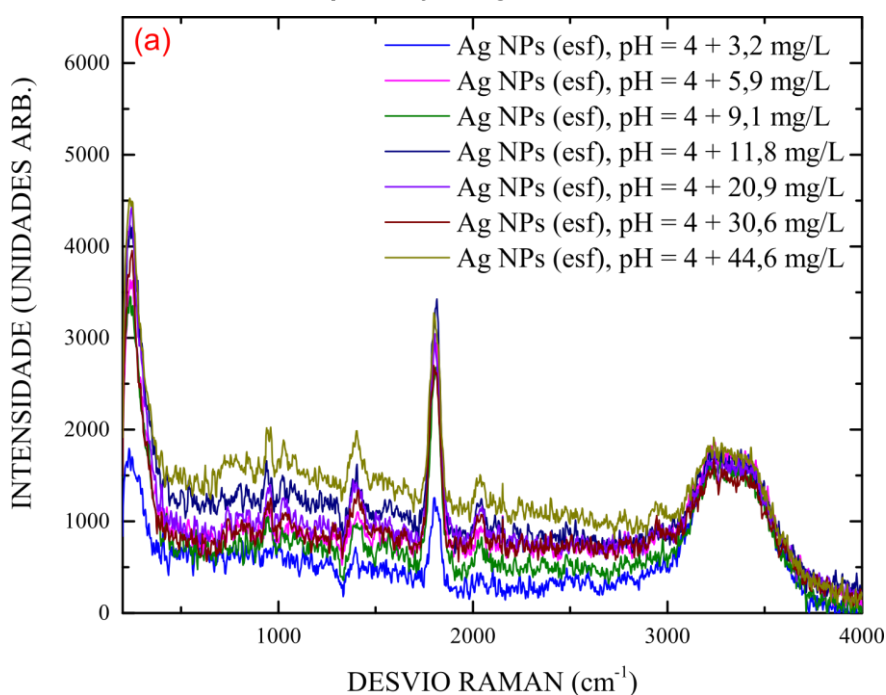
Model	Logistic (b)			Model	Logistic (c)		
Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$			Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$		
Reduced Chi-Sqr	161.11215			Reduced Chi-Sqr	452.39626		
Adj. R-Square	0.9446			Adj. R-Square	0.89114		
		Value	Standard Error			Value	Standard Error
COMPRIMENTO DE ONDA	A1	-1424.23723	397426.4366	AMPLITUDE DA BANDA	A1	-0.40248	22.936
	A2	1436.83136	70228.46386		A2	1.65078	157.66943
	x0	0.00143	3.19941		x0	3946.98645	2.98915E6
	p	0.0963	11.26723		p	0.1616	9.49942
	EC20	7.98929E-10	3.13595E-6		EC20	0.74257	189.507
	EC50	0.00143	3.19941		EC50	3946.98645	2.98915E6
	EC80	2550.7812	1.42728E6		EC80	2.09795E7	2.64582E10

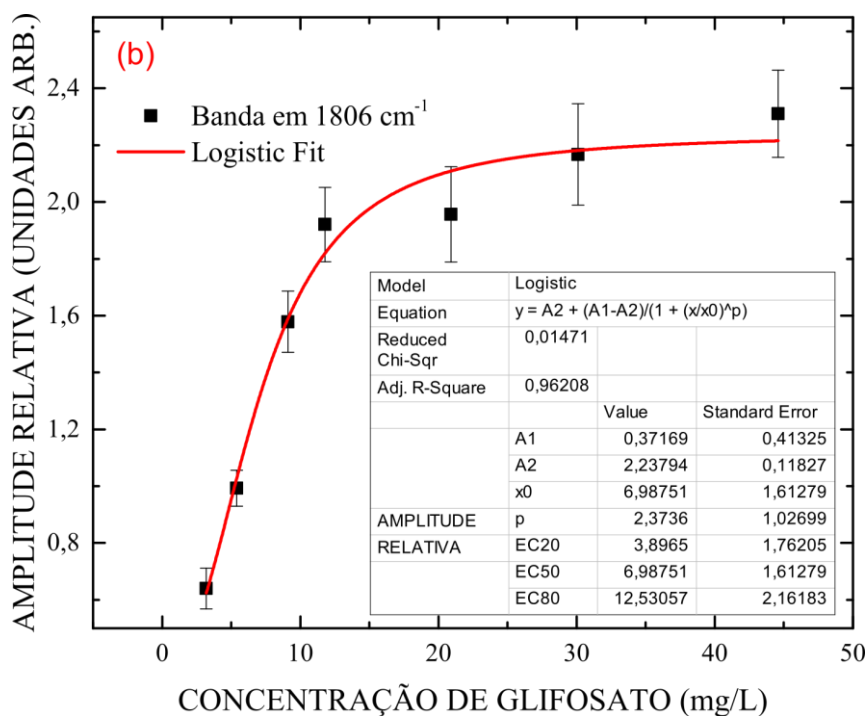
Fonte: o autor, 2019.

(a) Curvas logísticas ajustadas para o comprimento de onda e intensidade da gaussiana 3 em função da concentração de glifosato, (b) constantes ajustadas para o comprimento de onda e (c) constantes ajustadas para a intensidade da banda.

A análise por espectroscopia Raman da interação das nanoesferas com a molécula do glifosato e a curva logística ajustada para a intensidade da banda na região de 1806 cm^{-1} em função da concentração de glifosato são apresentadas na Figura 54.

Figura 54 - Espectros SERS e curva de calibração das soluções contendo nanoesferas de prata na presença de glifosato





Fonte: o autor, 2019.

(a) Espectro *SERS* e (b) curva logística ajustada para intensidade da banda em 1806 cm^{-1} .

Nota: curva de calibração da análise Raman com barras de incerteza total para a banda na região de 1806 cm^{-1} do espectro, os cálculos constam no Apêndice C.

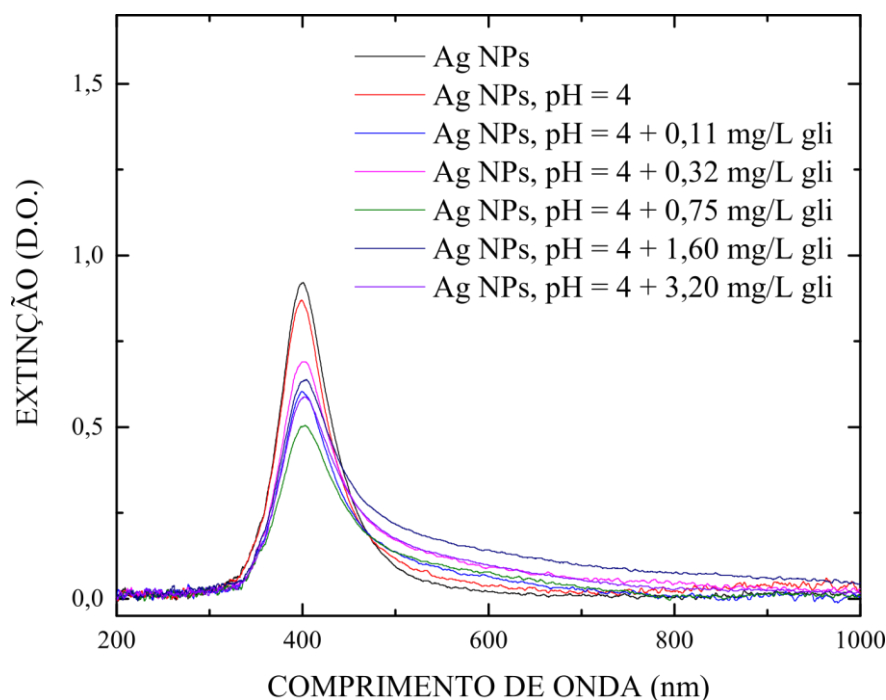
As duas bandas analisadas mostram uma relação de crescimento com o aumento do herbicida em solução e, considerando o comportamento da curva, as concentrações utilizadas estão distantes da região de mínimo, citada no item 3.5, região considerada próxima ao limite de detecção da técnica.

Utilizou-se a equação (2) para verificação da relação sinal/ruído da concentração de $3,2\text{ mg/L}$, a qual apresentou um valor de $9,37$ (cálculo no Apêndice B), relação distante do valor de 3 , considerado limite de detecção (conforme o item 2.3.2.2.), coerente com o comportamento das curvas.

Dessa forma, com uma nova solução de nanopartículas e seguindo a mesma metodologia, foram testadas concentrações menores de glifosato: $0,11\text{ mg/L}$, $0,32\text{ mg/L}$, $0,75\text{ mg/L}$, $1,5\text{ mg/L}$ e $3,2\text{ mg/L}$.

A leitura do espectro de extinção é apresentada na Figura 55.

Figura 55 - Espectro de extinção das NPs após ablação e com concentrações menores de glifosato



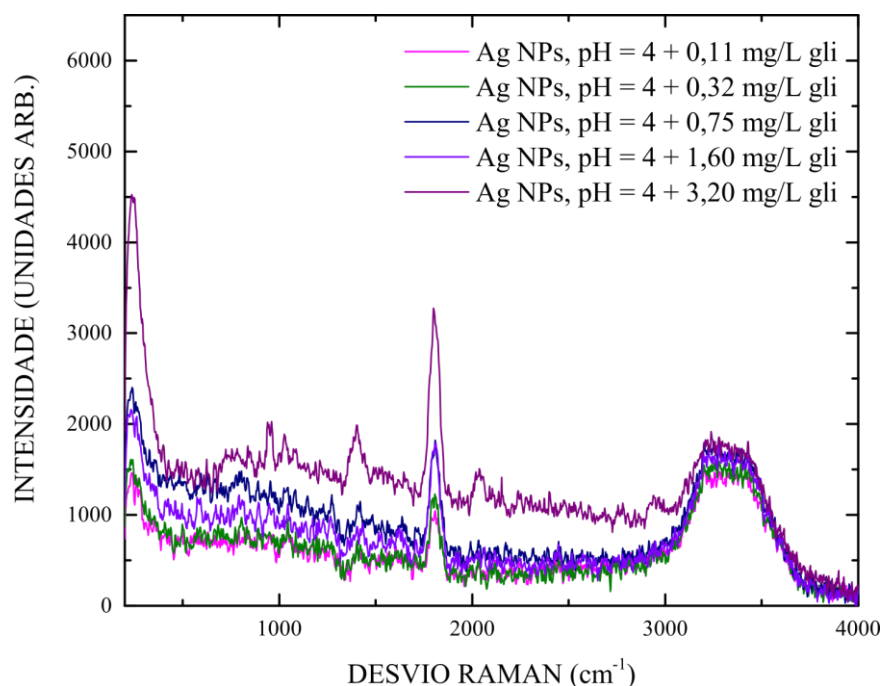
Fonte: o autor, 2019.

A comparação com a Figura 51a permite a observação de uma diminuição no crescimento da banda de plasmon associada à interação, demonstrando novamente a dependência com a concentração de glifosato em solução.

As nanopartículas após a ablação (espectro em preto) apresentaram também uma densidade ótica inferior à apresentada pela primeira solução (Figura 49, espectro em preto), ou seja, a nova solução continha uma menor concentração de Ag NPs. Tal fato foi atribuído às flutuações na intensidade do laser pois, conforme citado no item 2.2.2., a concentração de Ag NPs em solução é dependente da fluência do laser utilizado na ablação, o que diminui a reprodutibilidade dos testes.

Foi analisada a interação das nanoesferas sintetizadas com as menores concentrações de glifosato por espectroscopia Raman. As intensidades dos espectros em função das concentrações, são apresentadas na Figura 56.

Figura 56 - Espectros SERS das Ag NPs após a ablação com a posterior adição de concentrações menores de glifosato



Fonte: o autor, 2019.

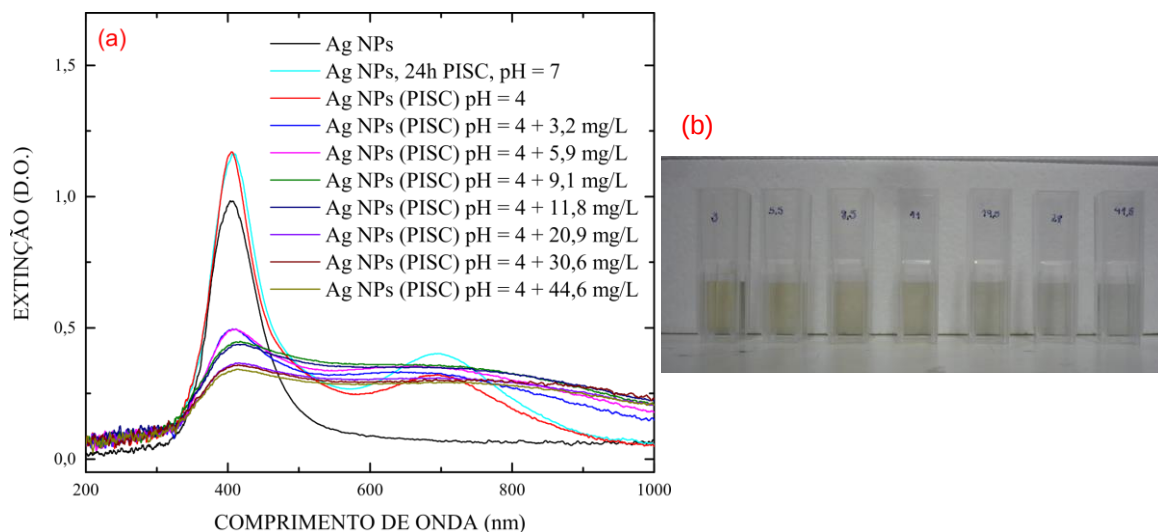
As concentrações menores revelam estar mais próximas da região do limite de detecção da técnica, quando comparadas com as intensidades dos espectros apresentados na Figura 54a.

A equação (2) foi então utilizada e a relação sinal/ruído para a amostra contendo 0,11 mg/L de glifosato foi de 5,70 (cálculo no Apêndice B), mais próxima, porém ainda superior ao limite de detecção.

3.5.1.2 Curvas de calibração amostra após a fotoconversão

Após o período de fotoconversão foram realizadas as leituras dos espectros de extinção e SERS para as sete concentrações analisadas, apresentados na Figura 57.

Figura 57 - Espectro de extinção e imagens das cubetas após o processo de fotoconversão e com a adição posterior de diferentes alíquotas de glifosato



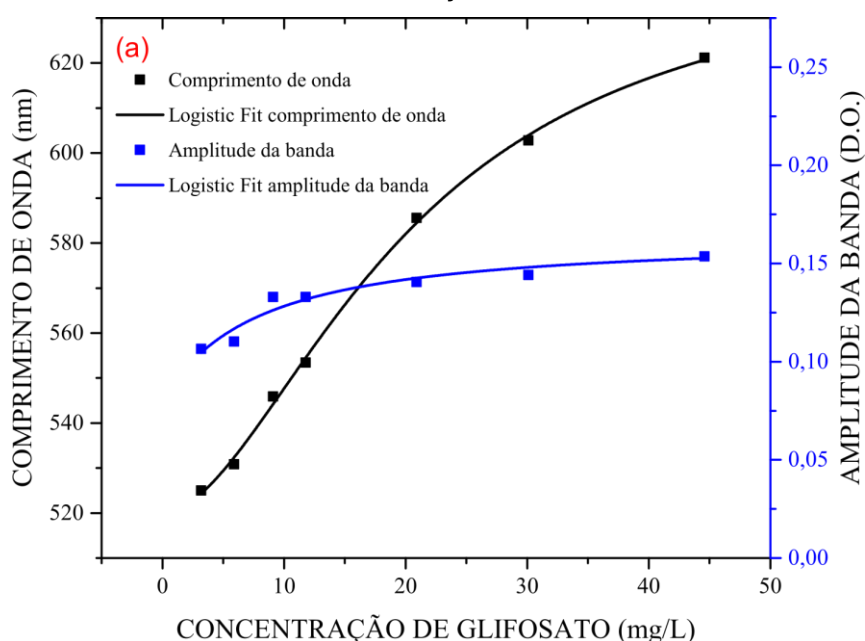
Fonte: o autor, 2019.

(a) espectros de extinção para as soluções após *PISC* e com adição posterior de glifosato e (b) imagem das 7 cubetas em ordem crescente de concentração de glifosato.

Nota: as marcações nas cubetas são referentes às alíquotas adicionadas de solução 4 mM de glifosato, a quais resultam em soluções com concentrações finais indicadas no gráfico de extinção.

A curva logística ajustada para o comprimento de onda e intensidade da banda plasmon atribuída à interação, em função da concentração, é apresentada na Figura 58.

Figura 58 - Curvas ajustadas do comportamento da banda de plasmon associada à interação das Ag NPs após a PISC com adição posterior de diferentes concentrações de glifosato em solução



Model	Logistic (b)			Model	Logistic (c)		
Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$			Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$		
Reduced Chi-Sqr	3.28573			Reduced Chi-Sqr	0,08304		
Adj. R-Square	0.99761			Adj. R-Square	0,90845		
COMPRIMENTO DE ONDA		Value	Standard Error	AMPLITUDE DA BANDA		Value	Standard Error
	A1	519.87057	3.04732		A1	0,08181	0,08505
	A2	645.0755	9.37899		A2	0,16353	0,03551
	x0	20.16486	1.76361		x0	7,73853	10,8288
	p	1.78881	0.21974		p	1,07103	1,81349
	EC20	9.29018	0.6073		EC20	2,12092	7,34765
	EC50	20.16486	1.76361		EC50	7,73853	10,8288
	EC80	43.76895	7.47304		EC80	28,23529	34,82312

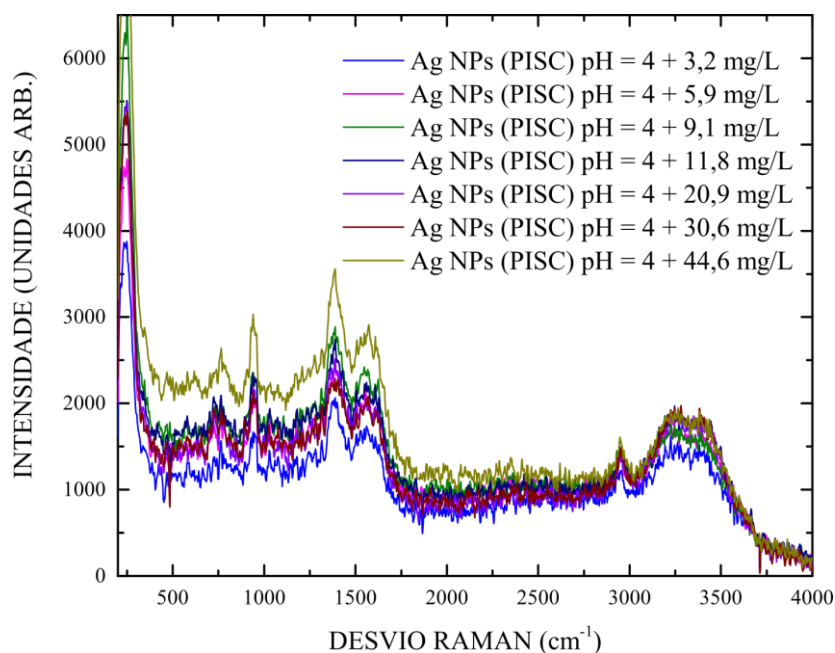
Fonte: o autor, 2019.

(a) Curvas logísticas ajustadas para o comprimento de onda e intensidade da banda de interação das nanopartículas após a fotoconversão em função da concentração de glifosato, (b) constantes ajustadas para o comprimento de onda e (c) constantes ajustadas para a intensidade da banda.

Fonte: o autor, 2019.

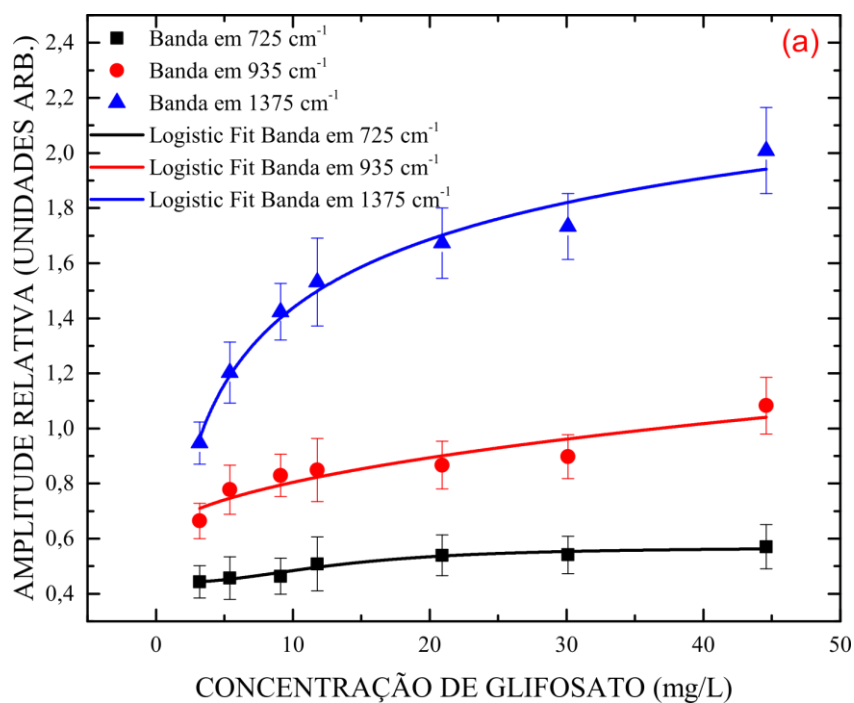
A análise por espectroscopia Raman e a curva logística ajustada para a intensidade das bandas em 725, 935 e 1375 cm⁻¹ em função do aumento da concentração de glifosato são apresentadas na Figura 59 e 60.

Figura 59 - Espectros SERS das soluções contendo nanopartículas após fotoconversão com adição posterior de glifosato



Fonte: o autor, 2019.

Figura 60 - Curvas logísticas ajustadas para as amplitudes relativas das bandas nas regiões de 725, 935 e 1375 cm⁻¹ do espectro SERS



Model	Logistic			Model	Logistic			Model	Logistic		
Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$			Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$			Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$		
Reduced Chi-Sqr	1.95098E-4		(b)	Reduced Chi-Sqr	0.00399		(c)	Reduced Chi-Sqr	0.00499		(d)
Adj. R-Square	0.91989			Adj. R-Square	0.75247			Adj. R-Square	0.95977		
		Value	Standard Error			Value	Standard Error			Value	Standard Error
725	A1	0.43877	0.01982	935	A1	0.59399	1.12067	1375	A1	-9.70414	718.91758
	A2	0.56977	0.02512		A2	5.03633	316.58715		A2	3.44122	22.06984
	x0	13.13384	3.10071		x0	2541.48479	451091.4977		x0	0.00465	1.80406
	p	2.35717	1.44211		p	0.54201	4.84574		p	0.22354	4.32727
	EC20	7.29415	2.68969		EC20	196.92583	30478.97201		EC20	9.41995E-6	0.00479
	EC50	13.13384	3.10071		EC50	2541.48479	451091.4977		EC50	0.00465	1.80406
	EC80	23.64876	11.45013		EC80	32799.8869	6.56794E6		EC80	2.29447	615.2886

Fonte: o autor, 2019.

(a) curvas logísticas ajustadas para a amplitude relativa das bandas nas regiões de 725, 935 e 1375 cm^{-1} , (b) constantes ajustadas para a amplitude relativa da banda 725 cm^{-1} , (c) constantes ajustadas para a amplitude relativa da banda 935 cm^{-1} e (d) constantes ajustadas para a amplitude relativa da banda 1375 cm^{-1} .

Os resultados das espectroscopias de extinção e *SERS* demonstraram um comportamento semelhante ao apresentado no item 3.5.3.1, para nanopartículas sem fotoconversão, para as concentrações utilizadas.

A equação (2) foi utilizada para verificação da relação sinal/ruído da concentração de 3,2 mg/L, e apresentou os valores de 6,12, 9,18 e 13,08 para as regiões de 725, 935 e 1375 cm^{-1} , respectivamente.

Assim, para a concentração de 3,2 mg/L, as razões encontradas estão relacionadas na tabela 11.

Tabela 11 - Relações entre a intensidade do sinal e do ruído para a amostra de 3,2 mg/L

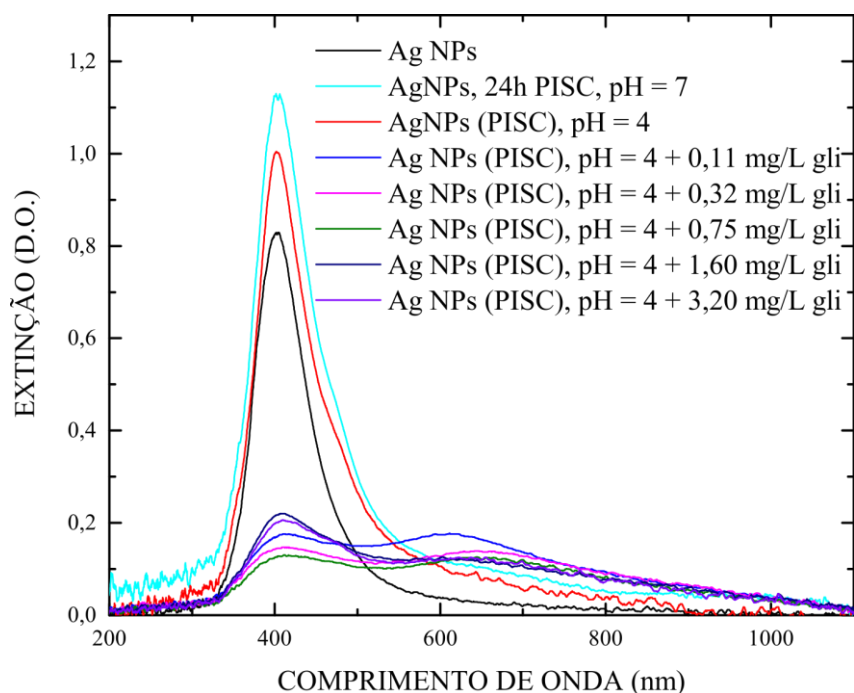
REGIÃO DE PICO (cm^{-1})	RELAÇÃO DAS INTENSIDADES
	$(2 * \Delta S) / \Delta N$
1.806	9,37
725	6,12
935	9,18
1.375	13,08

Fonte: o autor, 2019.

As soluções com concentrações menores citadas no item 3.5.3.1. (0,11 mg/L, 0,32 mg/L, 0,75 mg/L, 1,5 mg/L e 3,2 mg/L) também foram testadas após o processo de fotoconversão da solução coloidal.

A leitura do espectro de extinção é apresentada na Figura 61.

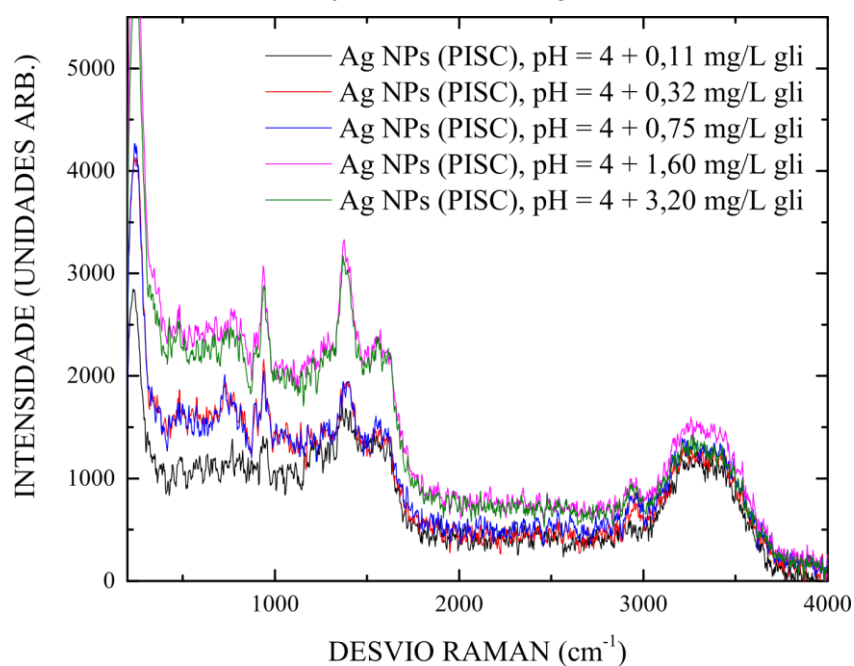
Figura 61 - Espectro de extinção de nanopartículas após a fotoconversão com adição posterior de concentrações menores de glifosato



Fonte: o autor, 2019.

A análise por espectroscopia Raman da interação das nanoesferas com as menores concentrações de glifosato é apresentada na Figura 62.

Figura 62 - Espectros SERS das soluções contendo Ag NPs (após a PISC) em solução com concentrações menores de glifosato



Fonte: o autor, 2019.

Utilizou-se novamente a equação (2) e tabela 11 apresenta as relações sinal/ruído para as bandas de interação antes e após a fotoconversão para a concentração de 0,11 mg/L de glifosato.

Tabela 12 - Relações das intensidades sinal/ruído para a amostra de 0,11 mg/L

REGIÃO DE PICO (cm^{-1})	RELAÇÃO DAS INTENSIDADES
	$(2 * \Delta S) / \Delta N$
1.806	5,70
725	3,63
935	5,63
1.375	10,02

Fonte: o autor, 2019

Nota: os cálculos constam no Apêndice B.

Considerando os dados apresentados na tabela, todas as relações estão acima do valor fixo do LOD de 3 (conforme apresentado no item 2.3.2.2.), e a banda em 725 cm^{-1} apresentou a intensidade mais próxima do limite de detecção para essa concentração. Ao considerar a banda em 1375 cm^{-1} apresentada pelas nanoestruturas hexagonais e prismáticas, essa relação é superior quando comparada à relação apresentada pela banda em 1806 cm^{-1} , das nanoesferas.

4. CONCLUSÕES

No presente trabalho foi apresentado o desenvolvimento de uma metodologia de síntese de nanopartículas de prata e posterior fotoconversão de nanoesferas.

Foram analisados os parâmetros de concentração de citrato de sódio, concentração de peróxido de hidrogênio, temperatura da sala, tempo de ablação, energia de pulso e frequência do laser. A comparação das diferentes concentrações do agente estabilizante e redutor, citrato de sódio, permitiu a conclusão de que maiores concentrações do sal resultam em um processo de fotoconversão mais eficiente, porém a intensificação de sinal Raman, testada com o analito rodamina 6G, é prejudicada devido ao processo de estabilização das nanopartículas em solução.

A metodologia de ablação a laser foi então definida de modo a realizar a síntese de nanopartículas sementes que apresentem interação com o analito: maior energia de pulso (17 mJ), menor tempo de ablação (20 minutos), taxa de repetição do pulso de 10 Hz, temperatura controlada a 22,0°C e menor concentração de citrato de sódio (0,1 mM).

Os resultados de espectroscopia Raman da rodamina 6G com nanoestruturas de prata prismáticas e hexagonais, com concentração de 0,1 mM do sal, evidenciaram uma intensificação de sinal superior quando comparada ao efeito *SERS* verificado para nanopartículas esféricas de mesma concentração. Tal comportamento foi atribuído à concentração dos campos eletromagnéticos nas bordas afiadas de tais estruturas e à sintonização das ressonâncias plasmônicas, mais próximo da sintonia para o bombeamento do laser utilizado nas interrogações.

Para o herbicida glifosato as nanoestruturas prismáticas e hexagonais também apresentaram uma melhora na intensificação de sinal com uma relação sinal/ruído de 10,02 para a menor concentração analisada de 0,11 mg/L. Já para as nanoesferas essa relação foi de 5,70. Essa concentração é aproximadamente cinco vezes menor do que o limite máximo de glifosato em amostras de água permitido no Brasil (0,5 mg/L).

Concluiu-se que para a faixa de concentrações deste trabalho, a detecção é facilitada pela maior relação sinal/ruído para os nanoprismas e nanohexágonos, comparado com as nanoesferas, além disso, o espectro apresentou três bandas em regiões de assinatura de vibrações moleculares do herbicida, mostrando ser uma metodologia adequada para sua detecção.

5. CONTINUIDADE DO TRABALHO

Considerando os resultados apresentados nessa dissertação para a detecção do glifosato em água utilizando as técnicas de espectroscopia ótica, novos experimentos serão realizados com o objetivo do desenvolvimento de um sensor para o herbicida.

A metodologia de fotoconversão, assim como as rotas para síntese de nanopartículas serão estudadas mais amplamente, objetivando o desenvolvimento de um processo de conversão mais eficiente e mais reprodutivo, e consequentemente com uma maior intensificação do efeito *SERS* e um limite de detecção de valor inferior.

Além disso, a metodologia desenvolvida para detecção do herbicida pode ser ampliada e adequada para outros contaminantes.

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. In: **Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios**, 2., 2003, [Valladolid]. Valladolid: Itacyl, 2003. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/15121>. Acesso em 27 nov. 2018.

ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias estratégicas**, Brasília, v. 9, n. 18, ago. 2004.

ANDRIOLLI, A. I. Roundup, o câncer e o crime do “colarinho verde”. **CNFEAB**, Cuiabá, 2011. Disponível em: <https://feab.wordpress.com/2011/11/21/o-roundup-o-cancer-e-o-crime-do-colarinho-verde/>. Acesso em: 22 nov. 2018.

Ascom/ANVISA. Glifosato prossegue sob análise na Anvisa. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 08 ago. 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/3501501. Acesso em: 22 nov. 2018.

*Como nuvem letal matou mais de 8 mil pessoas em 72 horas. **BBC News Brasil**, São Paulo, v.12, n. 141203, 03 dezembro 2014. Disponível em: https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2014/12/141203_gas_india_20anos_rp. Acesso em: 22 nov. 2018.

BOMBARDI, L. M. "**Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**". FFLCH - USP, São Paulo, 2017. Disponível em: < <https://www.larissabombardi.blog.br/atlas2017> >. Acesso em: 10 nov. 2018.

BORRERO, N. F. V. **Nanopartículas de Prata Produzidas por Ablação à Laser em Água Deionizada**. 95p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Física da Universidade de Campinas, 2015.

BRAGANÇA, A. C. C. R. **Avaliação de reagentes alternativos para substituição da cal em sistema de bombeamento de longa distância de polpa de minério de ferro**. 110 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

BRITO-SILVA, A. M. **Fabricação e caracterização de compósitos fotônicos contendo nanopartículas dielétricas e metálicas**. 145 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em ciências de materiais da Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

CANCIAN, N. Anvisa propões manter o aval a glifosato, mas com restrições. **Folha de São Paulo**, São Paulo, ano 99, 26 fev. 2019. Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/mercado/2019/02/anvisa-propoe-manter-aval-a-glifosato-mas-com-restricoes.shtml>>. Acesso em: 09 mar. 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**. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Farmácia e Bioquímica da Universidade do Estado da Paraíba, 2013.

CARMO, A. P. **Influência de nanopartículas metálicas e semicondutoras em vidros dopados com terras-raras para aplicações fotônicas**. 109 p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Física - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2011.

CARNEIRO, F. F. et al. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. 624 p. **Expressão popular**. Rio de Janeiro/São Paulo, 2015. Disponível em: <http://contraosagrototoxicos.org/dossieagrototoxicos/>. Acesso em: 19 set. 2018.

CARVALHO, F. P. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Enviromental Science & Policy**, n. 9: pp.685-692, 2003.

CARVALHO, M. M. X., NODARI, E. S., NODARI, R. O. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, ciência e saúde**, v. 24, n.1, p. 75-91, Rio de Janeiro, 2017.

CAVALCANTE, E. **Síntese e propriedades ópticas de sistemas coloidais contendo nanopartículas de ouro dispersas em óleo de mamona**. 118 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, 2009.

CETESB. Conferências internacionais. **Programa Estadual de mudanças climáticas do Estado de São Paulo**. São Paulo, 2012. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/proclima/conferencias-internacionais-sobre-o-meio-ambiente/>. Acesso em: 15 nov. 2018.

CHASE, B. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 881A - 890A, 1987. DOI: 10.1021/ac00141a001. Acesso em: 18 nov. 2017.

CIOU, S. et al. SERS Enhancement Factors Studies of Silver Nanoprism and Spherical Nanoparticle Colloids in The Presence of Bromide Ions. **Physical Chemistry**, v. 113, p. 9520–9525, 2009.

COCKER, J. et al. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. **Toxicology Letters**, vol. 134, p. 97-103, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427402001686?via%3Dihub>. Acesso em: 22 nov. 2018.

COSTA, J. C. S. **Desenvolvimento de sensores nanoestruturados para análises químicas por meio de técnicas espectroscópicas**. Tese (Doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.

COSTA, J. C. S. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy studies of organophosphorus model and pesticides. Paper in: **Physical Chemistry**, v. 14, ps. 15645-15651, 2012.

CRUZ, I. A proibição do uso de Glifosato, saúde e o sistema judiciário no Brasil. **Terra de Direitos**, 03 set. 2018. Disponível em: <https://terradedireitos.org.br/noticias/noticias/a-proibicao-do-uso-de-glifosato-saude-e-o-sistema-judiciario-no-brasil/22902>. Acesso em 22 nov. 2018.

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

DAN, H. A., et al. Efeito do pH da calda de pulverização na dessecação de *Braquiaria brizanta* com o herbicida glyphosate. **GI Science. Technology**, v. 02, n. 01, p.01 - 06, 2009.

DESASTRE de Minamata, crime ecológico que deixou marcas por décadas no Japão. **Jornal O Globo**, São Paulo, 23 set. 2013. Disponível em: <https://acervo.o.globo.globo.com/fatos-historicos/desastre-de-minamata-crime-ecologico-que-deixou-marcas-por-decadas-no-japao-10102255#ixzz5Wx6W3uv0>. Acesso em 15 nov. 2018.

DESIMONI, E., BRUNETTI, B. About Estimating the Limit of Detection by the Signal to Noise Approach. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 06, issue 03, 2015. DOI: 10.4172/2153-2435.1000355.

DISTRITO FEDERAL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução 357 de 17 mar. 2005. [Dispõe Sobre a Classificação dos Corpos de Água e Diretrizes Ambientais Para o seu Enquadramento, bem como Estabelece as Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes, e da Outras Providências]. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, 2011.

DONNICI, C. L. et al. Traçadores: o uso de agentes químicos para estudos hidrológicos, ambientais, petroquímicos e biológicos. **Química Nova**, vol. 32, n. 6, 2009.

EMBRAPA. Uso de agrotóxicos. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fohgb6co02wyiv8065610dc2ls9ti.html>. Acesso em: 19 nov. 2018.

FARACO, T. A. **Estudo das Propriedades Térmicas, Ópticas e Estruturais de Vidros Fosfato de Silício Dopados com Érbio e Prata para Aplicação em Telecomunicação**. 117 p. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2015.

FARADAY M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and their Metals) to Light. **Philosophical Transactions**, v. 147, ps. 145-181, 1857.

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, p. 319, 1997.

GHISELLI, G; JARDIM, W.F. “**Interferentes endócrinos no ambiente**”. Química Nova, vol. 30, n. 3, p. 695-706, 2007. Disponível em: < <http://quimicanova.sbq.org.br/default.asp?ed=61> >. Acesso em: 19 nov. 2018.

GÓES, R. et al. Modelos Baseados em Espectros Raman para Avaliação de Toxicidade de Misturas Etanol-Metanol, In: **MOMAG 2014: 16º SBMO - Simpósio Brasileiro de Micro-ondas e Optoeletrônica e 11º CBMag - Congresso Brasileiro de Eletromagnetismo** [S.1.: s.n.], 2014.

GÓES, R. **Deteção de glifosato em água por reconhecimento de padrões em espectroscopia assistida por nanopartículas de prata fabricadas por ablação a laser**. 176 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018.

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

IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **International Agency of Research on Cancer**, p. 249–294, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4781178/>. Acesso em 23 out. 2017.

IBAMA. Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente**, 2002. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em 13 out. 2018.

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

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

JAIN, P. K. et al. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape and composition: applications in biological imaging and biomedicine. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 14, p. 7238–7248, 2006.

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, 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. **Angew. Chem.**, v.52, p. 13910-13940. 2013.

LARINI, L. Toxicologia dos praguicidas. São Paulo: **Manole**, p. 230, 1999.

LAZZERI, T. Brasil libera quantidade até 5.000 vezes maior de agrotóxicos do que Europa. **UOL meio-ambiente**, 27 nov. 2017. Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/meio-ambiente/ultimas-noticias/redacao/2017/11/27/brasil-libera-quantidade-ate-5000-vezes-maior-de-agrotoxicos-do-que-europa.htm>. Acesso em: 22 nov. 2018.

LEE, G. P. et al. The citrate-mediated shape evolution of transforming photomorphical silver nanoparticles. **The Royal Society of Chemistry**, v. 46, p.7807–7809, 2010.

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

MAPA. “**Informações técnicas**”. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 10 fev. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Acesso em 19 nov. 2018.

MATOS, F. S. **Determinação de glifosato e AMPA em água por injeção direta da amostra em cromatografia iônica capilar e LC-MS/MS**. 132 p. Dissertação

(Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

MELO, K. G. **Determinação de glifosato em amostras de urina humana pela derivatização com cloroformato de 9-fluorenilmetilo por cromatografia líquida com detecção de fluorescência**. 105 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, 2018. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/331789/1/Melo_KarolyneGramlichDe_M.pdf>. Acesso em 10 jan. 2019.

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

MIRELA, D. **Metallic Nanoparticles**. 89 p. Tese (Doutorado) - Programme Physics of University of Nova Gorica, 2009. Disponível em: <http://www.ung.si/~sstanic/teaching/Seminar/>. Acesso em: 10 nov. 2018.

MMA. **Produtos Agrotóxicos**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 30 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/agenda-21/itemlist/category/110-agrotoxicos.html>>. Acesso em 15 nov. 2018.

MONSANTO ordered to pay \$289m as jury rules weedkiller caused man's cancer. **THE GUARDIAN**. London, 11 ago. 2018. Disponível em: <https://www.theguardian.com/business/2018/aug/10/monsanto-trial-cancer-dewayne-johnson-ruling>. Acesso em: 22 nov. 2018.

MOREIRA, J. C. et al. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, vol. 7, n. 2, p. 299-311, 2002.

MPF. Processo N° 0021371-49.2014.4.01.3400 - 7ª VARA - BRASÍLIA N° de registro e-CVD 00086.2018.00073400.2.00559/00032. **Tribunal Regional Federal da Primeira Região**. Brasília, 2018. Disponível em: <http://www.mpf.mp.br/df/sala-de-imprensa/docs/decisao-glifosato>. Acesso em: 23 nov. 2018.

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.

NICOLODELLI, G. **Produção por ablação a laser e caracterização de nanotubos de carbono**. 109 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/76/76132/tde-25052011-162657/pt-br.php>. Acesso em 26 nov. 2018.

ONU. A ONU e o meio ambiente. **Organização das Nações Unidas**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/acao/meio-ambiente/>>. Acesso em 15 nov. 2018.

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.

PARHOODEH, S.; KOWSARI, M. Synthesis, characterization and study of band gap variations of vanadium doped indium oxide nanoparticles. **Physica B: Condensed Matter**, v. 498, p. 27–32, 2016.

PARNKLANG, T.; LAMLUA, B.; GATEMALA, H. Shape transformation of silver nanospheres to silver nanoplates induced by redox reaction of hydrogen peroxide. **Materials Chemistry and Physics**, v. 153, p. 127–134, 2015.

PEITER, G.C. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de glifosato e ampa em águas**. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Tecnologias de Bioprodutos Agroindustriais da Universidade Federal do Paraná, 2017.

PIMENTA, E. M. **Extração de glifosato e ácido aminometilfosfônico da madeira de eucalipto e quantificação por HPLC-ICP-MS**. 107 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciência Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, 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**. 93 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília, 2015.

PIZZUTTI, I. R.; VARELI, C. S.; DA SILVA, R. C. **European Pesticide Residues Workshop (EPRW)**, 7 ed., Berlin: Book of Abstracts, 2008.

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

QUIAN, K. et al. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5- dinitrobenzotrifluoride. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, p. 222-226, 2009.

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

ROCH, P; COOPER, EL. Cellular but not humoral antibacterial activity of earthworms is inhibited by Aroclor 1254. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 22. p.283-90, 1991.

RODRIGUES, A. G., GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, vol. 34, n. 4, ps. 1-9, 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.

ROMANI, E. C. “**Fabricação e caracterização óptica e morfológica de nanopartículas de ouro em substrato vítreo**”. 156 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Física da Pontifícia Universidade Católica Do Rio De Janeiro, 2011. Disponível em: https://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/Busca_etds.php?strSecao=resultado&nrSeq=18747@1. Acesso em: 26 nov. 2018.

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

SAADE, J. **Síntese/Fabricação e caracterização de micro e nanoestruturas para aplicação na fotônica e plasmônica**. 160 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

SANTOS, V. M. R. et al. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000100028&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 22 nov. 2018.

SCHULZ, P. A. Há mais história lá embaixo - um convite para rever uma palestra. **Revista brasileira de Ensino de Física**, vol. 40 n.4. São Paulo, 2018.

SESP. “**Protocolo de avaliação das intoxicações crônicas por agrotóxicos**”. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Curitiba, 2013. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CEST/Protocolo_AvaliacaoIntoxicacaoAgrotoxicos.pdf>. Acesso em 15 nov. 2018.

SHRIVASTAVA, A., GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, vol. 2, issue 1, 2011. DOI: 10.4103/2229-5186.79345.

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.** 96 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Química Analítica da Universidade de São Paulo, 2009.

SILVA, S. M. P. Brasil lidera o ranking mundial de uso de agrotóxicos. **DM**, Goiânia, jul. 2018. Disponível em: <https://www.dm.com.br/cotidiano/2018/07/brasil-lidera-o-ranking-mundial-de-uso-de-agrotoxicos.html>. Acesso em: 12 nov. 2018.

SINAN. Intoxicações 2007 a 2014. **Protocolo de dados abertos sobre agrotóxicos.** Disponível em: http://dados.contraosagrotoxicos.org/pt_PT/dataset/intoxicacoes-sinan/resource/95a0423b-2ac4-4cf5-8b6f-3f16b55dc709. Acesso em: 19 nov. 2018.

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

SUN, Y. et al. Transformation of Silver Nanospheres into Nanobelts and Triangular Nanoplates through a Thermal Process. **Nano Letters**, v. 3, n. 5, p. 675–679, 2003.

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.

TAÇA de 1.600 anos que muda de cor já usava princípios de nanotecnologia. **G1**. São Paulo, 27 ago. 2013. Disponível em: <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2013/08/taca-de-1600-anos-que-muda-de-cor-ja-usava-principios-de-nanotecnologia.html>. Acesso em 29 nov. 2018.

THE LANCET. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **Elsevier**, v. 16, issue 5, mai. 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8). Acesso em: 26 nov. 2018.

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, 01 nov. 2012.

WEI, H.; ABTAHI, S.M.H.; VIKESLAND, P.J. Plasmonic colorimetric and SERS sensors for environmental analysis. **Environment Science Nano**, n 02, ps. 120–135,

2015. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/en/c4en00211c>>. Acesso em: 23 out. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dithiocarbamates pesticides ethylenethiourea, and propylenethiourea: a general introduction. **Environmental health criteria**, p.17-102, Geneva, 1998.

ZHANG, T. et al. Synthesis of Silver Nanostructures by Multistep Methods. **Sensors**, v. 14, p. 5860–5889, 2014. DOI: 10.3390/s140405860.

ZEENA, S. P.; PRASHANT, V. K. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method?. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 108, p.945–951, 2004.

APÊNDICE A – CÁLCULOS DE INCERTEZA NA CONCENTRAÇÃO DE GLIFOSATO:

Concentração da solução mãe:

$$C_{sol} = \frac{m}{V_{sol}}$$

m (massa de glifosato adicionada) = 0,03380 g

V_{sol} (volume do balão volumétrico) = 50 mL

$C_{sol} = 0,676$ g/L

$$C_{sol} = MM_{gli} * M_{sol}$$

$MM_{gli} = 169,05$ g/mol

$$M_{sol} = 4.10^{-3} \text{ mol/L}$$

Incerteza na concentração de glifosato da solução mãe ($\sigma_{M_{sol}}$)

$$\sigma_{M_{sol}} = \frac{m}{(MM_{gli} * V_{sol})} * \sqrt{(\sigma_m/m)^2 + (\sigma_V/V)^2}$$

σ_V (incerteza no volume do balão volumétrico de classe B) = $0,1.10^{-3}$ L

σ_m (incerteza na massa de glifosato), calculada em relação à resolução da balança analítica:

$$\sigma_m = \frac{0,0001}{2\sqrt{3}}$$

$$\sigma_m = 2,89.10^{-6} \text{ g}$$

$$\sigma_{M_{sol}} = \frac{0,03380}{169,05 * 50.10^{-3}} * \sqrt{(2,89.10^{-6}/0,03380)^2 + (1.10^{-3}/0,05)^2}$$

$$\sigma_{M_{sol}} = 8,004939093.10^{-6} \text{ mol/L}$$

A concentração para cada amostra (C_{gli}) foi determinada conforme a equação:

$$C_{gli} = \frac{C_{sol} * Valí}{V_t}$$

$Valí$ (volume da alíquota) = 3.10^{-6} , 5.10^{-6} , $8,5.10^{-6}$, 11.10^{-6} , $19,5.10^{-6}$, 28.10^{-6} e $41,5.10^{-6}$ L.

V_t (volume total da amostra) = $0,629.10^{-3}$ L.

1ª concentração:

$$C_{gli} = \frac{0,676 * 3.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}$$

$$C_{gli} = 3,2.10^{-3}g$$

2ª concentração:

$$C_{gli} = \frac{0,676 * 5.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}$$

$$C_{gli} = 5,4.10^{-3}g$$

3ª concentração:

$$C_{gli} = \frac{0,676 * 8.5.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}$$

$$C_{gli} = 9,1.10^{-3}g$$

4ª concentração:

$$C_{gli} = \frac{0,676 * 11.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}$$

$$C_{gli} = 11,8.10^{-3}g$$

5ª concentração:

$$C_{gli} = \frac{0,676 * 19,5.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}$$

$$C_{gli} = 20,9.10^{-3}g$$

6ª concentração:

$$C_{gli} = \frac{0,676 * 28.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}$$

$$C_{gli} = 30,1.10^{-3}g$$

7ª concentração:

$$C_{gli} = \frac{0,676 * 41,5.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}$$

$$C_{gli} = 44,6.10^{-3}g$$

Incerteza na concentração de glifosato das amostras ($\sigma_{C_{gli}}$):

$$\sigma_{C_{gli}} = C_{gli} * \sqrt{(\sigma_{Msol}/Msol)^2 + (\sigma_{Vali}/Vali)^2 + (\sigma_{Vt}/Vt)^2}$$

σ_{ali} (incerteza no volume de cada alíquota adicionada), em relação à resolução da micropipeta utilizada:

$$\sigma_{ali} = \frac{0,5.10^{-3}}{2 * \sqrt{3}}$$

$$\sigma_{ali} = 0,144 \cdot 10^{-6} L$$

σ_{Vt} (incerteza no volume total da solução), relativa às resoluções de todas as pipetas utilizadas para cada reagente adicionado, calculada por:

$$\sigma_{Vt} = \sqrt{(\sigma_{nps})^2 + (\sigma_{Vgli})^2 + (\sigma_{V\acute{a}gua})^2 + (\sigma_{Vtam})^2}$$

σ_{nps} (resolução da micropipeta utilizada para a retirada da alíquota da solução de nanopartículas)

$$\sigma_{nps} = \frac{0,02}{2 * \sqrt{3}}$$

σ_{Vgli} , $\sigma_{V\acute{a}gua}$ e σ_{Vtam} com o mesmo valor, considerando a resolução da micropipeta utilizada para a retirada das alíquotas

$$\sigma_{Vgli}, \sigma_{V\acute{a}gua} \text{ e } \sigma_{Vtam} = \frac{0,5 \cdot 10^{-3}}{2 * \sqrt{3}}$$

Logo:

$$\sigma_{Vt} = \sqrt{\left(\frac{0,02}{2 * \sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,5 \cdot 10^{-3}}{2 * \sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,5 \cdot 10^{-3}}{2 * \sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0,5 \cdot 10^{-3}}{2 * \sqrt{3}}\right)^2}$$

$$\sigma_{Vt} = 5,8 \cdot 10^{-6} L$$

Dessa forma, as incertezas foram calculadas para cada concentração:

1ª concentração (3,2 mg/L)

$$\sigma_{Cgli} = 3,2 \cdot 10^{-3} * \sqrt{\left(\frac{8,004939093 \cdot 10^{-6}}{4 \cdot 10^{-3}}\right)^2 + \left(\frac{0,144 \cdot 10^{-6}}{3 \cdot 10^{-6}}\right)^2 + \left(\frac{5,8 \cdot 10^{-6}}{0,629 \cdot 10^{-3}}\right)^2}$$

$$\sigma_{Cgli} = 1,565395884 \cdot 10^{-4} g$$

2ª concentração (5,4 mg/L)

$$\sigma_{Cgli} = 5,4 \cdot 10^{-3} * \sqrt{\left(\frac{8,004939093 \cdot 10^{-6}}{4 \cdot 10^{-3}}\right)^2 + \left(\frac{0,144 \cdot 10^{-6}}{5 \cdot 10^{-6}}\right)^2 + \left(\frac{5,8 \cdot 10^{-6}}{0,629 \cdot 10^{-3}}\right)^2}$$

$$\sigma_{Cgli} = 1,63653993 \cdot 10^{-4} g$$

3ª concentração (9,1 mg/L)

$$\sigma_{Cgli} = 9,1 \cdot 10^{-3} * \sqrt{\left(\frac{8,004939093 \cdot 10^{-6}}{4 \cdot 10^{-3}}\right)^2 + \left(\frac{0,144 \cdot 10^{-6}}{8,5 \cdot 10^{-6}}\right)^2 + \left(\frac{5,8 \cdot 10^{-6}}{0,629 \cdot 10^{-3}}\right)^2}$$

$$\sigma_{Cgli} = 1,764637541 \cdot 10^{-4} g$$

4ª concentração (11,8 mg/L)

$$\sigma_{Cgli} = 11.10^{-3} * \sqrt{\left(\frac{8,004939093.10^{-6}}{4.10^{-3}}\right)^2 + \left(\frac{0,144.10^{-6}}{11.10^{-6}}\right)^2 + \left(\frac{5,8.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}\right)^2}$$

$$\sigma_{Cgli} = 1,904168375.10^{-4}g$$

5ª concentração (20,9 mg/L)

$$\sigma_{Cgli} = 20,9.10^{-3} * \sqrt{\left(\frac{8,004939093.10^{-6}}{4.10^{-3}}\right)^2 + \left(\frac{0,144.10^{-6}}{19,5.10^{-6}}\right)^2 + \left(\frac{5,8.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}\right)^2}$$

$$\sigma_{Cgli} = 2,50420083.10^{-4}g$$

6ª concentração (30,1 mg/L)

$$\sigma_{Cgli} = 30,1.10^{-3} * \sqrt{\left(\frac{8,004939093.10^{-6}}{4.10^{-3}}\right)^2 + \left(\frac{0,144.10^{-6}}{28.10^{-6}}\right)^2 + \left(\frac{5,8.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}\right)^2}$$

$$\sigma_{Cgli} = 3,234601759.10^{-4}g$$

7ª concentração (44,6 mg/L)

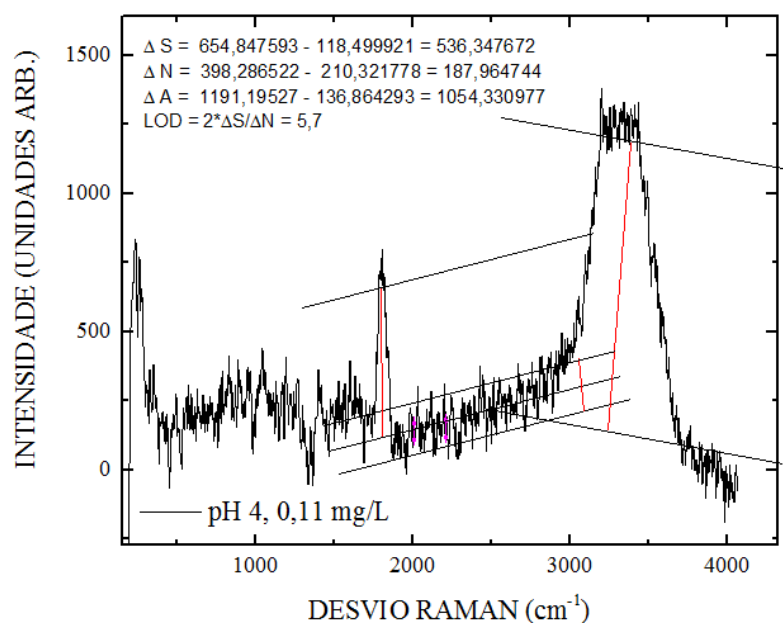
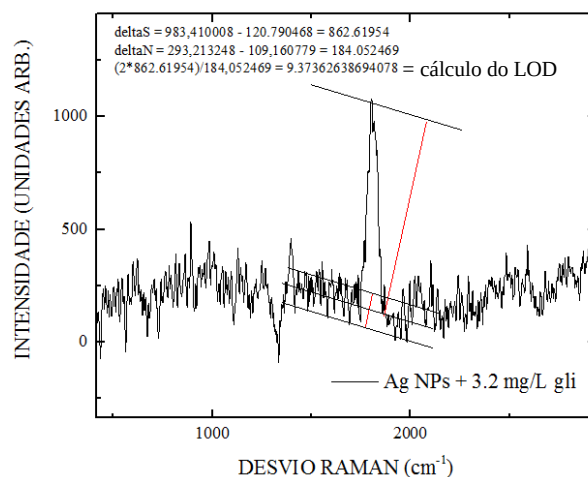
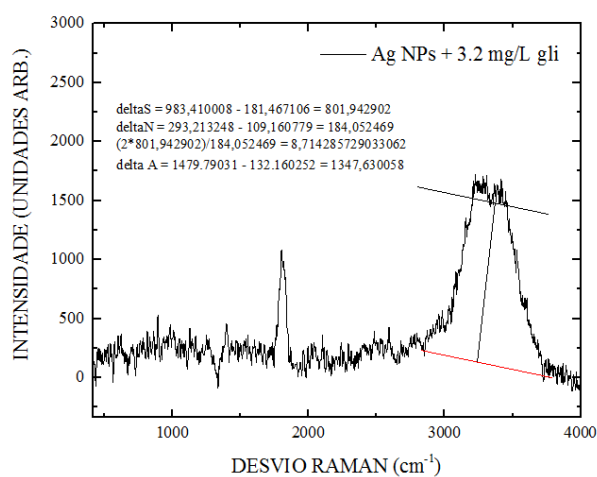
$$\sigma_{Cgli} = 44,6.10^{-3} * \sqrt{\left(\frac{8,004939093.10^{-6}}{4.10^{-3}}\right)^2 + \left(\frac{0,144.10^{-6}}{41,5.10^{-6}}\right)^2 + \left(\frac{5,8.10^{-6}}{0,629.10^{-3}}\right)^2}$$

$$\sigma_{Cgli} = 4,483832594.10^{-4}g$$

APÊNDICE B – CÁLCULOS DE LOD E INCERTEZAS NA RAZÃO DAS INTENSIDADES RAMAN

AMOSTRAS SEM PISC

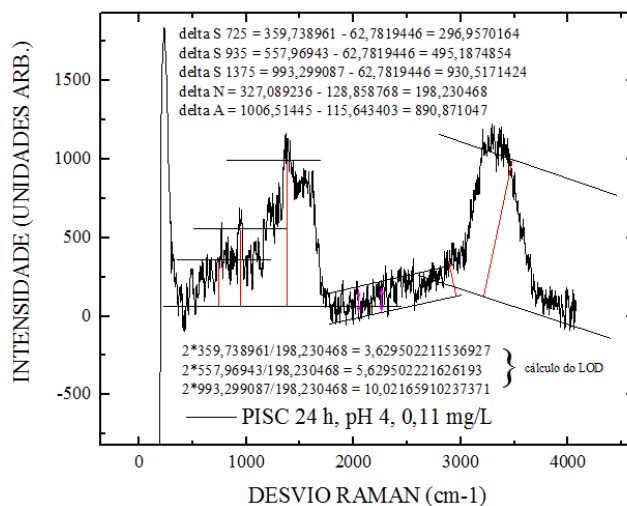
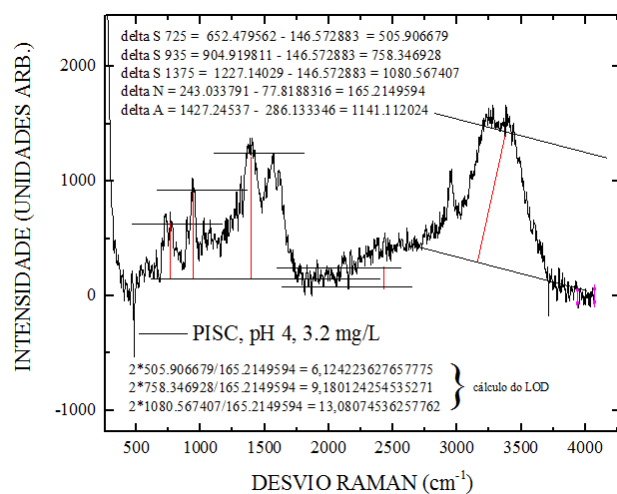
F1(X)	B(Y)	G1(Y)	A(Y)	D(Y)	C(Y)	E(yEr±)
Concentração de glifosato	Desvio padrão do ruído	INCERTEZA DA INTENSIDADE	Delta S	Delta A	Delta S / Delta A	INCERTEZA DA RAZÃO
mg/L						
		SIGMA u e v	u	v	w	
		$(\sqrt{2}) \cdot \text{col}(b)$			$\text{COL}(A)/\text{COL}(D)$	$\text{col}(C) \cdot \sqrt{(\text{col}(G1)/\text{col}(A))^2 + (\text{col}(G1)/\text{col}(D))^2}$
3.2	53.97837	76.33694	862.61954	1347.63006	0.6401	0.06726
5.4	51.83886	73.31122	1858.71559	1872.45671	0.99266	0.05517
9.1	50.50252	71.42135	1984.67723	1257.39626	1.5784	0.10613
11.8	47.57253	67.27772	2148.19513	1118.2517	1.92103	0.1303
20.9	49.92546	70.60527	1810.35452	925.22865	1.95666	0.16769
30.1	51.02878	72.16559	2099.78481	968.77283	2.16747	0.17781
44.6	44.04529	62.28945	2364.31805	1023.4154	2.31022	0.15322



AMOSTRAS COM PISC

A(X)	B(Y)	C(Y)	J1(Y)	I1(Y)	H1(Y)	E(Y)	F1(Y)	G1(Y)	K1(Y)
Concentração de glifosato	Desvio padrão ruído	INCERTEZA DA INTENSIDADE	Delta S 725	Delta S 935	Delta S 1375	Delta A	Delta S/A	Delta S/A	Delta S/A
mg/L									
		sigma u e v				v	725	935	1375
		(sqrt(2))*col(b)							
3.2	43.02801	60.85079	505.90668	758.34693	1080.56741	1141.11202	0.44335	0.66457	0.94694
5.9	54.10302	76.51322	495.4364	843.06958	1304.21563	1084.28444	0.45692	0.77754	1.20284
9.1	40.07502	56.67463	446.4417	798.79857	1370.68669	962.98581	0.4636	0.8295	1.42337
11.8	50.25889	71.07681	414.49638	692.62166	1248.87222	815.53509	0.50825	0.84928	1.53135
20.9	31.37854	44.37596	366.16285	587.98088	1135.1864	678.50222	0.53966	0.86659	1.67308
30.6	36.83942	52.0988	473.51558	785.97145	1517.18259	875.35959	0.54094	0.89788	1.73321
44.6	49.2374	69.63219	570.43847	1082.47026	2008.21597	999.72748	0.57059	1.08277	2.00876

D1(Y)	H(Y)	I(Y)
INCERTEZA DA RAZÃO	INCERTEZA DA RAZÃO	INCERTEZA DA RAZÃO
725	935	1375
col(F1)*sqrt((col(C)/col(J1))^2+(col(C)/col(E))^2)	col(G1)*sqrt((col(C)/col(I1))^2+(col(C)/col(E))^2)	col(K1)*sqrt((col(C)/col(H1))^2+(col(C)/col(E))^2)
0.05833	0.06403	0.07344
0.07758	0.08939	0.11038
0.06487	0.07647	0.10238
0.09776	0.11434	0.1594
0.07432	0.08654	0.12748
0.06767	0.07999	0.11909
0.08019	0.10266	0.15629



APÊNDICE C – CÁLCULOS DE INCERTEZA TOTAL DA ANÁLISE RAMAN

AMOSTRAS SEM PISC

I(yEr±)	L1(yEr±)	J(xEr±)	K1(Y)
INCERTEZA TOTAL DA INTENSIDADE	INCERTEZA DA RAZÃO DAS INTENSIDADES	SIGMA CONCENTRAÇÕES	SENSIBILIDADE
SQRT((COL(L1))^2+(COL(K1)*COL(J))^2)			
0.0631	0.05517	0.1637	0.18706
0.10792	0.10613	0.1765	0.1108
0.13088	0.1303	0.1904	0.06496
0.16772	0.16769	0.2504	0.01364
0.17782	0.17781	0.3235	0.00432
0.15322	0.15322	0.4484	0.00119

AMOSTRAS COM PISC

A(X1)	B(Y1)	C(Y1)	D(Y1)	E(yEr±)	I1(yEr±)	J1(yEr±)	F(Y1)	K1(Y1)	L1(Y1)	G(Y1)
CONCENTRAÇÃO DE GLIFOSATO	RELAÇÃO DE INTENSIDADE			INCERTEZA DA RAZÃO DAS INTENSIDADES			SIGMA CONCE NTRAÇÕES	SENSIBILIDADE 725	SENSIBILIDADE 935	SENSIBILIDADE 1375
mg/L	UNIDADES ARB									
	BANDA EM 725 cm-1	BANDA EM 935 cm-1	BANDA EM 1375 cm-1	BANDA EM 725 cm-1	BANDA EM 935 cm-1	BANDA EM 1375 cm-1				
3.2	0.44335	0.66457	0.94694	0.05833	0.06403	0.07344	0.1565	0.00325	0.01907	0.13936
5.4	0.45692	0.77754	1.20284	0.07758	0.08939	0.11038	0.1637	0.00558	0.0148	0.07725
9.1	0.4636	0.8295	1.42337	0.06487	0.07647	0.10238	0.1765	0.00708	0.0114	0.04242
11.8	0.50825	0.84928	1.53135	0.09776	0.11434	0.1594	0.1904	0.00643	0.00997	0.0313
20.9	0.53966	0.86659	1.67308	0.07432	0.08654	0.12748	0.2504	0.00278	0.0074	0.01615
30.1	0.54094	0.89788	1.73321	0.06749	0.07999	0.11909	0.3235	0.00112	0.00608	0.01055
44.6	0.57059	1.08277	2.00876	0.08019	0.10266	0.15629	0.4484	3.48409E-4	0.00488	0.00666

H(yEr±)	I(yEr±)	J(yEr±)
INCERTEZA TOTAL DA INTENSIDADE	INCERTEZA TOTAL DA INTENSIDADE	INCERTEZA TOTAL DA INTENSIDADE
SQRT((COL(E))^2+(COL(K1)*COL(F))^2)		
0.05833	0.0641	0.07661
0.07759	0.08942	0.1111
0.06488	0.07649	0.10265
0.09777	0.11436	0.15951
0.07432	0.08656	0.12754
0.06749	0.08001	0.11914
0.08019	0.10268	0.15632

APÊNDICE D – PUBLICAÇÃO RESULTANTE DESTE TRABALHO

TRABALHO EM ANAIS DE EVENTO

COSTA, L. C. S; MARTINS, V. H; FABRIS, J. L.; MULLER, M. “**On the role of silver nanoparticles shape for *SERS* of Rhodamine**”. 2018 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC). IEEE Xplore. Campinas - SP, Brasil, 2018. DOI: 10.1109/SBFoton-IOPC.2018.8610887.