

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – POSMAT



Rafael Jesus Gonçalves Rubira

**DETECÇÃO DOS HERBICIDAS ATRAZINA E PROMETRINA VIA
ESPALHAMENTO RAMAN AMPLIFICADO EM SUPERFÍCIE (SERS)**

Presidente Prudente

2016

Rafael Jesus Gonçalves Rubira

**DETECÇÃO DOS HERBICIDAS ATRAZINA E PROMETRINA VIA
ESPALHAMENTO RAMAN AMPLIFICADO EM SUPERFÍCIE (SERS)**

**Dissertação apresentada como
requisito à obtenção do título de
Mestre em Ciência e Tecnologia de
Materiais ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Materiais (POSMAT) da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” sob a
orientação do Prof. Dr. Carlos José
Leopoldo Constantino.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino

Presidente Prudente

2016

Rubira, Rafael Jesus Gonçalves.

Detecção dos herbicidas atrazina e prometrina via
espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS) /
Rafael Jesus Gonçalves Rubira, 2016.

92f.

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia.
Presidente Prudente, 2016.

1. Espalhamento Raman. 2. SERS. 3. Detecção de
herbicidas.

2. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Ciências e Tecnologia. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE RAFAEL JESUS GONÇALVES RUBIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

Aos 22 dias do mês de julho do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro Unesp/Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSE LEOPOLDO CONSTANTINO - Orientador(a) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente, Prof. Dr. SÉRGIO ANTONIO MARQUES DE LIMA do(a) Departamento de Química e Bioquímica / UNESP / Câmpus de Presidente Prudente, Prof. Dr. HENRIQUE DE SANTANA do(a) Departamento de Química / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de RAFAEL JESUS GONÇALVES RUBIRA, intitulada **Detecção dos herbicidas atrazina e prometrina via espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS)**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVA DO _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão

Prof. Dr. CARLOS JOSE LEOPOLDO CONSTANTINO

Prof. Dr. SÉRGIO ANTONIO MARQUES DE LIMA

Prof. Dr. HENRIQUE DE SANTANA

Dedico este trabalho a Deus pelo discernimento no momento que mais precisei. A você Mãe, Pai e Irmão. Tenho a certeza que se hoje cheguei até aqui foi por existir vocês em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o apoio desde o início da graduação, Obrigado meu irmão Tatá (Henrique) meus pais Maria e Sergio por acreditarem sempre em mim. A você mãe pelos cafés que deixava pronto para quando chegasse da escola conseguir estudar, devo muito este trabalho a sua persistência na minha pessoa, obrigado.

Ao meu orientador, amigo e educador Casé, com quem pude aprender a real beleza e transformação que a educação nos traz. Obrigado por ter pegado em minhas mãos e transformado a minha vida. Obrigado de coração por mudar a minha realidade, o seu ensinamento esta muito além deste trabalho.

La persona increíble que he conocido durante seis meses en España....Santiago muchas gracias por todos los aprendizajes y las clases divertidas, nunca voy olvidar sus enseñanzas, tanto en cuestión profesional como personal, gracias.

Aos amigos do Grupo Noix, começando por aqueles que me receberam no grupo, Diogão, Pedrera, Priscila, Gabriel, Léo e Jony...A formação atual do grupo com quem pude trocar experiências, Bina, Diegão, Mateuzão, Mateuzinho, Cibely, Luis e Gilia.

Aos meus companheiros de República: Rodolfo, Hideki, Robertinho, Tufo, 15zão, Sidão, Phelps e Tio Chico. Vocês foram às pessoas que muitas vezes me estenderam a mão e me motivaram a continuar, obrigado por todos esses anos de convívio.

À você meu amigo e irmão de coração, Tiago...por sempre me escutar e me apoiar nas minhas escolhas. Aos nossos momentos de conversa bebendo aquela gelada e pela nossa amizade de mais de 20 anos.

À você Aline, minha companheira, amiga, namorada o meu braço direito...a pessoa que sempre me anima e me motiva a erguer a cabeça e seguir em frente...Obrigado por trazer tanta alegria em minha vida.

A FAPESP pelo suporte financeiro

*“Aquele que ama exige até a última gota para que aquele que é amado
chegue ao melhor de si mesmo.”*

Pe. Fábio de Melo

RESUMO

Os herbicidas atrazina e prometrina pertencem à classe das s-triazinas, possuindo propriedades causadoras de malefícios em seres humanos, sendo classificados como agentes tóxicos. Esta dissertação para a defesa de Mestrado insere-se no projeto de mestrado cujo objetivo principal é investigar a detecção dos herbicidas atrazina e prometrina utilizando a técnica de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS, do inglês *surface-enhanced Raman scattering*), que possui alta sensibilidade e seletividade na detecção de analitos, sendo a aplicação sensorial o objetivo mais amplo deste projeto. Os herbicidas são dissolvidos em diferentes concentrações em colóides de prata (AgNPs: nanopartículas de prata) sintetizados a partir de nitrato de prata, tendo cloridrato de hidroxilamina como agente redutor. A atrazina foi detectada em concentrações da ordem de 10^{-12} mol/L em água ultrapura com boa resolução sinal ruído, e 10^{-11} mol/L em água deionizada. A prometrina também apresentou detecção em água ultrapura com concentrações da ordem de 10^{-12} mol/L e para sistemas com água deionizada e de torneira, a concentração foi da ordem de 10^{-9} mol/L. Tais valores estão abaixo dos limites de potabilidade de água permitidos pelas agências reguladoras ($1,39 \times 10^{-8}$ mol/L) para atrazina e $9,62 \times 10^{-8}$ mol/L para a prometrina), limites estes que representam um desafio analítico por si só. Complementarmente, os espectros SERS foram classificados por técnicas computacionais de visualização da informação, possibilitando uma melhor análise dos dados. Em termos dos mecanismos de adsorção para as soluções em água ultrapura, a atrazina adsorve sobre as AgNPs via átomo de N entre o radical etil e o átomo de Cl e a prometrina têm o seu anel triazínico posicionado paralelo à superfície das AgNPs adsorvendo via átomos C-S. Tais mecanismos não puderam ser determinados para águas deionizada e de torneira. Complementarmente foram realizadas medidas de espectroscopia de impedância na detecção de ambos os herbicidas em filmes *layer-by-layer* (LbL) de PAH/AgNPs.

ABSTRACT

The atrazine and prometryne herbicides belong to the class of s-triazines, having properties that cause harm in humans and are classified as toxic agents. This thesis for the Master Qualification Examination General is part of the master project whose main objective is to investigate the detection of atrazine and Prometryn herbicides using surface-enhanced Raman scattering (SERS) that has high sensitivity and selectivity in analyte detection, being sensory application the broader objective of this project. The herbicides are dissolved in various concentrations of silver colloids (AgNPs: silver nanoparticles). The atrazine was detected in concentration of order 10^{-12} mol/L in ultrapure water with good resolution signal noise and 10^{-11} mol/L in deionized water. The prometryn also presented detection in ultrapure water with concentrations of order 10^{-12} mol/L and for systems with deionized water and tap on the order of 10^{-9} mol/L. These values are below the limits of potable water allowed by regulatory agencies (1.39×10^{-8} mol/L atrazine and 9.62×10^{-8} mol/L for prometryn), these limits that represent an analytical challenge by itself. In addition, the SERS spectra were classified by computer techniques of information visualization, enabling better data analysis. In terms of adsorption mechanisms for solutions ultrapure water, atrazine adsorbs on AgNPs via C atom of the radical ethyl and Cl and prometryn have their triazínico ring positioned parallel to the surface of AgNPs adsorbing via C-S atoms. Such mechanisms could not be determined for deionized and tap water. In addition were carried impedance spectroscopy measurements at the detection of both herbicides in LbL PAH/AgNPs films.

SUMÁRIO

Capítulo I-Introdução.....	1
1.1. Motivação.....	1
1.2. Objetivos gerais.....	2
1.3. Objetivos específicos.....	3
1.4. SERS.....	3
1.5. Atrazina e prometrina.....	4
1.6. Revisão bibliográfica.....	5
 Capítulo II-Procedimentos experimentais.....	 8
2.1. Materiais.....	9
2.2. Síntese de colóide de Ag por redução de hidroxilamina.....	10
2.3. Medidas de potencial zeta.....	11
2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	11
2.5. Espalhamento Raman e absorção no UV-Vis.....	12
2.6. Medidas de SERS.....	13
2.7. Análise de dados.....	14
2.8. Espectroscopia de impedância e crescimento do filme LbL de PAH/AgNPs.....	15
 Capítulo III-Characterização do colóide de Ag.....	 17
3.1. Potencial zeta.....	18
3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	19
3.3. Medidas de absorção no UV-Vis.....	20
3.4. Medidas SERS.....	22
 Capítulo IV-Detecção do herbicida prometrina via espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS).....	 25
4.1. Prometrina em água ultrapura.....	26
4.1.1. Detecção de prometrina em água ultrapura.....	26
4.1.2. Adsorção da prometrina em colóide de Ag.....	30
4.2. Prometrina em água deionizada e de torneira.....	33
 Capítulo V-Detecção do herbicida atrazina via espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS).....	 41
5.1. Atrazina em água ultrapura.....	42
5.1.1. Detecção de atrazina em água ultrapura.....	42
5.1.2. Adsorção da atrazina em colóide de Ag.....	45
5.2. Atrazina em água deionizada.....	48
 Capítulo VI-Detecção dos herbicidas atrazina e prometrina via espectroscopia de impedância.....	 51
6.1. Crescimento do filme LbL de PAH/AgNPs via absorção no UV-Vis.....	52

6.2. Aplicação do filme LbL como unidade sensorial na detecção dos herbicidas atrazina e prometrina.....	53
Capítulo VII-<i>Conclusões</i>.....	57
Capítulo VIII-<i>Considerações finais</i>.....	61
Referências.....	67

Lista de figuras

- Figura 1:** representação da família dos triazínicos com seus grupos substituintes (R1, R2 e R3) para os herbicidas atrazina e prometrina.....4
- Figura 2:** estrutura molecular dos herbicidas atrazina e prometrina e do agente redutor cloridrato de hidroxilamina.....9
- Figura 3:** ilustração da dupla camada elétrica e do potencial zeta do coloide de Ag reduzido com cloridrato de hidroxilamina.....11
- Figura 4:** esquema para a obtenção de espectros SERS dos herbicidas atrazina e prometrina diluídos em colóide de Ag.....13
- Figura 5:** representação esquemática para a) filmes LbL de PAH/AgNPs imersos em soluções de atrazina ou prometrina. b) Representação dos filmes LbL de PAH/AgNPs nos eletrodos de Pt para realização das medidas de impedância.....16
- Figura 6:** imagens de MEV usando ampliações de 5.000X, 15.000X e 25.000X do cast do colóide de Ag.....19
- Figura 7:** espectros de absorção no UV-Vis para o colóide de Ag sintetizado com hidroxilamina hidroclorada contendo a) atrazina e b) prometrina diluídas no colóide de Ag em concentrações de 10^{-6} e 10^{-7} mol/L. A banda de *plasmon* é observada na região de 417 nm e um pequeno ombro é observado referente aos quadrupolos na região de 370 nm.....20-21
- Figura 8:** espectros Raman do colóide de Ag utilizado para realização do SERS da prometrina.....23
- Figura 9:** espectros Raman do colóide de Ag utilizado para a realização do SERS da atrazina.....23
- Figura 10:** espectros SERS das soluções de prometrina diluídas no colóide de Ag em concentrações de $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol/L.....26
- Figura 11:** espectros SERS das soluções de prometrina diluídas no colóide de Ag em concentrações $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-9}$; $5,0 \times 10^{-10}$; $5,0 \times 10^{-11}$ e $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. O espectro do colóide de Ag é dado como referência, na parte inferior, a fim de distinguir as bandas de vibração da prometrina, cuja estrutura molecular com os átomos enumerados é dada na inserção.....27
- Figura 12:** projeção multidimensional IDMAP agrupando por semelhança os espectros SERS para diferentes concentrações de prometrina em soluções de água ultrapura.....29
- Figura 13:** espectro SERS da solução de prometrina diluída no coloide de Ag em $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L em comparação ao espectro Raman da prometrina em pó. Em vermelho estão os números de onda relacionados ao espectro do herbicida em pó....32

Figura 14: ilustração da adsorção da prometrina nas AgNPs via átomos de C-S (cinza e amarelo), com o anel paralelo as AgNPs.....33

Figura 15: espectros SERS coletados para (a) soluções de prometrina em água deionizada diluída em colóide de Ag nas concentrações $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-9}$; $5,0 \times 10^{-10}$; $5,0 \times 10^{-11}$ e $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. (b) Soluções de prometrina em água de torneira diluída em colóide de Ag nas concentrações $5,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$ e $5,0 \times 10^{-9}$ mol/L. Os espectros do colóide de Ag com adição de água deionizada e de água de torneira são dados como referência na parte inferior de cada figura.....34

Figura 16: espectros Raman coletados a partir do próprio colóide de Ag contendo alíquotas de água (a) deionizada ou (b) de torneira.....35

Figura 17: projeção multidimensional IDMAP agrupando por semelhança os espectros SERS para as diferentes concentrações de prometrina em soluções de água deionizada.....36

Figura 18: projeção multidimensional IDMAP agrupando por semelhança os espectros SERS para diferentes concentrações de prometrina em soluções de água de torneira.....37

Figura 19: projeção multidimensional IDMAP agrupando os espectros das diferentes referências para os colóides de Ag e para prometrina a 10^{-9} mol/L em água ultrapura, deionizada e água de torneira.....37

Figura 20: espectros SERS de prometrina dissolvida em água ultrapura ($5,0 \times 10^{-9}$ mol/L), água deionizada ($5,0 \times 10^{-9}$ mol/L) e água de torneira ($5,0 \times 10^{-9}$ mol/L) em comparação com o espectro Raman do pó da prometrina. O espectro de referência do colóide de Ag contendo água de torneira é dado na parte inferior da figura.....39

Figura 21: espectros SERS de soluções diluídas de atrazina em colóide de Ag nas concentrações $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-9}$; $5,0 \times 10^{-10}$; $5,0 \times 10^{-11}$ e $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. O espectro do colóide de Ag é dado como referência, na parte inferior, a fim de distinguir as bandas de vibração da atrazina.....42

Figura 22: mapeamento Sammon dos espectros da solução de atrazina para distintas concentrações diluídas no colóide de Ag (colóide de Ag/atrazina). A figura não apresenta eixos porque neste mapeamento o que interessa é a distância relativa entre os pontos dos dados. Amostras mais semelhante estão mais próximas (e distintas estão distantes).....44

Figura 23: espectros SERS da solução de atrazina diluída no colóide de Ag, sendo a concentração final do herbicida em $5,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Filme cast da mesma solução de atrazina diluída no colóide de Ag. O espectro Raman de atrazina em pó é obtido como referência.46

Figura 24: ilustração do mecanismo proposto para a adsorção do herbicida atrazina nas AgNPs via átomos de N (azul), entre o radical etil e o átomo de Cl (verde).....47

Figura 25: espectros SERS obtidos para solução de atrazina em água deionizada diluída em colóide de Ag nas concentrações de $5,0 \times 10^{-7}$; 5×10^{-9} e 5×10^{-11} mol/L. O espectro do colóide de Ag com uma adição de alíquota de água deionizada é mostrado na parte inferior.....48

Figura 26: mapeamento Sammon dos espectros SERS das soluções de atrazina em água deionizada para distintas concentrações ($5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-9}$ e $5,0 \times 10^{-11}$ mol/L) diluídas no colóide de Ag.....49

Figura 27: espectros de extinção no UV-Vis do filme LbL de PAH/AgNPs contendo 5 bicamadas. O *inset* mostra a dependência linear da extinção em 405 nm em função do número de bicamadas depositadas. b) Espectros de extinção com *zoom* na região de 600 a 1000 nm e um *inset* da área em função do número de bicamadas.....52

Figura 28: espectroscopia de impedância (capacitância em função da frequência) em eletrodo interdigitado de Pt (*bare*) imersos em diferentes concentrações de a) atrazina e b) prometrina. Filme LbL de PAH/AgNPs imersos em soluções de c) atrazina e d) prometrina.....54

Figura 29: projeção IDMAP para as medidas de impedância obtidas em diferentes concentrações de soluções de a) atrazina e b) prometrina ($1,1 \times 10^{-10}$, $1,1 \times 10^{-9}$, $1,7 \times 10^{-8}$, $5,6 \times 10^{-8}$ e $1,1 \times 10^{-7}$ mol/L), a partir das diferentes unidades sensoriais identificadas pelas cores destacadas.....55

Lista de tabelas

Tabela I. Dados dos herbicidas atrazina e prometrina.....	9
Tabela II. Valores de potencial zeta e na parte inferior é indicado o valor médio do potencial zeta. O desvio padrão (σ) e o erro da medida (Er)	18
Tabela III. Atribuições vibracionais de bandas características do pó da prometrina e do espectro SERS da solução de prometrina diluída no colóide de Ag em concentração de $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. Em vermelho estão alguns números de onda relacionados às bandas que desaparecem no espectro SERS da prometrina.....	28
Tabela IV. Atribuições vibracionais de bandas características da atrazina.....	43

Lista de siglas

Ag	Prata
AgHi	Colóide de prata sintetizado com o agente redutor hidroxilamina
AgNP	Nanopartícula de prata
IDMAP	Mapa de documento interativo
LSPR	Ressonâncias localizadas de plasma de superfície
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NP	Nanopartícula
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCA	Análise de componentes principais
SE	Detector de elétrons secundários
SERS	Espalhamento Raman amplificado em superfície
TPM	Técnica de projeção multidimensional
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UV-Vis	Absorção no ultravioleta-visível
Z	Potencial zeta
LbL	Filmes <i>layer-by-layer</i>
PAH	Poli(hidrocloreto de alilamina)
Pt	Platina

Capítulo I

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1.1. Motivação

De acordo com o decreto N° 4.074 de 4 de janeiro de 2002 o Brasil define agrotóxico como sendo produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas. O Uso destes se dá em pastagens na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos¹.

A crescente demanda por alimentos e a concorrência dos mercados internacionais forçam o agronegócio a recorrer cada vez mais aos agrotóxicos, como é o caso do Brasil, onde as vendas de agrotóxicos têm aumentado drasticamente, posicionando o país como o maior consumidor do mundo¹. Porém, a falta de critérios para o controle do uso de agrotóxicos representa um problema ambiental grave devido à contaminação de plantas, solo e águas subterrâneas. Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com o tipo de peste contra a qual agem. Desta forma, há inseticidas, herbicidas, fungicidas, rodeneticidas, entre outros². Neste trabalho foram estudados os herbicidas que atuam principalmente em ervas daninhas, sendo que estes apresentam fácil dispersão na atmosfera e oceanos o que podem levar à contaminação em escala global³. O aumento da produção de agrotóxicos foi significativo por volta da segunda guerra mundial (1939), e destaca-se neste período a descoberta dos pesticidas organoclorados, os quais possuem alto poder herbicidas^{4,5}. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), milhões de pessoas são envenenadas por essas substâncias (herbicidas) a cada ano, levando a aproximadamente 220.000 mortes⁶. O

Brasil é o maior consumidor de herbicidas do mundo segundo o Instituto Nacional de Câncer⁷, ultrapassando um consumo de 1 milhão de toneladas por ano, o que é equivalente a um consumo médio de 5,2 Kg de agrotóxico por pessoa⁷. No Brasil a maior causa de óbitos por intoxicação humana é por meio de herbicidas, correspondendo a 38,05% dos casos, seguida dos remédios 15,63% e drogas de abuso 15,04%⁸.

Os vários tipos de herbicidas, como os derivados de triazina são predominantes usados no controle pré e pós-emergente de sementes de plantas daninhas em uma variedade de culturas, incluindo milho, cana-de-açúcar, sorgo, abacaxi, banana, café e uva⁹. Alguns destes herbicidas não são biodegradáveis e têm solubilidade limitada em água, podendo levar à contaminação do meio ambiente, especialmente para as águas subterrâneas e água potável. Entre os derivados de triazina, a atrazina e prometrina são amplamente utilizadas¹⁰, a qual atua como inibidor da fotossíntese¹¹⁻¹³ e a atrazina pode atuar como disruptor endócrino ou causar efeitos carcinogênicos, dependendo da concentração¹⁴⁻¹⁶. Por esses pesticidas apresentarem baixas solubilidades, é necessário desenvolver métodos analíticos mais sensíveis e seletivos para monitorar quantidades residuais dos herbicidas atrazina e prometrina em água.

1.2. Objetivos Gerais:

Esta dissertação de mestrado tem como objetivo principal detectar através da técnica SERS os herbicidas atrazina e prometrina diluídos em coloide de AgNPs em concentrações da ordem de ppm e ppb (limite de potabilidade da água). Complementarmente será utilizada a técnica de espectroscopia de impedância na detecção de ambos os herbicidas, tendo como elemento transdutor de sinal filmes LbL de PAH/AgNPs depositados em eletrodos interdigitados. Portanto, o trabalho visa contribuir para o desenvolvimento da área de sensores. Neste sentido, os seguintes objetivos específicos são listados abaixo:

1.3. Objetivos Específicos:

- 1) Determinar as características do colóide de Ag através dos resultados obtidos pelas técnicas de MEV, potencial zeta e absorção no UV-Vis.
- 2) Detectar a atrazina e a prometrina dissolvidas em colóide de Ag em diferentes concentrações e para distintos sistemas (água ultrapura, deionizada e de torneira), via medidas de SERS.
- 3) Propor possíveis mecanismos moleculares envolvidos na interação herbicidas/AgNPs, a partir dos resultados dos espectros SERS.
- 4) Detectar atrazina e prometrina dissolvidas em água ultrapura em diferentes concentrações, via medida de espectroscopia de impedância.
- 5) Analisar os dados de SERS e espectroscopia de impedância usando técnicas computacionais de visualização da informação

1.4. SERS

O fenômeno, SERS, foi observado por Fleischmann *et al.* trabalhando com eletrodos de Ag em 1973 e 1974¹⁷. Porém, implicações mais significativas destas observações não foram reconhecidas até 1977. Dois grupos, Jeanmaire e Van Duyne¹⁸ e Albrecht e Creighton¹⁹, publicaram trabalhos independentes nos quais resultados experimentais indicavam um ganho no sinal Raman de 4 a 6 ordens de grandeza para piridina sobre eletrodos de Ag. Van Duyne fez uma revisão dos trabalhos deste período¹⁹ e a partir de então inúmeros estudos passaram a ser publicados relatando este fenômeno.

O efeito SERS é conseguido posicionando as moléculas alvo suficientemente próximo (150 Å) de nanopartículas metálicas. Os fatores de aumento dependem do tamanho, forma, e agregação das nanopartículas, bem como funções dielétricas do meio circundante e do metal (nanopartículas), e da frequência da radiação de excitação^{20,21}.

As nanopartículas de metais nobres (Au, Ag e Cu) são normalmente aplicadas com radiações excitantes (lasers) na região do visível^{20,21} quando estas nanopartículas podem sustentar ressonâncias de plasmon de superfície localizadas (LSPRs, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonances*) que são capazes de amplificar o campo elétrico em torno das nanopartículas. Este campo elétrico, denominado campo elétrico local, por sua vez, intensifica o dipolo induzido (p_1) da molécula alvo colocado próximo da nanopartícula metálica, ou seja, a molécula é polarizada de forma mais eficiente (pelo campo elétrico local) quando é colocada sobre a superfície do metal, gerando o dipolo induzido (p_1). O dipolo induzido (p_1), por sua vez, polariza o metal, induzindo outro dipolo, porém nas nanopartículas (p_2) que oscilam na mesma frequência do dipolo induzido (p_1)^{20,21}. Para moléculas colocadas nos interstícios das nanopartículas (*hot spots*), o fator de amplificação pode atingir até 10^{10} .²¹

1.5. Atrazina e prometrina

Os herbicidas da família dos triazínicos apresentam algumas características em comum, como um anel aromático hexamérico, simétrico e constituído de três átomos de carbono e três de nitrogênio em posições alternadas. A sua solubilidade e a sua terminação dentro dos nomes das triazinas é um indicativo através do substituinte posicionado em R1 como mostrado na Figura 1. Por exemplo, -azina indica átomo de Cl na posição R1; -atrina o grupo $-SCH_3$ e -tona indica o grupo $-OCH_3$ ²². Portanto, os grupos laterais apresentados como R2 e R3 na Figura 1 mostram diversos nomes comerciais, diferenciando o nome dos pesticidas dentro do próprio grupo pertencente. A Figura 1 evidencia o anel triazínico e as cadeias laterais alifáticas da atrazina e prometrina em uma tabela com a nomenclatura (fórmula) dos grupos substituintes R1, R2 e R3.

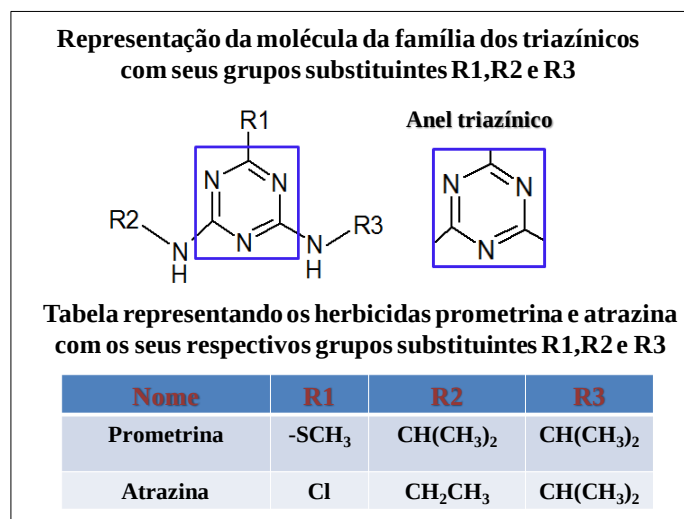


Figura 1: representação da família dos triazínicos com seus grupos substituintes (R1, R2 e R3) para os herbicidas atrazina e prometrina.

A atrazina é um pesticida organoclorado por apresentar um Cl ligado ao anel aromático²³⁻²⁵ contendo seus grupos laterais alifáticos diferentes: o grupo R2 (CH₂CH₃) é um etil e o grupo lateral R3 [CH(CH₃)₂] é um isopropil. A prometrina, diferentemente da atrazina, é um herbicida que apresenta o enxofre (S) com um radical metil (CH₃) ligado ao anel aromático¹⁸ e seus grupos funcionais laterais R2 e R3 (Figura 1) são iguais (isopropil).

1.6. Revisão bibliográfica

Na literatura há trabalhos distintos descrevendo alguns métodos analíticos para detectar atrazina e prometrina. Os métodos cromatográficos²⁶⁻²⁹ mostram grande seletividade e sensibilidade; no entanto, eles exigem sofisticada preparação de amostras. Os sensores eletroquímicos utilizando eletrodos de mercúrio, que por si só é um aspecto negativo ao meio ambiente,^{30,31} e eletrodos sólidos,^{32,33} são os mais explorados para a detecção de atrazina e prometrina. No entanto, além de utilizarem mercúrio, o seu limite de detecção é normalmente cerca de 10⁻⁶ a 10⁻⁹ mol/L, o que significa que, em muitos casos, tais sensores não garantem o controle de qualidade da água potável. As baixas concentrações permitidas na água potável de acordo com a regulamentação em

diferentes países variam de 3,0 mg/L ($1,39 \times 10^{-8}$ mol/L ou 3 ppb) nos EUA, determinada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA),³⁴ a 0,1 mg/L ($4,64 \times 10^{-10}$ mol/L ou 0,1 ppb) na União Europeia³⁵.

A atrazina e a prometrina possuem um sinal Raman relativamente forte, o que permite detectá-las utilizando espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS). Existem poucos trabalhos na literatura que relatam os espectros Raman ou SERS dos herbicidas atrazina e prometrina^{36–39}. No trabalho de Costa *et al.*³⁶ foram estudados espectros teóricos e experimentais para entender a interação entre o herbicida e o metal (Ag). Os trabalhos de Costa *et al.*³⁶ e Bonora *et al.*³⁸ mostraram que o grupo isopropílico da molécula de atrazina provoca um impedimento estérico, evitando sua aproximação das AgNPs nesta região da molécula. Bonora *et al.*³⁸ relatam também espectros teóricos e SERS dos herbicidas atrazina, prometrina e simetrina, porém, como relatado pelos autores, os espectros SERS experimentais não foram bons em relação as intensidades relativas e centro de bandas quanto aos espectros Raman dos compostos puros. No entanto, relatam que os espectros teóricos deram base para inferir a adsorção dos herbicidas na Ag.

O efeito SERS tem sido aplicado na detecção de pesticidas sob várias condições experimentais, envolvendo distintos substratos metálicos, como nanopartículas isoladas, colóides e filmes^{40–42}. Neste trabalho de mestrado foi estudada a detecção dos herbicidas atrazina e prometrina através de SERS usando colóides de Ag para concentrações entre 10^{-7} a 10^{-12} mol/L. O colóide de AgNPs foi obtido por redução via hidroxilamina. Esta síntese foi escolhida porque o branco (Raman do colóide de AgNPs) não apresentar bandas, diferente do colóide sintetizado com citrato⁴³. A análise dos espectros SERS também foi realizada por meio das técnicas de projeção multidimensionais, que nos auxiliou na separação das distintas concentrações detectadas dos herbicidas^{44–46}. O

detalhe da técnica de projeção multidimensional pode ser encontrado nos trabalhos de Paulovich *et al.*⁴⁶ e Oliveira *et al.*⁴⁴

O estudo de detecção de pesticidas tem que avançar de maneira que consigam detectar pesticidas como a atrazina e prometrina em amostras de rios e lagos. Também existe a necessidade de desenvolver metodologias que acople a vantajosa técnica SERS em sistemas coloidais com a detecção em amostras reais, como, frutas e verduras, por exemplo. Seguindo no avanço de detecção de pesticidas em sistemas SERS/coloide, existem trabalhos na literatura que realizam a detecção de pesticidas por nanopartículas de Au e Ag recobertas com finas camadas de sílicas (ordem de 2 nm a 20 nm)^{47,48}. Esta detecção com nanopartículas isoladas recobertas, do inglês *shell-isolated nanoparticles* (SHINs), são nanoestruturas metálicas recobertas com sílica e aplicadas na amplificação do sinal Raman e da Fluorescência. Os trabalhos na literatura com detecção de pesticidas por SHINs se refere preferencialmente em cascas finas de frutas (laranja, tomate, maçã, uva, manga, pêra e pêsego), sendo isto uma vantagem comparada ao sistema SERS/coloide⁴⁹.

Outra vertente que pode ser explorada na literatura é estudar a detecção dos herbicidas em substâncias húmicas, uma vez que essas substâncias estão no solo e absorvem variados tipos de metais e pesticidas^{50,51}. Existem poucos trabalhos na literatura referindo a este tema, existem vantagens em utilizar o sistema SERS/coloide em substâncias húmicas, pois essas substâncias estão diretamente presentes ao local, onde o pesticida é aplicado (solo). Porém, por se tratar de uma macromolécula complexa, tem que estudar bem a forma com que estas substâncias húmicas se interagem com os pesticidas e a origem dessas substâncias presentes no solo.

Capítulo II

Procedimentos experimentais

2.1. Materiais

Os reagentes adquiridos da Sigma-Aldrich (Fluka) foram: nitrato de prata (AgNO_3 , MM = 169,88 g/mol), cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, MM 69,49 g/mol/L) e hidróxido de sódio (NaOH , MM = 40,00 g/mol). Os herbicidas utilizados, prometrina e atrazina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os dados referentes aos herbicidas prometrina e atrazina são mostrados na Tabela I. Todos os reagentes químicos foram utilizados sem purificação adicional. As estruturas moleculares desses compostos estão na Figura 2.

Tabela I. Dados dos herbicidas atrazina e prometrina.

	Solubilidade em água	Massa Molecular	Fórmula Estrutural	Pureza	Marca
Prometrina	33 mg/L	241, 36 g/mol	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{S}$	98,8 %	Fluka
Atrazina	33 mg/L	215, 68 g/mol	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{ClN}_5$	98,8 %	Fluka

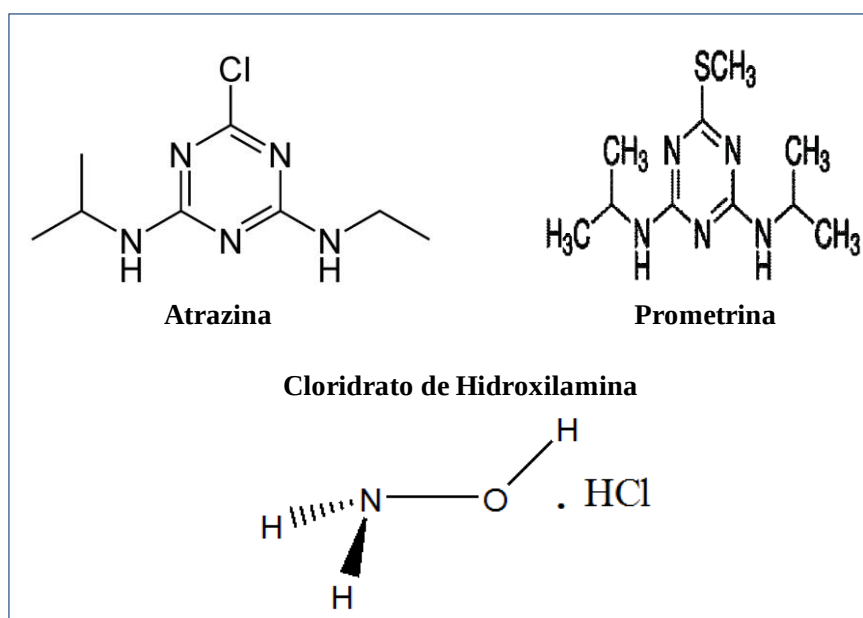
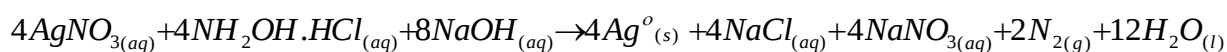


Figura 2: estrutura molecular dos herbicidas atrazina e prometrina e do agente redutor cloridrato de hidroxilamina.

A água ultrapura (18,2 MΩ.cm e pH ~ 7,0) obtida em um sistema Milli-Q, modelo *Simplicity*, foi utilizada para o preparo de solução estoque de atrazina e prometrina para posterior dissolução no colóide de Ag. A água deionizada (0,3 MΩ.cm e pH ~8) de um sistema de deionização SPLabor, modelo SP-050C, também foi utilizada para o preparo das soluções estoque dos herbicidas. O processo de neutralização de cargas durante o processo de deionização remove nitratos e elementos como, cálcio, magnésio, cádmio, bário, chumbo e algumas formas de rádio⁵². A água de torneira (pH ~9) também foi utilizada para o preparo das soluções dos herbicidas.

2.2. Síntese de colóide de Ag por redução de hidroxilamina

O colóide de Ag foi obtido por redução de hidroxilamina e sintetizado de acordo com a metodologia descrita por Leopold e Lendl⁵³. A síntese consiste na adição de 4,5 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio com concentração 0,1 mol/L, à temperatura ambiente, em 5 mL de solução do redutor cloridrato de hidroxilamina a concentração de 43,3 mmol/L. Esta solução foi adicionada a 90 mL de AgNO₃ em 1,2 mmol/L, sob agitação. A concentração final do colóide de Ag foi de 1,0 mmol/L. A utilização do agente redutor cloridrato de hidroxilamina permite obter partículas predominantemente esféricas, com algumas variações nos tamanhos,⁵³ o que é observado no trabalho de Lee *et al*⁵⁴., em que as partículas coloidais sintetizadas podem obter diferentes geometrias. A redução do nitrato de prata por cloridrato de hidroxilamina é apresentado na reação geral abaixo.



Como é comum nas vias das sínteses de colóide de Ag, existir uma redução dos íons metálicos (Ag⁺) para Ag (Ag⁰), resultando na formação de nanopartículas.

2.3. Medidas de potencial zeta

As medidas de potencial zeta foram realizadas usando o equipamento ZetaSizer3000 HS, operando com um laser de He-Ne com potência de 10 mW a partir da função de correlação de intensidade tempo normalizado. As medidas de potencial zeta foram realizadas no grupo do professor Dr. Eloi da Silva Feitosa da UNESP do Campus de São José do Rio Preto. O colóide de Ag foi adicionado em uma cubeta de quartzo. A Figura 3 ilustra um esquema do colóide de Ag e suas respectivas características, a camada de contra-íons junto à faixa negativa formada pelo Cl do agente redutor cloridrato de hidroxilamina. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido, que dá origem ao potencial zeta.

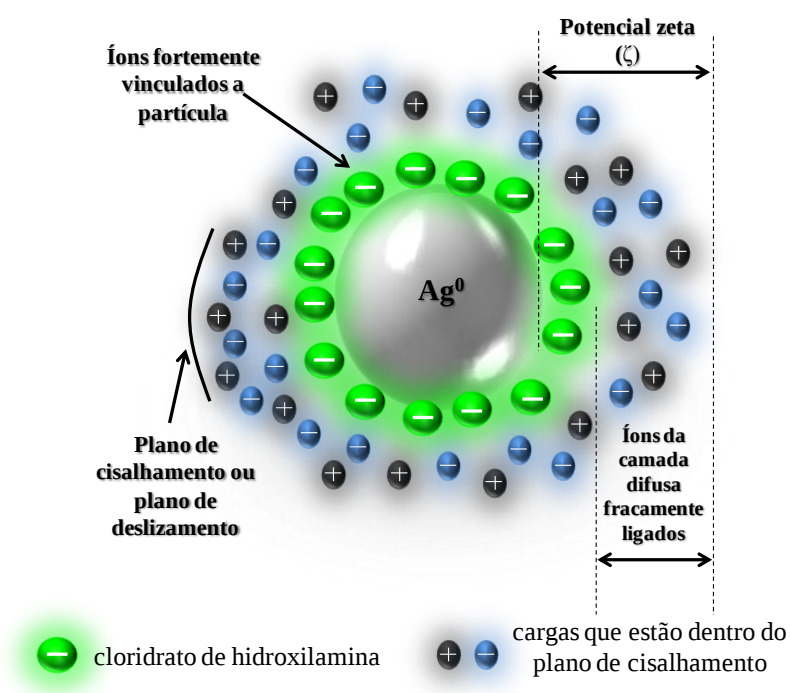


Figura 3: ilustração da dupla camada elétrica e do potencial zeta do colóide de Ag reduzido com cloridrato de hidroxilamina.

2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de MEV foram obtidas através de um equipamento Carls Zeiss, modelo EVO LS15. O experimento foi realizado utilizando o detector de elétrons secundários (SE) em alto vácuo a temperatura constante. O preparo das amostras foi realizado através da deposição de gotas de colóide de Ag sobre a fita condutora de dupla face de carbono no *stub* (porta amostra). Esperou-se a evaporação da água formando filmes *cast* do colóide de Ag. As imagens foram obtidas em diferentes ampliações, sendo de 5.000X, 15.000X e 25.000X. As imagens foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura (LabMMEV) da UNESP de Presidente Prudente e o equipamento foi operado pela técnica responsável Ms. Glenda Gonçalves de Souza.

2.5. Espalhamento Raman e absorção no UV-Vis

A análise micro-Raman foi realizada utilizando um espectrógrafo micro-Raman Renishaw, modelo in-Via, equipado com um microscópio óptico Leica com lente objetiva de 50X, possibilitando a coleta de espectros de áreas de aproximadamente $1\mu\text{m}^2$ (resolução espacial). Na obtenção dos espectros foi utilizado um laser com comprimento de onda 633 nm, cuja potência máxima incidida nas amostras é da ordem de μW , com grade de 1800 linhas.

Os espectros de absorção no UV-Vis foram coletados em um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50, na região de 190 a 1100 nm. As medidas de absorção no UV-Vis do colóide de Ag misturado com os respectivos herbicidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo (1 cm de caminho óptico), sendo as concentrações dos herbicidas da ordem de 10^{-6} e 10^{-7} mol/L a fim de evitar a saturação do detector.

2.6. Medidas de SERS

A Figura 4 ilustra o procedimento adotado para obter espectros SERS dos herbicidas prometrina e atrazina.

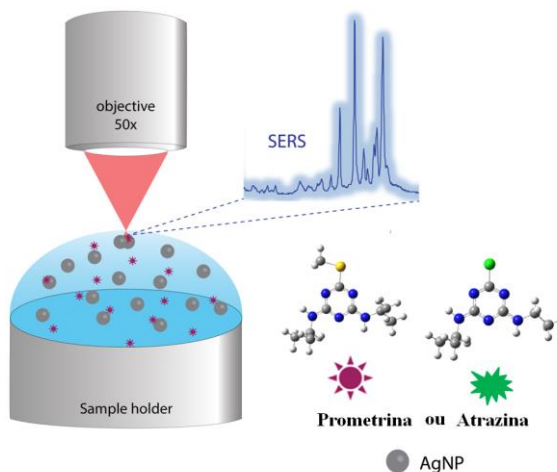


Figura 4: esquema para a obtenção de espectros SERS dos herbicidas prometrina e atrazina diluídos em colóide de Ag.

As medidas de SERS foram realizadas em soluções estoque dos herbicidas, sendo preparadas separadamente por dissolução de 5,40 mg de atrazina e 6,00 mg de prometrina em 250 mL de água ultrapura. As soluções foram deixadas sob sonicação por 10 minutos para a solubilização completa. O mesmo procedimento foi realizado para a prometrina utilizando água deionizada e de torneira. A atrazina também foi solubilizada em água deionizada e de torneira. A fim de adquirir medidas SERS, foi retirada uma alíquota entre 100 e 200 μL dessas soluções estoques dos herbicidas. Posteriormente este volume de 100 ou 200 μL da solução de atrazina ou prometrina foi adicionado ao colóide de Ag. O volume das soluções dos herbicidas foi adicionado no colóide de Ag de maneira que este volume foi desconsiderado, mantendo assim a concentração como sintetizado (1 mol/L) do colóide de Ag. As soluções de atrazina e prometrina diluídas no colóide de Ag foram colocadas em um suporte sob o microscópio óptico do micro-Raman e o foco do laser foram ajustados para a interface ar/água (Figura 4). As soluções estoque dos

herbicidas foram preparadas com concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L para a atrazina e $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L para a prometrina e diluídas para a concentração desejada no colóide de Ag. As concentrações finais das soluções de atrazina e prometrina diluídas no colóide de Ag foram $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-9}$; $5,0 \times 10^{-10}$; $5,0 \times 10^{-11}$ e $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L.

2.7. Análise de dados

As análises de dados resultantes de aplicações de sensores e biossensores têm sido estudadas através de métodos estatísticos e computacionais, tais como Análise de Componentes Principais (PCA)⁵⁵ e Visualização da Informação,⁴⁴ respectivamente, ferramentas empregadas para reduzir a dimensionalidade dos dados. Nestes métodos são realizadas projeções de dados de um espaço multidimensional em um conjunto 2D ou 3D com a máxima preservação de relações de similaridade. Uma das técnicas de Visualização da Informação é a Técnica de Projeção Multidimensional (TPM). Formalmente, os dados no espaço original são representados por $X = \{x_1, x_2, \dots, x_n\}$, e $\delta(x_i, x_j)$ é definido como a distância entre os dois pontos de dados i e j . Eles são mapeados em um diagrama 2D com marcadores gráficos representados por $Y = \{y_1, y_2, \dots, y_n\}$, que são determinados em um procedimento de otimização usando uma função injetora $f: X \rightarrow Y$ que minimiza $|\delta(x_i, x_j) - d(f(x_i), f(x_j))| \approx 0, \forall x_i, x_j \in X$, em que $\delta(x_i, x_j)$ representa a dissimilaridade entre os objetos i e j no espaço original e $d(y_i, y_j)$ é a função de distância do plano projetado⁴⁵. Há uma tentativa de preservar no espaço projetado a semelhança de dados no espaço multidimensional original. A flexibilidade desta abordagem de otimização surge a partir da disponibilidade de funções de vários custos (ou de erro) utilizadas para a colocação dos marcadores gráficos sobre um diagrama 2D. Aqui utilizou-se o mapeamento chamado de Sammon⁴³ e *Interactive Document Map* (IDMAP),⁵⁶ cujas funções de erro são dadas:

$$S_{Sam} = \frac{1}{\sum_{i < j} \delta(x_i, x_j)} \sum \frac{(d(y_i, y_j) - \delta(x_i, x_j))^2}{\delta(x_i, x_j)} \quad (1)$$

em que δ e d são as funções de distância definidas acima.

$$S_{IDMAP} = \frac{\delta(x_i, x_j) - \delta_{\min}}{\delta_{\max} - \delta_{\min}} - d(y_i, y_j) \quad (2)$$

em que $\delta_{\min}$ e $\delta_{\max}$ são as distâncias mínima e máxima entre as amostras.

2.8. Espectroscopia de impedância e crescimento do filme LbL de PAH/AgNPs

As medidas de espectroscopia de impedância foram realizadas utilizando um analisador Solartron, modelo 1260A. As medidas foram obtidas na faixa de frequência de 1 Hz a 1 MHz usando 50 mV de amplitude. Foram utilizadas 2 unidades de detecção: um eletrodo interdigitado de Pt (*bare*) e um eletrodo interdigitado de Pt modificado com 5 bicamadas LbL de soluções de PAH/AgNPs (Figura 5). O eletrodo *bare* foi utilizado para monitorar qualquer alteração na resposta elétrica provocada por meio dos filmes ultrafinos. Estas unidades sensoriais de detecção foram aplicadas para discriminar a água ultrapura e as soluções de atrazina ou prometrina nas concentrações de $1,1 \times 10^{-10}$; $1,1 \times 10^{-9}$; $1,7 \times 10^{-8}$; $5,6 \times 10^{-8}$ e $1,1 \times 10^{-7}$ mol/L preparadas por adição de alíquotas de soluções estoque em água ultrapura. Os eletrodos interdigitados utilizados foram de Pt com 50 pares de dígitos, sendo que cada dígito possui 10 μ m de largura, 0,5 mm de comprimento e 100 nm de espessura, espaçados de 10 μ m um do outro. Os filmes LbL foram crescidos imergindo o eletrodo em soluções na seguinte sequência: solução de PAH (3 min) depois em água ultrapura agitando suavemente para remover o PAH não adsorvido (1 min), em seguida foi imerso em colóide de AgNPs por 3 minutos e novamente imerso em água ultrapura (1 minuto) para remover as nanopartículas não adsorvidas no substrato.

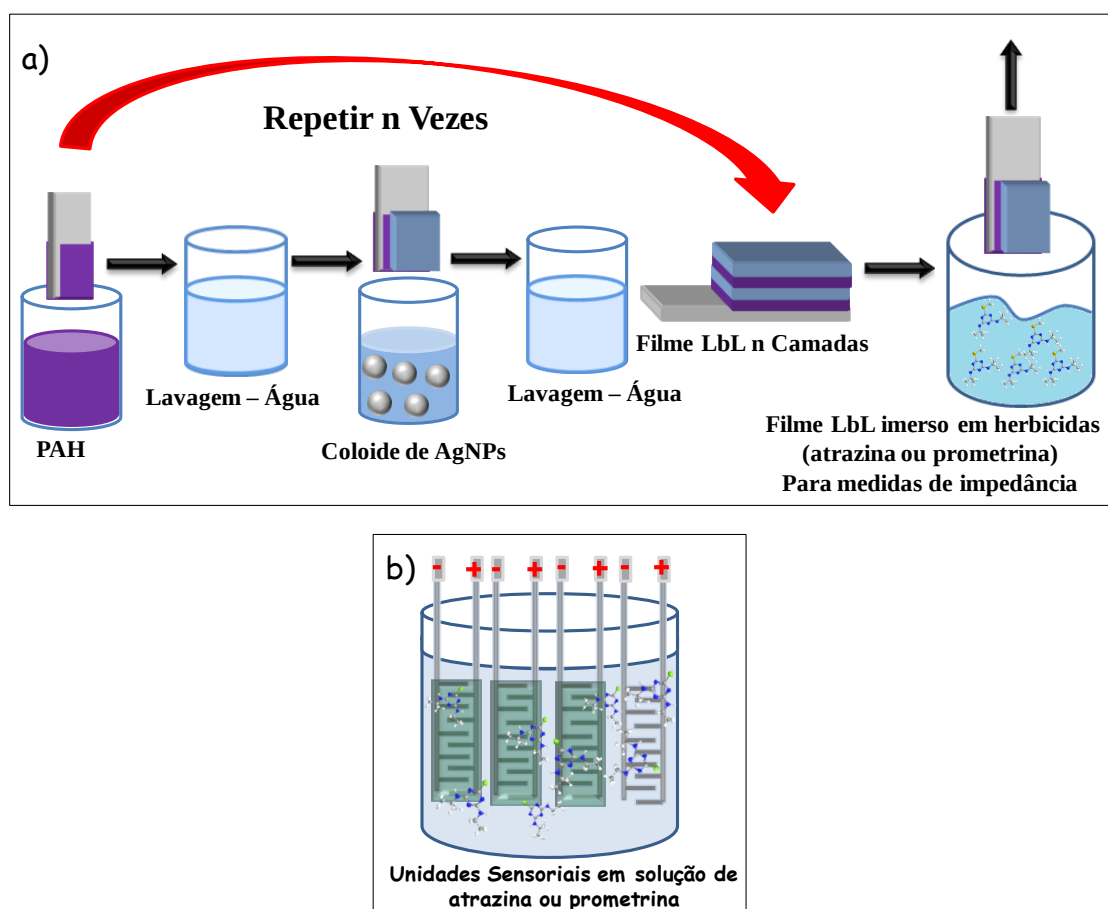


Figura 5: representação esquemática para a) filmes LbL de PAH/AgNPs imersos em soluções de atrazina ou prometrina. b) ilustração dos filmes LbL de PAH/AgNPs nos eletrodos de Pt para realização das medidas de impedância.

Capítulo III

*Caracterização do colóide de Ag na
presença da atrazina e da prometrina*

3.1. Potencial zeta: colóide de Ag

A seguir são exibidos resultados de potencial zeta (ζ) que representa a carga elétrica superficial do colóide de Ag. A Tabela II apresenta valores de potencial zeta e a média destes valores para o colóide de Ag sintetizado com o agente redutor cloridrato de hidroxilamina (AgHi). Estes valores referem-se a 5 medidas repetidas para a mesma síntese do colóide de Ag (pH $\sim$ 6).

Tabela II. Valores de potencial zeta e na parte inferior é indicado o valor médio do potencial zeta ($\bar{X}$). O desvio padrão (σ) e o erro da medida (Er).

Potencial zeta (mV)
AgHi
-29,7
-30,8
-24,5
-29,1
-23,1
$\bar{X} = -27,4 / \sigma = 3,4$
$Er = 1,5$

O valor médio do potencial zeta foi de -27,4 mV, o que está dentro da faixa (-30mV a +30mV) correspondente a colóides instáveis^{57,58}. Em trabalhos como de Neto *et al.*⁵⁹ e Saade *et al.*⁵⁸, a estabilidade do colóide é confirmada para valores inferiores a -30 mV ($\zeta \leq -30\text{mV}$) ou superiores a 30 mV ($\zeta \geq 30\text{ mV}$), sendo relatado também nestes trabalhos que a aglomeração das nanopartículas aumenta quando o potencial zeta se aproxima de zero^{57,59}. O valor do potencial zeta do colóide de Ag deste trabalho de mestrado (-27,4 mV) está próximo do limite inferior adequado para a estabilidade do

colóide. A estabilidade do colóide é fundamental para que não ocorra a aglomeração das nanopartículas e a precipitação da Ag, perdendo-se a característica de colóide.

3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV): nanopartículas de Ag

A caracterização morfológica do colóide de Ag foi obtida pela técnica de MEV. A Figura 6 apresenta imagem de MEV para o filme *cast* da nanopartícula de Ag com ampliação (25.000X).

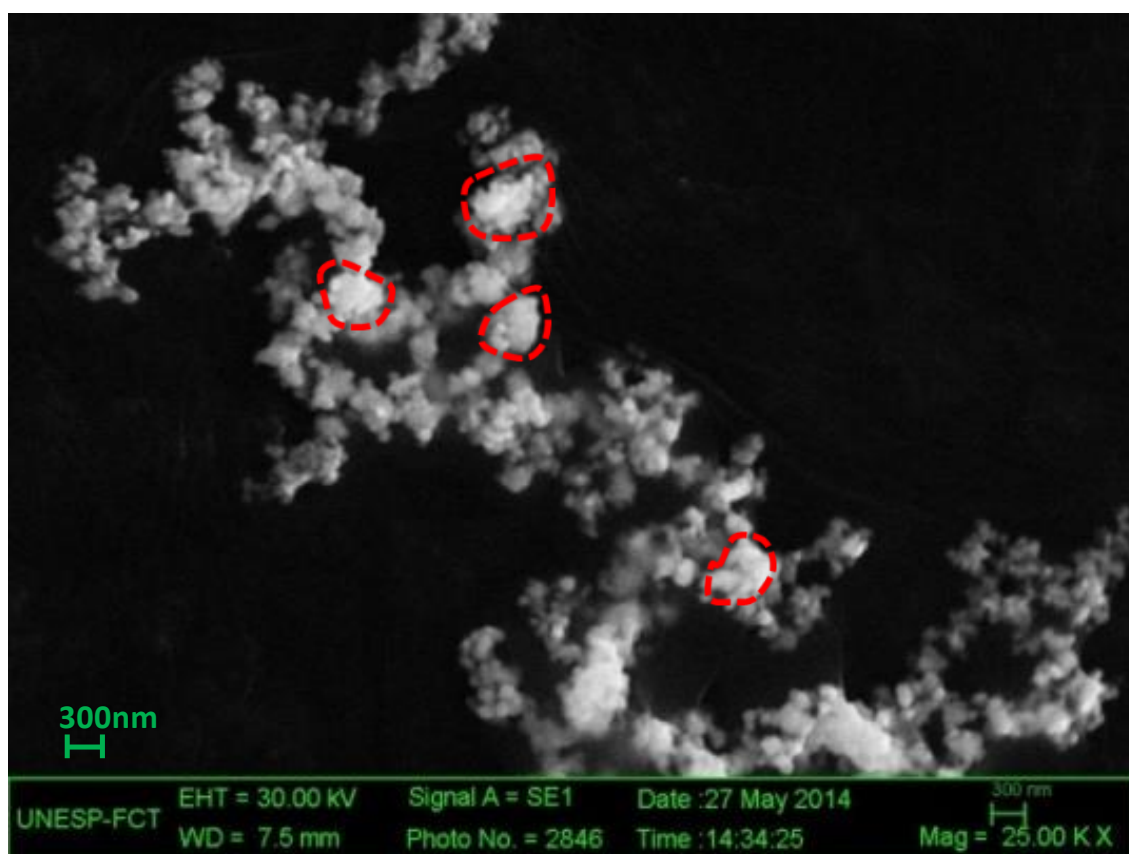


Figura 6: imagem de MEV usando ampliação de 25.000X do *cast* da nanopartícula de Ag. Os pontilhados que estão em vermelho mostram regiões que houve a agregação da Ag. A imagem mostra uma barra de 300 nm.

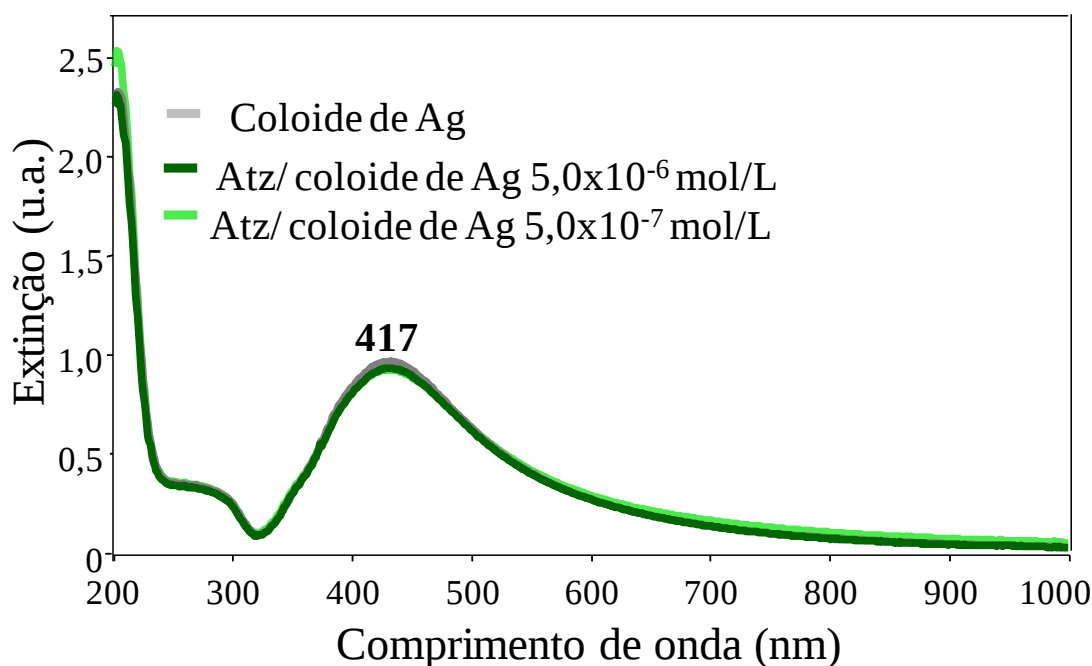
A imagem de MEV apresentada na Figura 6 mostra a agregação da nanopartícula de Ag formando um emaranhado de AgNPs. A agregação do colóide de Ag foi observada em diferentes pHs e temperaturas por MEV e UV-Vis no trabalho de Gorup L.F⁶⁰. A aparência da agregação observada no trabalho de Gorup L.F⁶⁰ é similar com a deste trabalho de mestrado. No entanto, neste trabalho de mestrado o colóide de

Ag apresenta um valor de potencial zeta próximo do estável, mostrando que este coloide é adequado para a aplicação de medidas SERS. Normalmente é necessário ativar o coloide com algum tipo de sal (nitrato de potássio (KNO_3); hidróxido de sódio (NaOH)) para a realização das medidas SERS. No entanto, neste trabalho não foi necessário ativar o mesmo com algum tipo de sal⁶¹⁻⁶³. A imagem de MEV está de acordo com os resultados de potencial zeta (3.1), pois o potencial zeta mostra que as nanopartículas estão se agregando, devido ao valor do colóide de Ag (-27,4 mV) não estar dentro do intervalo adequado de estabilidade ($\zeta \leq -30\text{mV}$ ou $\zeta \geq 30\text{mV}$)⁵⁷⁻⁵⁹. Portanto, existem condições para a agregação das nanopartículas. As aglomerações das AgNPs para sistemas coloidais realizados com citrato também foram observadas por imagens de MEV^{43,60}. A agregação do colóide é fundamental para ativar o SERS e obter o sinal do analito de interesse. A agregação aumenta os interstícios para amplificação do sinal dos herbicidas^{20,43}.

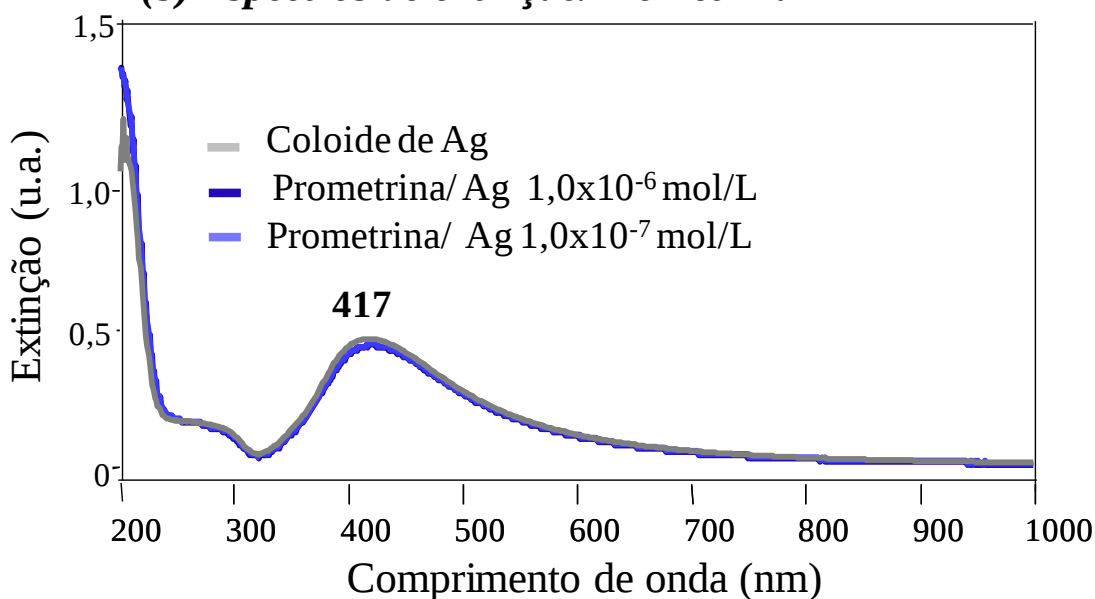
3.3. Medidas de extinção: colóide de Ag e Ag/herbicidas

As medidas de extinção foram realizadas para verificar se há os deslocamentos de bandas referentes à adsorção dos herbicidas na superfície da Ag e para inferirmos se o coloide de Ag está adequado para aplicação das medidas SERS, comparando seu *plasmon* de acordo com a literatura. As Figuras 7^a e 7^b mostram resultados da espectroscopia de extinção do colóide de Ag e para as soluções de atrazina e prometrina diluídas no colóide nas concentrações de $5,0 \times 10^{-6}$ e $5,0 \times 10^{-7}$ mol/L. As Figuras 7a e 7b apresentam destacada a extinção entre 250 e 1000 nm, com máximo em 417 nm referente ao *plasmon* (dipolos)⁶³. Existe um pequeno ombro na região de 370 nm que se refere à absorção via quadrupolos^{61,64}. A banda na região de 370 nm pode ser também atribuída a uma transição eletrônica dos elétrons da Ag^+ ^{47,65,66}, há uma terceira hipótese, sendo a transição eletrônica do íon NO_3^- que está disperso no colóide de Ag^{60,61}.

(a) Espectros de extinção/Atrazina



(b) Espectros de extinção/Prometrina



Figuras 7: espectros de extinção para o colóide de Ag sintetizado com hidroxilamina hidrocloreáda contendo a) atrazina e b) prometrina diluídas no colóide de Ag em concentrações de 10^{-6} e 10^{-7} mol/L. A banda de *plasmon* é observada na região de 417 nm e um pequeno ombro é observado referente aos quadrupolos na região de 370 nm.

A extinção na região de 417 nm apresentada na Figura 7a e 7b está associada às AgNPs predominantes em formatos esféricos⁴³, consistente com o que é visto na Figura 6 para medidas de MEV. As AgNPs deste trabalho têm um tamanho entre 45 e

55 nm como observado na literatura para esta região de comprimento de onda (417 nm)⁴⁷. O trabalho de Izquierdo-Lorenzo *et al.*⁶¹ mostra as diferentes regiões de *plasmon* e suas respectivas imagens de MEV, estabelecendo os diâmetros para cada tipo de nanopartículas, o que está de acordo com este trabalho de mestrado. Na literatura é visto que as NPs sintetizadas com o agente redutor hidroxilamina hidrocloreada apresentam tamanhos menores que as sintetizadas com o agente redutor citrato⁶¹. No entanto, as AgNPs sintetizadas neste trabalho (417 nm) estão na mesma ordem de tamanho que as sintetizadas com citrato, pois o colóide de Ag sintetizado com hidroxilamina apresenta *plasmon* próximo da região de comprimento de onda das NPs com citrato^{43,61}. A forma e o tamanho das AgNPs desempenham um papel importante no deslocamento da ressonância de *plasmon* de superfície, sendo que quanto maior o comprimento de onda maior o tamanho das NPs⁶⁷⁻⁶⁹. O trabalho de Mock *et al.*⁶⁹ mostra que a região referente ao azul é característica de AgNPs esféricas. Reforçando esta idéia de deslocamento de *plasmon*, o trabalho de Garcia-Leis *et al.*⁷⁰ apresenta fabricação de nanoestrelas de Ag (*silver nanostars* (AgNS)) possuindo na primeira etapa da síntese o colóide de Ag com *plasmon* na região de 475nm, formando um colóide com nanopartículas em formato esférico. Na segunda etapa da síntese se adiciona citrato, produzindo um deslocamento de *plasmon* para regiões de maiores comprimentos de onda formando assim as AgNS⁷⁰.

As soluções de atrazina e prometrina diluídas no colóide de Ag não produziram deslocamento do *plasmon* nem aumento na largura da banda nas condições testadas, portanto isto infere que não foi possível observar por medidas de UV-Vis uma interação Ag/herbicidas. Isto pode se dever às baixas concentrações dos herbicidas (10^{-6} e 10^{-7} mol/L) e ao fato do colóide de Ag apresentar sua agregação própria como foi observado nas seções (3.1 e 3.2). No entanto, o trabalho recente de Furini *et al.*⁶² mostra o deslocamento de *plasmon* do colóide de Ag comparado ao da solução do herbicida

carbendazim (MBC) diluída no colóide de Ag. Este deslocamento de *plasmon* está relacionado à forte interação do MBC com a Ag, induzindo assim uma agregação do colóide. O mesmo deslocamento é observado no trabalho de Izquierdo-Lorenzo *et al.*⁶¹.

3.4. Medidas SERS: coloide de Ag

As Figuras 8 e 9 mostram resultados de duas sínteses distintas do colóide de Ag (sintetizado com água ultrapura, ambas as sínteses em pH~6) realizadas através do mesmo procedimento (2.2). Foram sintetizados com o agente redutor hidroxilamina. A Figura 8 mostra o colóide de Ag utilizado para o SERS da prometrina dissolvida em água ultrapura (Cap IV). A Figura 9 apresenta espectros do colóide de Ag que foi utilizado para obtenção do SERS da atrazina dissolvida em água ultrapura (Cap V).

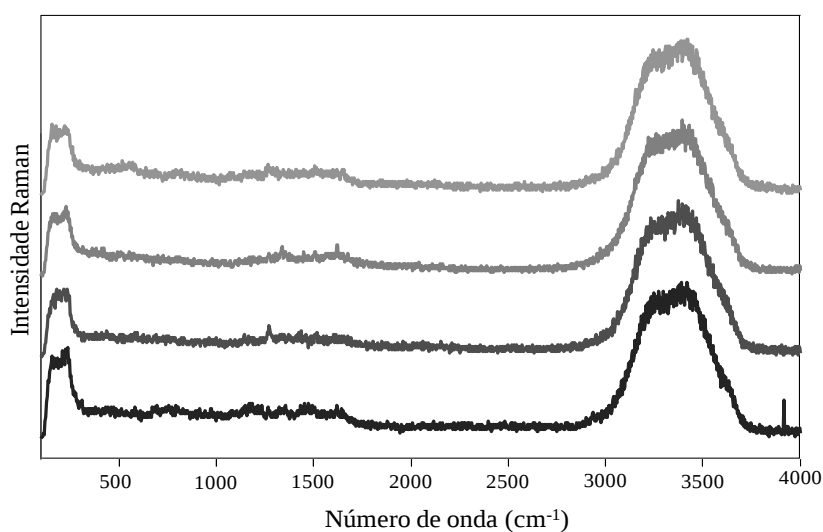


Figura 8: espectros Raman do colóide de Ag utilizado para a realização do SERS da prometrina.

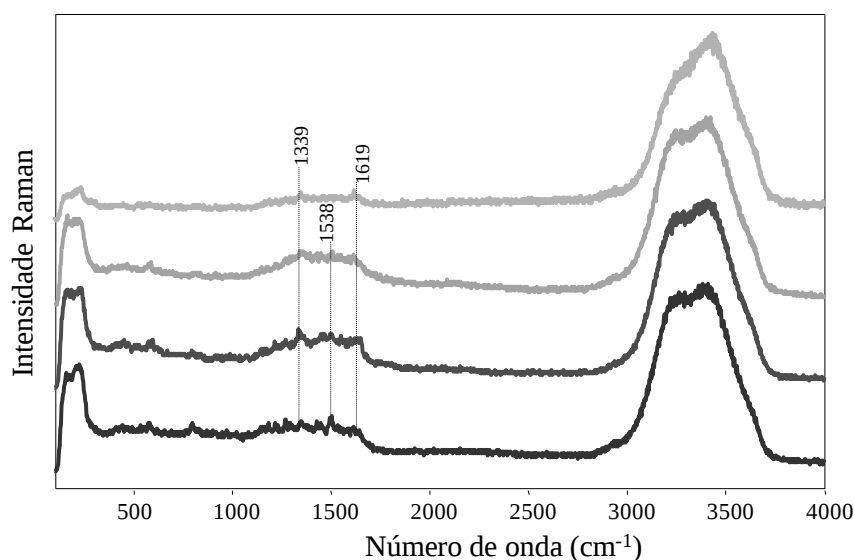


Figura 9: espectros Raman do colóide de Ag utilizado para realização do SERS da atrazina.

A Figura 8 mostra apenas o sinal do colóide de Ag. A Figura 9 apresenta algumas bandas nas regiões de 1339 a 1619 cm^{-1} para os espectros do colóide de Ag. No entanto, as bandas observadas na Figura 9 foram notadas no início do trabalho de mestrado, para fazer a comparação com as bandas do herbicida atrazina (Figura 10). As bandas observadas nos espectros da Figura 9 podem ser por não utilizar água fervente na limpeza das vidrarias, diferente do método utilizado na limpeza das vidrarias para a síntese do colóide de Ag da Figura 8. Porém, não podem ser descartados os relatos de produtos gerados na síntese do colóide de Ag realizado com o agente redutor hidroxilamina, as bandas observadas no Raman do colóide de Ag (Figura 9) podem ser devido a estes produtos. O livro de Aroca *et al.*⁴⁷ mostra que essa síntese apresenta a desvantagem pela formação de óxido de nitrogênio como produto, os quais (N_2O) pode reagir com a água formando ácidos de nitrogênio que dão a acidez do meio aquoso do colóide. Todavia, esta formação de nitrogênio como produto pode não ter uma seleção por SERS e não ocorrer estas interações (Bandas) que se observa na Figura 9. Ressaltando que não encontram trabalhos na literatura que relatam essas bandas de produtos gerados pela síntese. Portanto, temos a hipótese que essas bandas são algumas

contaminações durante a preparação da síntese do colóide de Ag ou até mesmo depois, durante a realização dos experimentos. Esses espectros (Figura 8 e 9) do colóide de Ag são apresentados como referência para a melhor identificação das bandas de vibração da prometrina (Capítulo IV) e atrazina (Capítulo V).

Capítulo IV

*Detecção do herbicida prometrina por
espalhamento Raman amplificado em
superfície (SERS)*

4.1. Prometrina em água ultrapura

4.1.1. Detecção da prometrina em água ultrapura

O estudo referente aos espectros SERS da solução de prometrina diluída no colóide de Ag mostrou que a concentração do herbicida desempenha um papel importante no sinal SERS, uma vez que a agregação das moléculas de prometrina pode dificultar a adsorção sobre o colóide de Ag⁷¹. O efeito da concentração de prometrina na intensidade do espectro SERS pode ser observado nas Figuras 10 e 11. A Figura 10 mostra os espectros do herbicida diluído no colóide de Ag em concentrações relativamente elevadas: $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol/L. Em contraste, as bandas com intensidade Raman mais intensas e definidas são mostradas na Figura 11 para o herbicida diluído no colóide de Ag em concentrações relativamente baixas: $5,0 \times 10^{-7}$ a $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. O espectro Raman do colóide de Ag é mostrado como referência para a melhor identificação das bandas de vibração da prometrina nas Figuras 10 e 11.

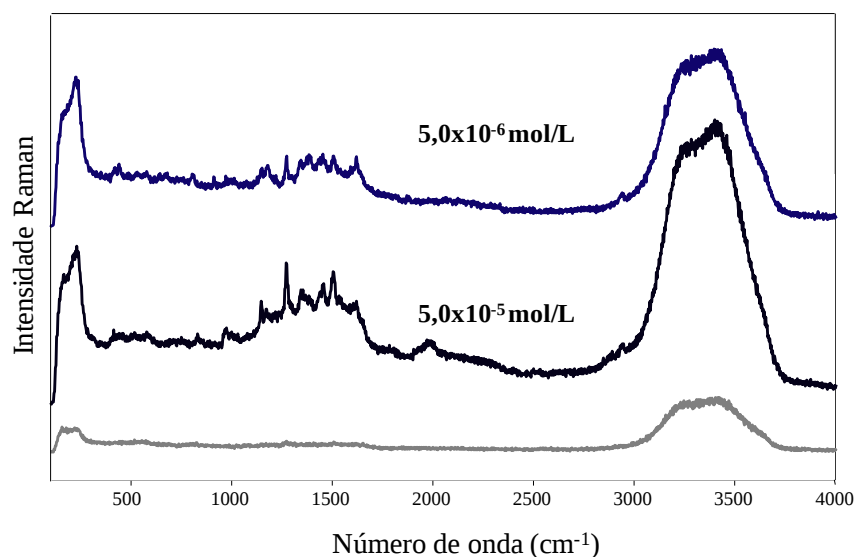


Figura 10: espectros SERS das soluções de prometrina diluídas no colóide de Ag em concentrações de $5,0 \times 10^{-5}$ e $5,0 \times 10^{-6}$ mol/L.

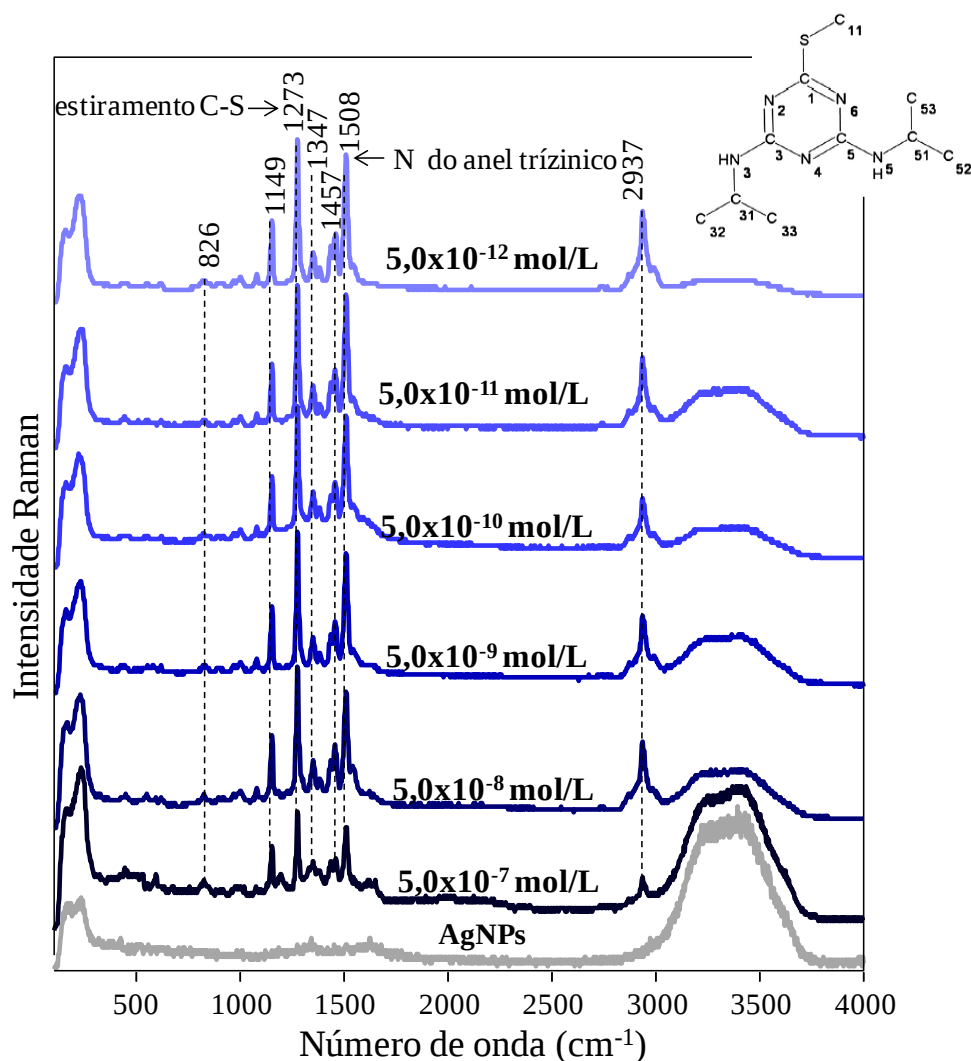


Figura 11: espectros SERS de soluções de prometrina diluídas no colóide de Ag em concentrações $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-9}$; $5,0 \times 10^{-10}$; $5,0 \times 10^{-11}$ e $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. O espectro do colóide de Ag é dado como referência, na parte inferior, a fim de distinguir as bandas de vibração da prometrina, cuja estrutura molecular com os átomos enumerados é dada na inserção.

As principais bandas vibracionais do espectro SERS para a solução de prometrina diluída no colóide de Ag e para o espectro Raman convencional do herbicida em pó são atribuídas na Tabela III.

Tabela III. Atribuições vibracionais de bandas características do pó da prometrina e do espectro SERS da solução de prometrina diluída no colóide de Ag em concentração de $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. Em vermelho estão alguns números de onda relacionados às bandas que desaparecem no espectro SERS da prometrina^{38,72,73}.

Prometrina/pó (cm ⁻¹)	Prometrina/SERS (cm ⁻¹)	Atribuições
419	429	(deformação no plano dos grupos CNC + CSC) ⁷³
499		(deformação no plano dos grupos CH ₃ + CH) ⁷³
	615	(estiramento Ag-S) ⁷⁴
703		(deformação do anel fora do plano+ estiramento C-S) ^{38,72}
829	826	(respiração do anel) ³⁸
902		(respiração do anel) ³⁸
965	964	(respiração do anel) ³⁸
1126		(deformação do grupo isopropílico) ⁷²
1157	1149	(estiramento C-S) ^{38,72}
1176		(deformação do grupo isopropil) ⁷²
1273	1273	(estiramento C-S) ^{38,72} (deformação do anel N-C-H) ⁷² ; (deformação C-C-H) ³⁸
1310		(deformação do anel N-C-H) ⁷² (deformação C-C-H) ³⁸
1346	1347	(CH ₃ <i>symmetric bending</i>) ⁷²
1448	1457	(deformação CH ₃) ³⁸
2872		(estiramento simétrico C-H do grupo CH ₃) ³⁸
2909		(estiramento antissimétrico C51-H + C52-H + C53-H do grupo CH ₂) ³⁸
2933	2937	(estiramento simétrico C31-H + C32-H + C33-H do grupo CH ₂) ³⁸
2971		(estiramento antissimétrico do grupo C31-32-H do grupo CH ₃) ³⁸

Vale ressaltar que os espectros SERS das soluções mais concentradas (Figura 9) foram obtidos mais fácil que os espectros SERS para o herbicida diluído no colóide de Ag nas concentrações abaixo de 10^{-8} mol/L. Os espectros da Figura 11 não foram simples de se obter, pois exigiram vários espectros (aproximadamente 8 espectros para cada concentrações) para a obtenção destes mostrados na Figura 11. Provavelmente, apenas as moléculas do herbicida adsorvidas nos "hot spots" dão origem a sinais mensuráveis como observado na Figura 11^{75,76}. A Figura 11 não mostra sobreposições de bandas dos espectros SERS da prometrina em relação ao Raman do colóide de Ag, sendo observadas somente as bandas referentes ao herbicida. A melhoria de sinal (relação sinal/ruído) é encontrada para as bandas atribuídas aos modos de vibração que

envolve o anel do herbicida prometrina na região de 1100 a 1500 cm^{-1} ³⁸. O maior aumento na intensidade foi observado na banda em 1273 cm^{-1} atribuída à deformação do anel N-C-H com o estiramento C-S^{38,72}.

A utilização de SERS para distinguir as soluções de prometrina é melhor evidenciada por tratamento dos espectros SERS utilizando a técnica de projeção multidimensional. Os resultados apresentados na Figura 12 estão agrupados de acordo com a similaridade dos espectros SERS das amostras colóide de Ag e Ag/prometrina. Quanto mais próximos os círculos, mais semelhantes os espectros SERS, sendo que cada círculo representa um espectro SERS (são mostrados 3 espectros para cada amostra). Os espectros SERS correspondentes as diferentes concentrações de prometrina estão afastados uns dos outros, o que indica que as amostras podem ser distinguidas até $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. Neste trabalho de mestrado foi confirmada a capacidade de distinção das concentrações por tratamento dos espectros SERS (Figura 11) e através da técnica de projeção multidimensional IDMAP, cujos resultados estão mostrados na Figura 11.

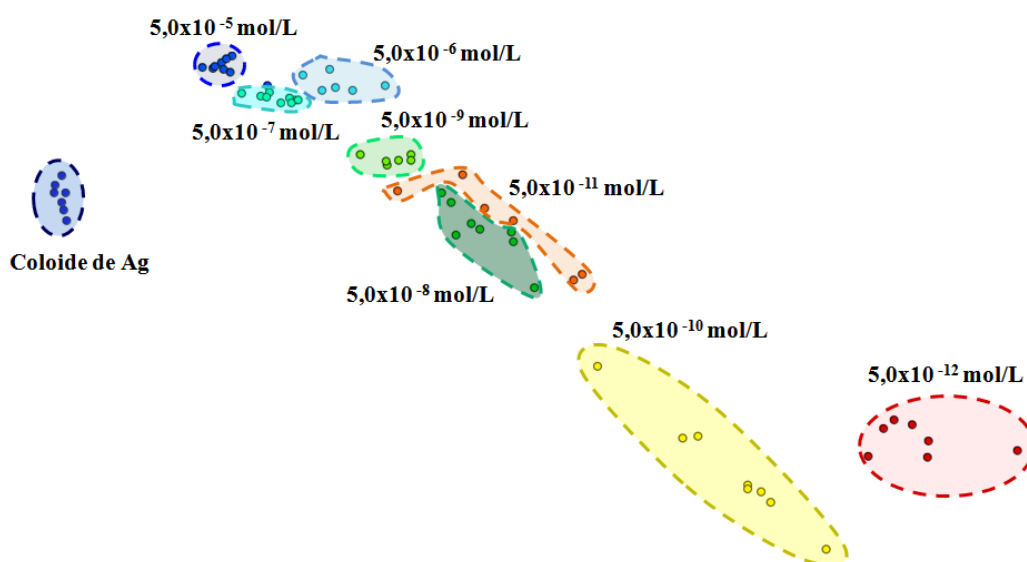


Figura 12: projeção multidimensional IDMAP agrupando por semelhança os espectros SERS para diferentes concentrações de prometrina em soluções de água ultrapura.

A maior dispersão dos dados foi vista para as soluções de prometrina em 10^{-10} , 10^{-11} e 10^{-12} mol/L, o que é uma consequência direta das flutuações nos espectros SERS que afetam a largura da banda, a forma da banda, o deslocamento Raman e as intensidades absolutas e relativas para as soluções altamente diluídas. Os parâmetros de flutuações nos espectros são típicos de um comportamento observado para soluções muito diluídas, cujo limite é a detecção de uma única molécula, o que é revelado através das alterações no perfil dos espectros SERS em conjunto com a compensação das alterações locais do ambiente molecular^{20,77,78}. De fato, neste trabalho de mestrado estima-se haver três moléculas de prometrina por picolitros (10^{-12} L). A escala de picolitros foi escolhida, pois essa é a ordem de grandeza do volume do laser em experimentos de detecção de uma única molécula^{39,76,79,80}.

A concentração estudada neste trabalho de mestrado foi a menor já detectada para soluções de prometrina, aproximando-se dos níveis de única molécula. Trabalhos com o uso de SERS para prometrina relatados na literatura até o momento não apresentaram valores menores que 10^{-4} mol/L. Foram observados trabalhos na literatura para a detecção de prometrina com técnicas cromatográficas atingindo limites 10^{-6} a 10^{-10} mol/L^{29,81-83}, enquanto a utilização do método polarográfico de pulso diferencial levou à detecção dos herbicidas atrazina, simazina e prometrina até $8,0 \times 10^{-8}$ mol/L²⁸. Oliveira-Brett *et al.*⁸⁴ relataram um biossensor eletroquímico a fim de investigar as interações entre o DNA e herbicidas do grupo s-triazina, obtendo um limite de detecção de $5,0 \times 10^{-4}$ mol/L.

4.1.2. Adsorção da prometrina em coloide de Ag

A Figura 13 compara o espectro SERS da solução de prometrina ($5,0 \times 10^{-12}$ mol/L) diluída no colóide de Ag com o espectro Raman da prometrina em pó. As linhas pontilhadas estão mostrando as bandas (em cor vermelha) que são características do

herbicida em pó e que praticamente desapareceram no espectro SERS da prometrina (10^{-12} mol/L). Consequentemente, algumas discussões podem ser destacadas. i) A banda em 615 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-S⁷⁴ do espectro SERS da prometrina, revelando aproximação desta região do herbicida na AgNPs. ii) A banda na região de 965 cm^{-1} é atribuída a vibração do anel triazínico e apresenta a maior intensidade no espectro Raman do herbicida em pó, no entanto sua intensidade diminui drasticamente no espectro SERS da prometrina. As bandas em 703, 902 e 1310 cm^{-1} são referentes a vibração do anel triazínico e também desapareceram no espectro SERS da prometrina. Considerando a regra de seleção SERS, segundo a qual as bandas relacionadas aos modos de vibração que estiverem paralelo a superfície das AgNPs tendem a diminuir ou até mesmo desaparecer^{20,21,47,85}, e sabendo que as bandas mencionadas acima pertencem ao plano do anel, pode-se inferir que o anel triazínico está preferencialmente paralelo à superfície das AgNPs. iii) As vibrações dos grupos laterais alifáticos da prometrina referentes às bandas 1126, 1176, 2872, 2909 e 2971 cm^{-1} também desapareceram no espectro SERS da prometrina. Como tais vibrações não possuem direções preferenciais, as regras de seleção não têm grande interferência sobre suas intensidades. Esses desaparecimentos podem, portanto, estar relacionados a processos de degradação do herbicida por meio de uma desalquilação⁸⁶⁻⁸⁸. iv) As outras bandas (em cor preta) mostradas na Figura 13 são relacionadas aos números de onda do espectro SERS da prometrina que também estão presentes no Raman do herbicida em pó. Pequenas diferenças quanto ao centro da banda e intensidades relativas podem ser observadas, as quais podem ser consequência dos fatores discutidos em (i), (ii) e (iii), além da questão intrínseca dos diferentes ambientes que o herbicida está sendo analisado (pó/colóide)^{20,85}.

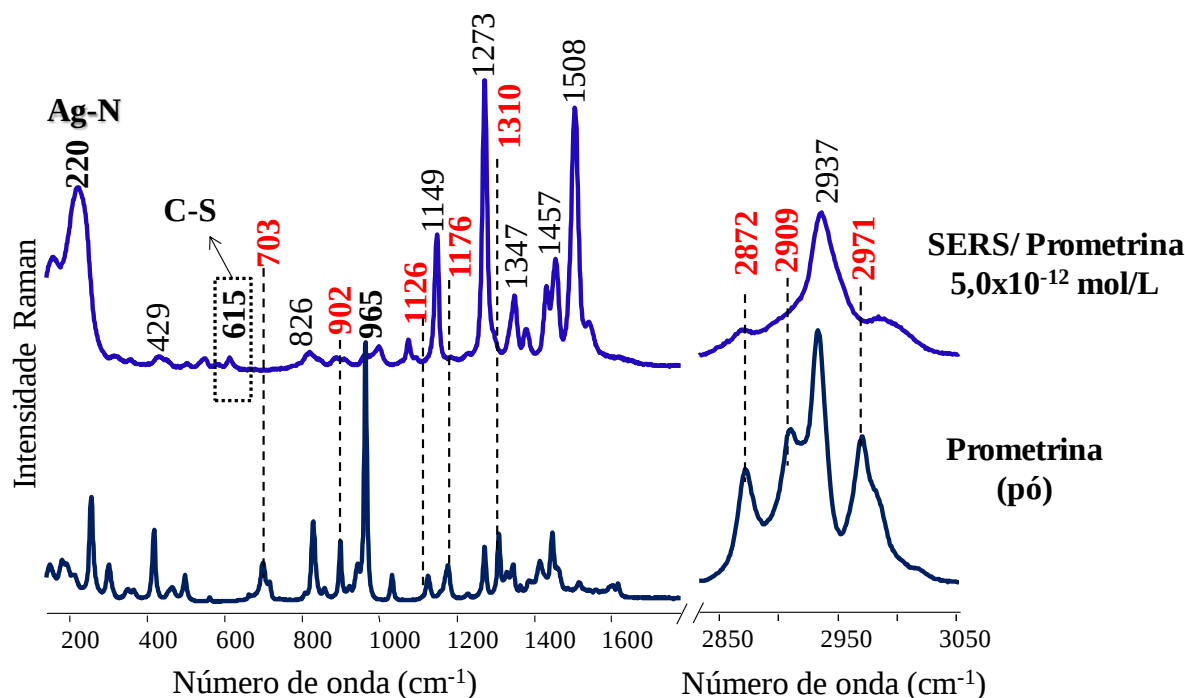


Figura 13: espectro SERS da solução de prometrina diluída no colóide de Ag em $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L em comparação ao espectro Raman da prometrina em pó. Em vermelho estão os números de onda relacionados ao espectro do herbicida em pó.

A melhora do sinal SERS, como mencionado em (ii), é altamente dependente da orientação molecular e da distância entre os grupos moleculares e a nanopartícula, praticamente desaparecendo para distâncias maiores que $150 \text{ \AA}^{20}$. Devido a isso, podemos assumir que a adsorção da prometrina nas AgNPs se dá pela banda 1273 cm^{-1} que apresenta a maior intensidade nos espectros SERS (Figura 11 e 13). Portanto, as moléculas do herbicida devem estar preferencialmente adsorvida nas AgNPs através dos grupos S-C. A Figura 14 ilustra esta adsorção e resultado similar em relação a adsorção dos átomos C-S foi obtido por Bonora *et al.*³⁸ em estudos utilizando Raman e SERS como método de diferenciação para os herbicidas triazínicos, atrazina, prometrina e simetrina e pelos cálculos teóricos de Benassi *et al.*⁷². Destacamos a banda mais intensa do espectro Raman para o pó do herbicida em 965 cm^{-1} (respiração do anel), entretanto esta banda diminuiu drasticamente no espectro SERS do herbicida (Figura 13),

sugerindo que as moléculas de prometrina têm o seu anel triazínico posicionado paralelo à superfície das AgNPs adsorvendo na superfície das AgNPs via átomos C-S²⁰.

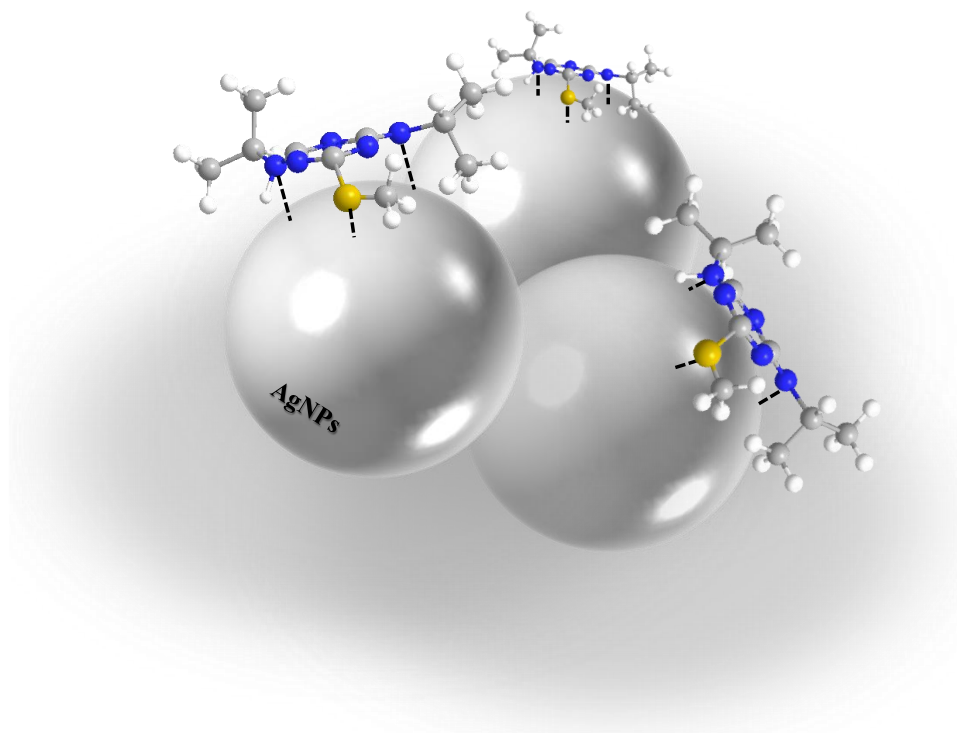


Figura 14: ilustração da adsorção da prometrina nas AgNPs via átomos de C-S (cinza e amarelo), com o anel paralelo as AgNPs.

4.2. Prometrina em água deionizada e de torneira

Um dos desafios mais relevantes no desenvolvimento de dispositivos analíticos é a análise de contaminantes em amostras reais. Nesta etapa do trabalho de mestrado também foi realizado um estudo a concentrações na ordem de ppm (água deionizada) e ppb (água de torneira) de prometrina em soluções de água deionizada e de torneira, simulando as condições existentes em amostras reais. A Figura 15a mostra espectros SERS coletados para prometrina dissolvida em água deionizada (10^{-7} mol/L) e diluída até a concentração de 10^{-12} mol/L em colóide de Ag. Os espectros SERS coletados para as soluções de prometrina dissolvida em água de torneira (10^{-5} mol/L) e diluída até a concentração de 10^{-9} mol/L em colóide de Ag são exibidos na Figura 15b. Os espectros típicos do colóide de Ag com adição de alíquota de água deionizada (Figura 15a) ou de

torneira (Figura 15b) são mostrados na parte inferior das Figuras 15a e 15b como referência para permitir uma melhor identificação das bandas de vibração da prometrina. Para melhor análise, vários espectros Raman dos colóides de Ag são mostrados nas Figuras 16a e 16b com alíquotas de água deionizada (Figura 16a) e de torneira (Figura 16b).

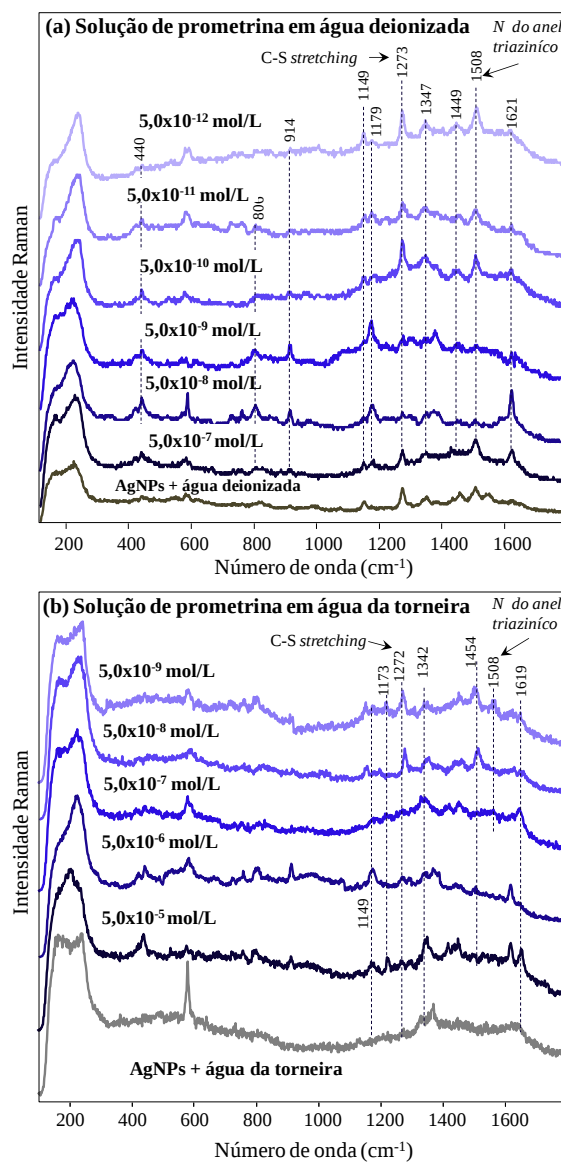


Figura 15: espectros SERS coletados para (a) soluções de prometrina em água deionizada diluída em colóide de Ag nas concentrações $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-9}$; $5,0 \times 10^{-10}$; $5,0 \times 10^{-11}$ e $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. (b) Soluções de prometrina em água de torneira diluída em colóide de Ag nas concentrações $5,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$ e $5,0 \times 10^{-9}$ mol/L. Os espectros do colóide de Ag com adição de água deionizada e de água de torneira são dados como referência na parte inferior de cada figura.

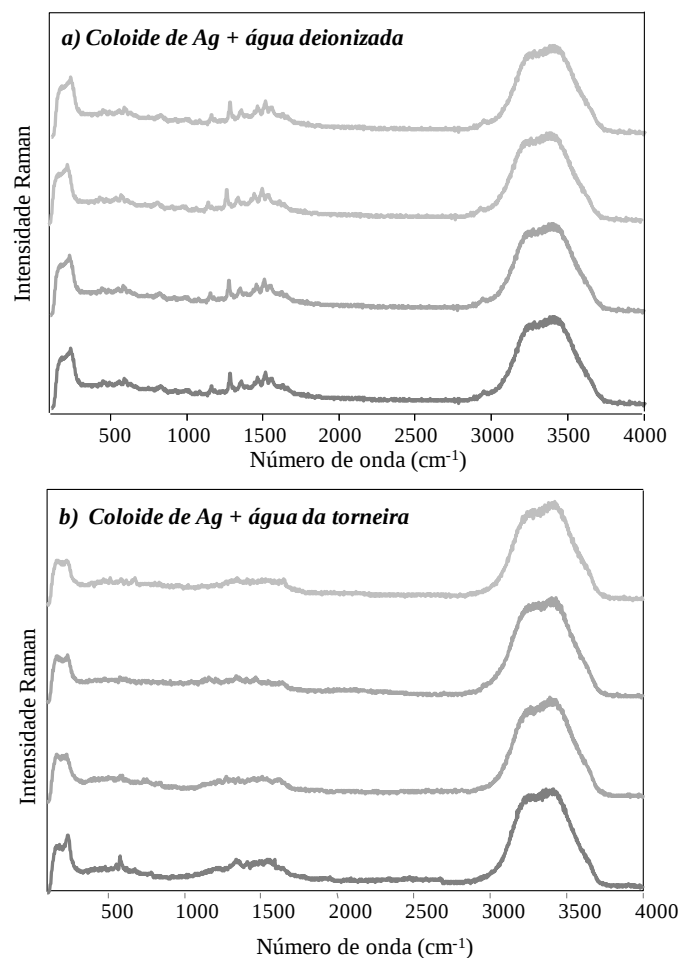


Figura 16: espectros Raman coletados a partir do próprio colóide de Ag contendo alíquotas de água (a) deionizada ou (b) de torneira.

As pequenas bandas observadas nas Figuras 16a e 16b do colóide de Ag contendo água deionizada ou de torneira indicam a presença de impurezas no meio ou de reagentes utilizados na síntese do colóide de Ag^{47,52}. Essas impurezas afetam o sinal SERS da molécula alvo, herbicida. De fato, existe uma sobreposição de bandas na região de 1100 a 1621 cm^{-1} para os espectros SERS de prometrina e do colóide de Ag, como mostram as Figuras 15a e 15b.

A adequação de SERS para determinar prometrina em soluções de água deionizada é mais claramente visualizada no gráfico 2D mostrado na Figura 17, em que os espectros SERS foram classificados por semelhança através da técnica multidimensional IDMAP.

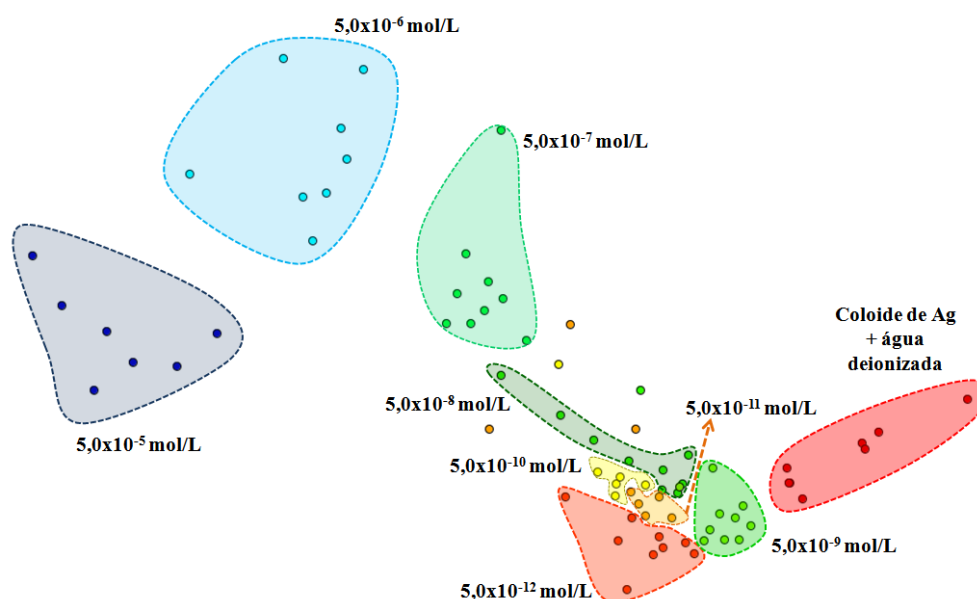


Figura 17: projeção multidimensional IDMAP agrupando por semelhança os espectros SERS para as diferentes concentrações de prometrina em soluções de água deionizada.

Os resultados foram agrupados de acordo com a semelhança entre os dados analisados. As concentrações de prometrina $5,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-6}$; $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$ e 5×10^{-9} mol/L diluídas no colóide de Ag estão agrupadas em *clusters* afastados uns dos outros, indicando que os espectros SERS podem distinguir estas amostras. No entanto, as soluções de prometrina mais diluídas ($5,0 \times 10^{-10}$; $5,0 \times 10^{-11}$ e $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L) são agrupadas ocorrendo algumas sobreposições, mostrando que estas soluções não podem ser claramente separadas entre si.

O espectro SERS de prometrina diluída em água de torneira apresenta o fator mais baixo em relação às intensidades absoluta e relativa das soluções, devido às impurezas no meio circundante do colóide de Ag. A Figura 18 apresenta a projeção dos dados adquiridos para soluções de prometrina diluídas em água de torneira para concentrações de 10^{-5} a 10^{-9} mol/L. Foram obtidos resultados para as concentrações mais baixas, porém omitidos da Figura 18, uma vez que seus pontos entraram em colapso no *cluster* para a referência do colóide de Ag. As maiores quantidades de

impurezas na água de torneira levaram a uma menor amplificação da prometrina nos espectros SERS em comparação com a água ultrapura e deionizada.

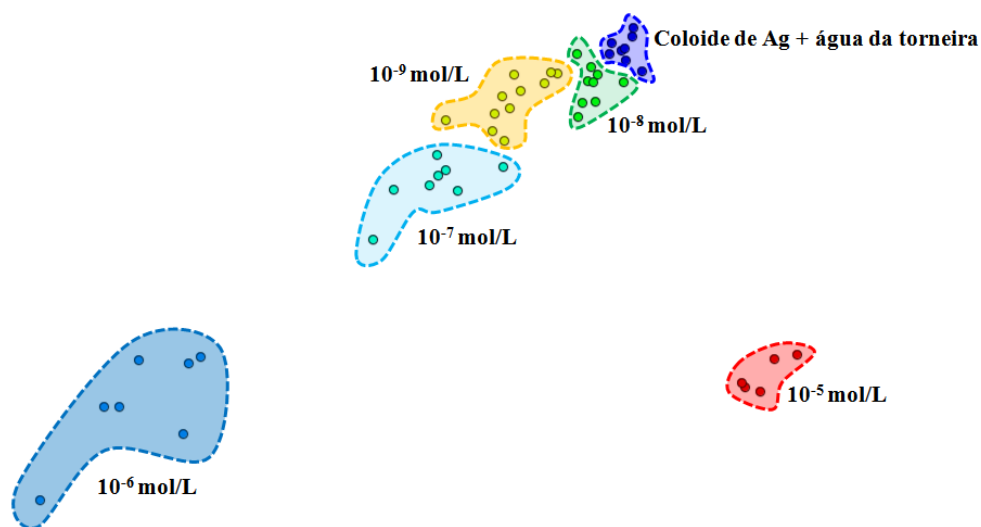


Figura 18: projeção multidimensional IDMAP agrupando por semelhança os espectros SERS para diferentes concentrações de prometrina em soluções de água de torneira.

O papel das impurezas foi destacado pela projeção IDMAP na Figura 19, em que os dados estão plotados a partir de diferentes referências do colóide de Ag (alíquotas de água ultrapura, deionizada e da torneira) com soluções de prometrina diluída na concentração de 10^{-9} mol/L (água ultrapura, deionizada e da torneira).

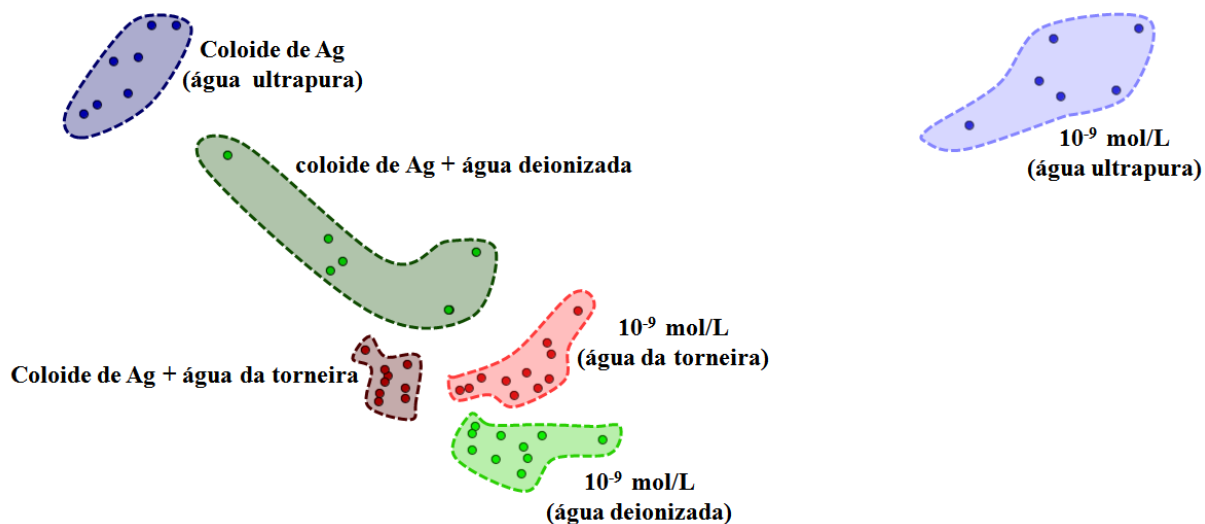


Figura 19: projeção multidimensional IDMAP agrupando os espectros das diferentes referências para os colóides de Ag e para prometrina a 10^{-9} mol/L em água ultrapura, deionizada e água de torneira.

A Figura 19 revela que a distância entre o conjunto de referência do colóide de Ag e o *cluster* correspondente para a amostra contendo prometrina diminuiu claramente na ordem de água ultrapura > água deionizada > água de torneira. Em conclusão, mesmo no pior cenário representado por soluções feitas com água de torneira, tratando os dados SERS com IDMAP é possível detectar concentrações de prometrina até uma ordem de grandeza abaixo do limite permitido para a água potável. Isso destaca a utilidade da técnica de projeção não só para lidar com os dados, mas também para aperfeiçoar a aplicação sensorial. O desempenho de detecção baseado em SERS é competitivo com alguns trabalhos na literatura para a detecção de pesticidas em amostras reais, sendo que a maioria dos trabalhos é baseada em métodos de extração e de exclusão de tamanho em técnicas de cromatografia^{29,89-91}. Koeber *et al.*⁸¹ foram capazes de detectar herbicidas triazínicos em amostras de rio com um limite de detecção de $3,3 \times 10^{-10}$ mol/L para simazina combinando a coluna de exclusão de tamanho com a cromatografia de adsorção⁸¹. Djozan *et al.* relataram a detecção dos herbicidas da família das s-triazina em água de torneira, com limite de detecção de $8,29 \times 10^{-8}$ mol/L utilizando cromatografia gasosa⁹². Técnicas eletroquímicas também foram aplicadas para a detecção dos herbicidas em soluções, alimentos e amostras reais. Alguns limites de detecção reportados na literatura foram de $1,7 \times 10^{-8}$ mol/L para metidationa⁹³, $1,9 \times 10^{-11}$ mol/L para o paraquat em tampão e em extratos de batata⁹⁴ e $8,9 \times 10^{-8}$ mol/L para o lindano em água ultrapura.

Para uma melhor análise das bandas do herbicida prometrina, os espectros SERS das soluções de prometrina em água ultrapura, deionizada e água de torneira estão comparados na Figura 20 com o espectro Raman da prometrina em pó. O espectro de referência do colóide de Ag com adição de alíquota de água de torneira é apresentado na parte inferior da figura.

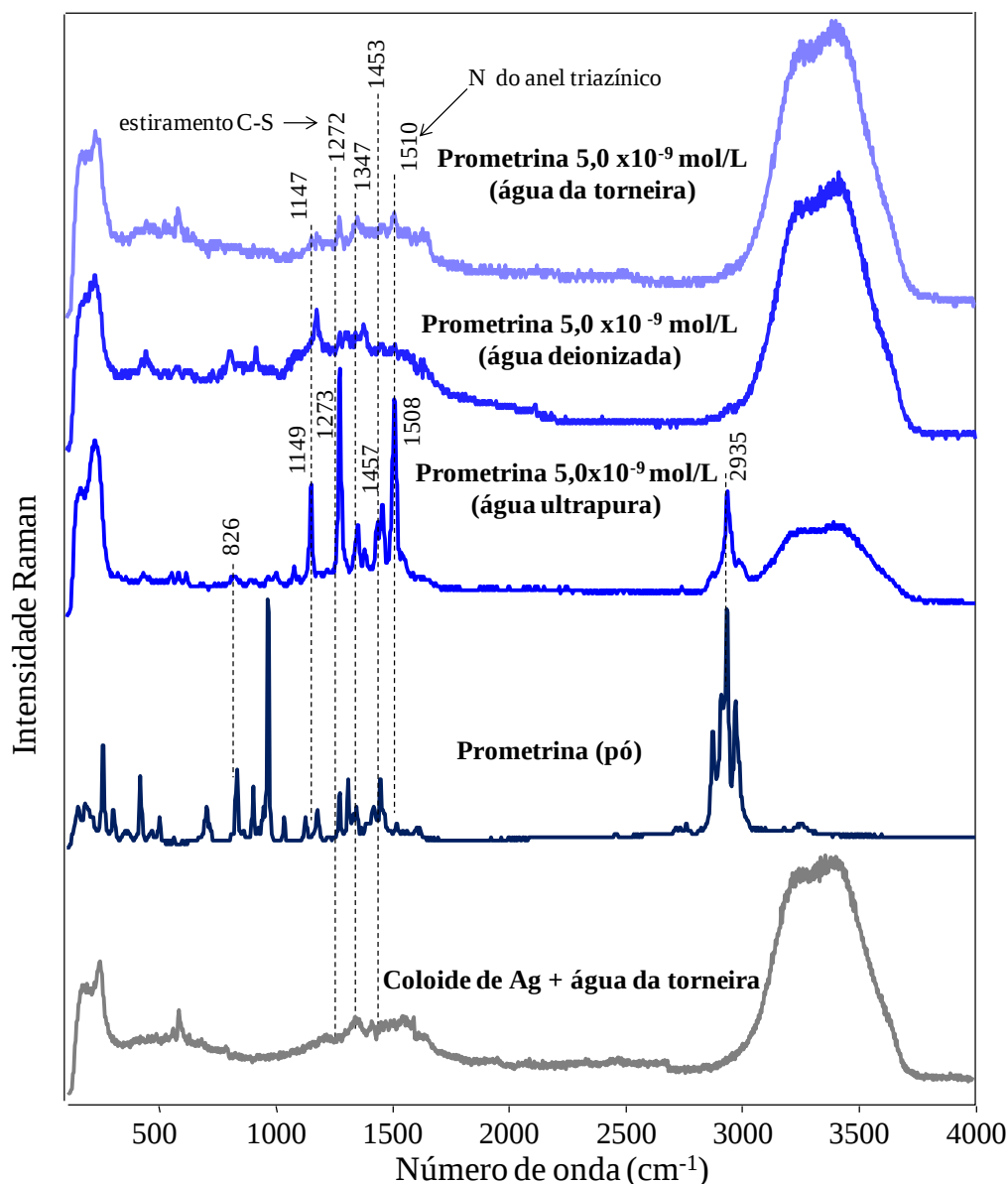


Figura 20: espectros SERS de prometrina dissolvida em água ultrapura ($5,0 \times 10^{-9}$ mol/L), água deionizada ($5,0 \times 10^{-9}$ mol/L) e água de torneira ($5,0 \times 10^{-9}$ mol/L) em comparação com o espectro Raman do pó da prometrina. O espectro de referência do colóide de Ag contendo água de torneira é dado na parte inferior da figura.

As principais bandas de vibração dos espectros SERS para as soluções do herbicida diluídas no colóide de Ag e o Raman convencional do pó do herbicida são realçadas por linhas tracejadas. A Figura 20 mostra a diferença no perfil (largura da banda, a forma da banda, o deslocamento Raman, as intensidades absoluta e relativa das soluções) do espectro SERS do herbicida comparado ao espectro Raman da prometrina em pó. A intensidade das bandas vibracionais dos espectros coletados em soluções de

prometrina em água deionizada e de torneira não foi tão intensa, nem definida, comparada ao SERS das soluções de água ultrapura. As impurezas presentes na água deionizada e de torneira podem adsorver nas AgNPs e impedir o contato direto das moléculas de prometrina com a superfície metálica. As bandas de melhores intensidades são encontradas na região entre 1100 e 1500 cm^{-1} , atribuídas aos modos vibracionais envolvendo o anel triazínico⁴⁶. Portanto, o anel triazínico possivelmente também desempenha um papel na adsorção sobre a superfície das AgNPs da água deionizada e de torneira. No entanto, não se podem identificar interações específicas responsáveis pela adsorção devido à grande variação na faixa de intensidades relativas, consequência das impurezas no meio.

Capítulo V

*Detecção do herbicida atrazina por
espalhamento Raman amplificado em
superfície (SERS)*

5.1. Atrazina em água ultrapura

5.1.1. Detecção de atrazina em água ultrapura

A técnica SERS foi aplicada para a detecção do herbicida atrazina dissolvido em água ultrapura (10^{-5} mol/L) e diluído até a concentração de 10^{-12} mol/L em colóide de Ag. A Figura 21 apresenta os espectros SERS obtidos para as concentrações de $5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L de atrazina diluída no colóide de Ag. Um espectro típico do colóide de Ag é mostrado como referência para a melhor identificação das bandas de vibração da atrazina.

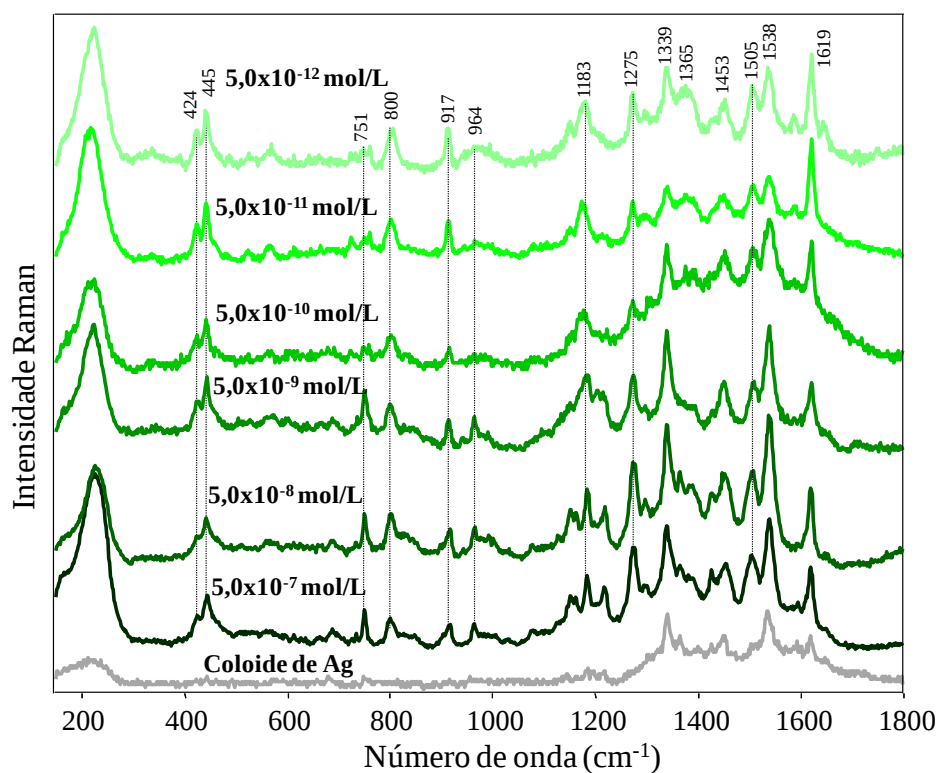


Figura 21: espectros SERS de soluções diluídas de atrazina em colóide de Ag nas concentrações $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-8}$; $5,0 \times 10^{-9}$; $5,0 \times 10^{-10}$; $5,0 \times 10^{-11}$ e $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L. O espectro do colóide de Ag é dado como referência, na parte inferior, a fim de distinguir as bandas de vibração da atrazina.

As bandas relacionadas estritamente ao SERS da atrazina foram destacadas por linhas pontilhadas na Figura 21, com as atribuições dadas na Tabela III.

As principais bandas vibracionais do espectro SERS para a solução de atrazina diluída no colóide de Ag e para o espectro Raman convencional do herbicida em pó são apresentadas na Tabela IV.

Tabela IV. Atribuições vibracionais de bandas características da atrazina^{36,38}.

Atrazina (cm⁻¹)	Atribuições
442	(deformação do anel) (vibração Cl-C) ^{95,96}
751	(CH ₂ <i>rocking</i> + CH ₃ <i>wagging</i>) ³⁶
800	(estiramento C-C + CH ₃ <i>wagging</i>) ³⁶
917	(CH ₃ <i>twisting</i>) ³⁶
964	(estiramento C-C) ^{36,38}
1183	(N-H <i>bending</i>) ³⁶
1275	(CH ₂ <i>twisting</i>) ³⁶
1339	(<i>bending</i> do grupo CH ₃ +CH+NH) ³⁶
1365	(N-H <i>bending</i>) (CH ₂ <i>wagging</i>) ³⁶
1453	(<i>bending</i> CH ₃) ³⁶
1505	(N-H <i>bending</i>) ³⁶
1610	(deformação simétrica no plano do anel C-N-H) ^{36,38}
1619	(N-H <i>bending</i> + estiramento C-N) ³⁶

A Figura 21 mostra sobreposições de bandas de 1339 a 1619 cm⁻¹ para espectros da atrazina e do colóide de Ag. De acordo com Costa *et al.*³⁶, a banda de atrazina na região espectral de 1339 cm⁻¹ é atribuída ao *bending* do grupo CH₃+CH+NH. A região em 1365 cm⁻¹ está relacionada ao *bending* dos átomos N-H e ao CH₂ *wagging*, sendo em 1619 cm⁻¹ referente aos grupos com NH *bending* + estiramento C-N. A interação da atrazina com as AgNPs foi confirmada também por Bonora *et al.*³⁸, que observaram a banda 1610 cm⁻¹ atribuída à deformação simétrica do anel, devido à vibração dos átomos C-N-H posicionados entre o radical etil e o átomo de Cl. A banda observada na região de 442 cm⁻¹ refere-se à deformação do anel e da vibração Cl-C^{96,95} mostrando que existe uma interação do herbicida com a superfície da Ag nesta região. Inclusive existe um aumento da banda em torno de 200 cm⁻¹ que é a região de vibração do N do herbicida com a Ag do colóide⁹⁷.

A adequação de SERS para distinguir as soluções de atrazina demonstradas na Figura 21 foi revelada por tratamento dos espectros SERS utilizando mapeamento Sammon⁹⁸, como mostra a Figura 22.

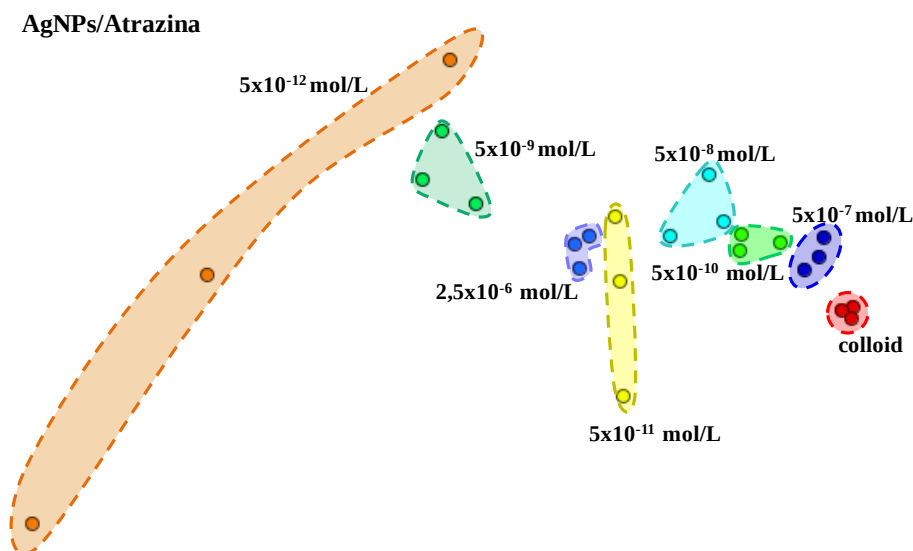


Figura 22: mapeamento Sammon dos espectros da solução de atrazina para distintas concentrações diluídas no colóide de Ag (colóide de Ag/atrazina). A figura não apresenta eixos porque neste mapeamento o que interessa é a distância relativa entre os pontos dos dados. Amostras mais semelhante estão mais próximas (e distintas estão distantes).

A Figura 22 mostra uma maior dispersão nos círculos para menores concentrações ($5,0 \times 10^{-12}$ mol/L, em especial) que é explicado pelas alterações no perfil dos espectros SERS (largura e forma da banda, centro da banda, e intensidades absolutas e relativas) para as amostras mais diluídas. Observa-se tal variação espectral SERS, por exemplo, nas experiências de detecção de única molécula⁷⁸. A concentração detectada de $5,0 \times 10^{-12}$ mol/L estima-se haver 3 moléculas de atrazina por picolitro (10^{-12} L) igual o resultado obtido para a prometrina (capítulo IV)^{79,80}. Na literatura, poucos trabalhos foram publicados sobre a detecção de atrazina por SERS^{36,37}, sendo no nosso trabalho³⁹ reportada a menor concentração já detectada. Nas referências [36] e [38], o objetivo principal foi determinar como a atrazina é adsorvida nas superfícies de nanopartículas sob diferentes condições experimentais. As concentrações de atrazina

utilizadas foram de 10^{-7} mol/L e no intervalo de ppm ($2,5 \times 10^{-10}$ mol/L), respectivamente. Carrillo-Carrion *et al.*³⁷, utilizando as técnicas de cromatografia acoplada e SERS para experiências de detecção de pesticida, conseguiram chegar ao limite de detecção de 0,9 $\mu\text{mol/L}$ para a atrazina realizando curvas analíticas por cromatografia.

5.1.2. Adsorção da atrazina no colóide de Ag

A Figura 23 mostra o espectro SERS da solução de atrazina diluída no colóide de Ag com concentração final de $5,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Na mesma figura é apresentado o espectro SERS do filme *cast* de solução de atrazina diluída no colóide de Ag. Por fim, é apresentado o espectro Raman da atrazina em pó.

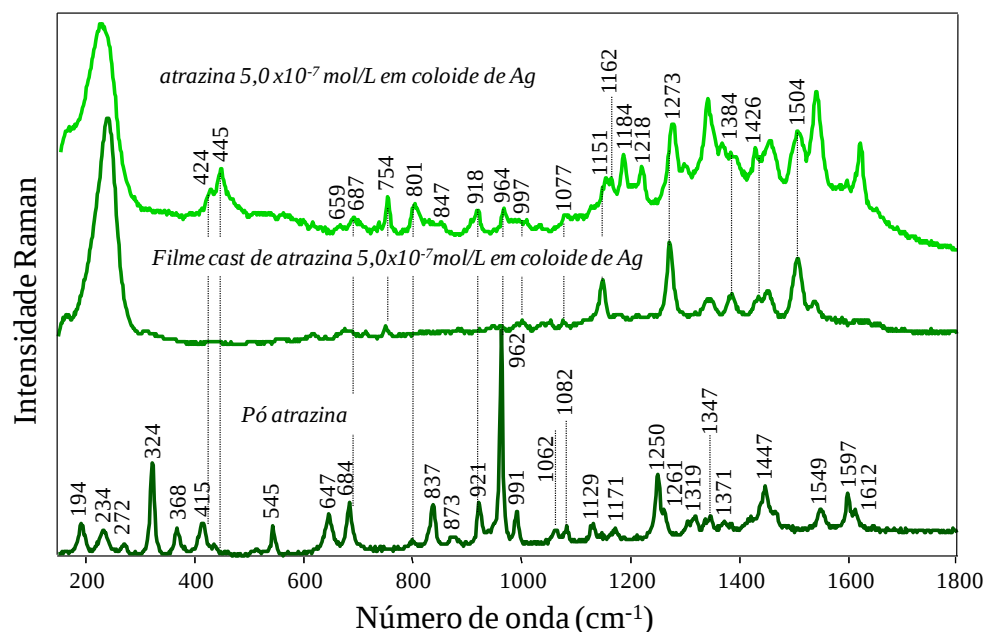


Figura 23: espectros SERS da solução de atrazina diluída no colóide de Ag, sendo a concentração final do herbicida em $5,0 \times 10^{-7}$ mol/L. Filme *cast* da mesma solução de atrazina diluída no colóide de Ag. O espectro Raman de atrazina em pó é obtido como referência.

A Figura 23 mostra a diferença do espectro SERS da atrazina comparado ao Raman do pó do herbicida. Os mesmos fatores (i, ii, iii e iv) que afetam o espectro SERS da prometrina (capítulo IV, seção 4.1.2.) podem afetar os espectros SERS da atrazina. A Figura 23 mostra uma maior quantidade de bandas para o espectro obtido em colóide de Ag ($5,0 \times 10^{-7}$ mol/L) comparado ao espectro do filme *cast*. Isto indica que a escolha do substrato (colóide ou filme *cast*) quando se deseja obter o sinal do analito é importante³⁶.

Em relação à adsorção da atrazina no colóide de Ag, os trabalhos de Costa *et al.*³⁶ e Bonora *et al.*³⁸ mostraram que o grupo isopropílico da molécula de atrazina provoca um impedimento estérico, evitando sua adsorção às AgNPs por esta região da molécula. Neste trabalho de mestrado, foi proposto o mesmo mecanismo de adsorção do herbicida atrazina sobre as AgNPs via átomo de N entre o radical etil e o átomo de Cl.

A hipótese de adsorção da atrazina nas AgNPs mostrado na Figura 24 foi estabelecida pelas interações relatadas na Figura 21.

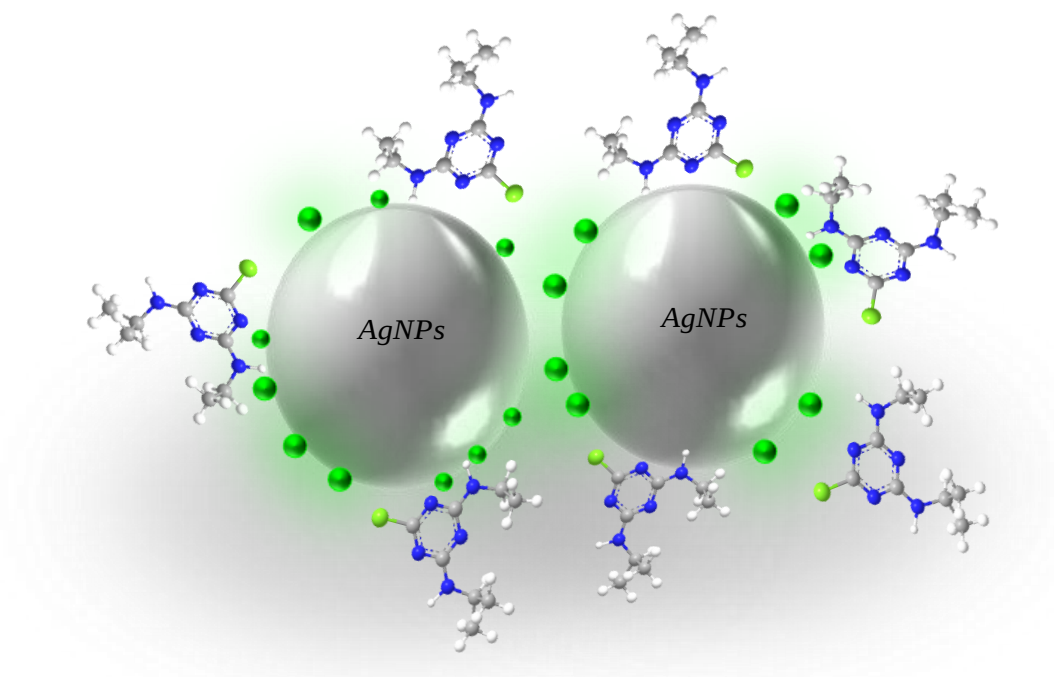


Figura 24: ilustração do mecanismo proposto para a adsorção do herbicida atrazina nas AgNPs via átomos de N (azul), entre o radical etil e o átomo de Cl (verde).

5.2. Atrazina em água deionizada

A Figura 25 apresenta os espectros SERS obtidos para as concentrações $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-9}$ e $5,0 \times 10^{-11}$ mol/L de atrazina em água deionizada diluída no colóide de Ag (sintetizado com água ultrapura). Um espectro típico do colóide de Ag com uma adição de alíquota de água deionizada é mostrado como referência para permitir a melhor identificação das bandas de vibração da atrazina.

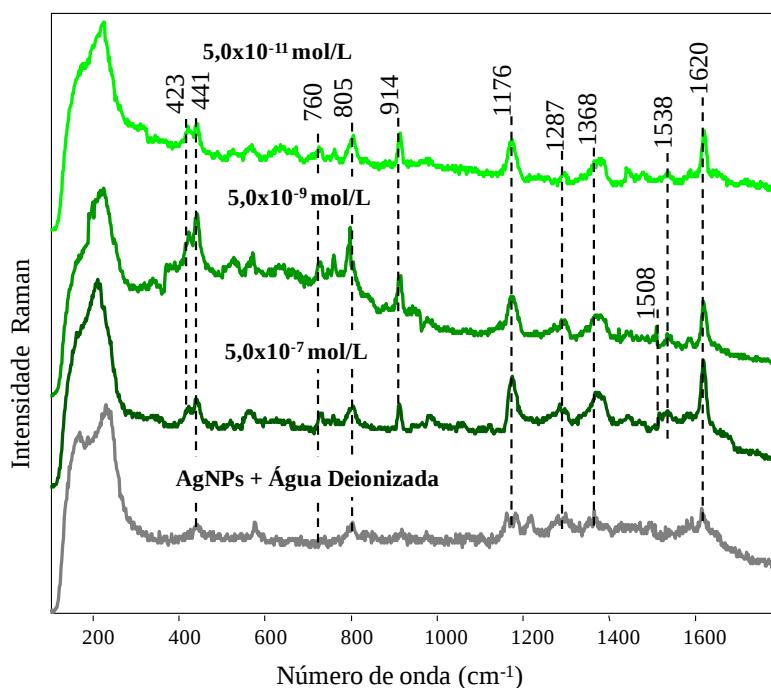


Figura 25: espectros SERS obtidos para solução de atrazina em água deionizada diluída em colóide de Ag nas concentrações de $5,0 \times 10^{-7}$; 5×10^{-9} e 5×10^{-11} mol/L. O espectro do colóide de Ag com uma adição de alíquota de água deionizada é mostrado na parte inferior.

A Figura 25 apresenta algumas sobreposições de bandas do herbicida atrazina com o colóide de Ag. Esta síntese do colóide de Ag foi obtida depois da realização do estudo de atrazina dissolvida no colóide de Ag com água ultrapura, sendo distinta das sínteses apresentadas no capítulo III e IV. As bandas observadas no espectro Raman do colóide de Ag na parte inferior da Figura 25 são possivelmente das impurezas da água deionizada⁵². Os espectros SERS para o herbicida em água deionizada não apresentaram a mesma amplificação do sinal do analito comparados ao SERS do herbicida em água

ultrapura para concentrações mais diluídas (Figura 21). Devido a dificuldade de identificar as ligações da atrazina, não foi possível determinar as interações específicas responsáveis pela adsorção do analito nas AgNPs. Isto é observado devido à grande variação nas intensidades de banda relativa que é uma consequência das impurezas no meio. Neste caso (colóide de Ag/atrazina em água deionizada) não se pode deduzir a orientação da molécula sobre a superfície das AgNPs porque as impurezas dificultam o contato direto da molécula com a superfície das AgNPs. Neste caso da água deionizada, a piora foi em relação à intensidade e larguras das bandas, havendo um aumento de ruído e diminuindo a intensidade relativa, o que pode ser explicado pela dificuldade da adsorção da atrazina na superfície das AgNPs em virtude da competição do herbicida atrazina contra as impurezas da água. Este resultado também é observado no capítulo IV (seção 4.2) para os colóides de Ag com água deionizada e de torneira referente ao herbicida prometrina.

Os espectros SERS de atrazina em água deionizada também foram analisados via técnica de projeção^{44,46}. A Figura 26 mostra resultados de *clusters* dos espectros SERS que foram tratados pela técnica Sammon para distintas soluções de atrazina.

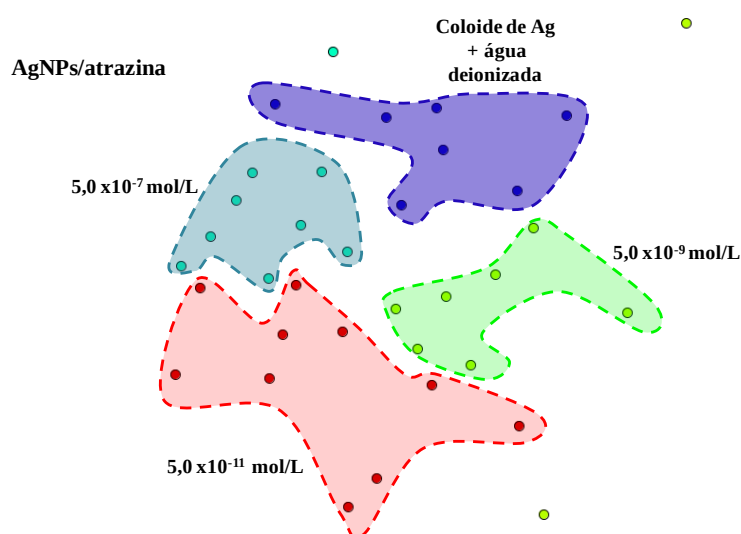


Figura 26: mapeamento Sammon dos espectros SERS das soluções de atrazina em água deionizada para distintas concentrações ($5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-9}$ e $5,0 \times 10^{-11}$ mol/L) diluídas no colóide de Ag.

A Figura 26 mostra a separação das concentrações $5,0 \times 10^{-7}$; $5,0 \times 10^{-9}$ e $5,0 \times 10^{-11}$ mol/L. No entanto, os círculos dentro dos *clusters* para as mesmas concentrações possuem uma dispersão maior que o resultado obtido para o sistema de detecção da atrazina em água ultrapura (Figura 22). Essa maior dispersão dos círculos dentro dos *clusters* tem relação com as variações nos espectros SERS (Figura 25), resultado das impurezas encontradas na água deionizada⁵².

O resultado obtido para a detecção da atrazina em amostras próximas a real foi a menor já detectada via SERS. No entanto, os espectros SERS da solução de atrazina em água de torneira não foram possíveis para nenhuma concentração. Isto, provavelmente, se deve ao alto teor de impurezas presentes na água de torneira e ao fato de haver uma competição entre a atrazina e as impurezas pela superfície da Ag, estando impurezas em maior quantidade. No entanto, foi possível obter os espectros SERS da prometrina nesse sistema de água de torneira (Cap IV). Isto se deve porque o efeito estérico causado pelas cadeias alifáticas da prometrina com a Ag é menor comparado ao da atrazina.

Capítulo VI

*Detecção dos herbicidas atrazina e
prometrina por espectroscopia de
impedância*

6.1. Crescimento do filme LbL de PAH/AgNPs

O crescimento do filme LbL de PAH/AgNPs foi monitorado via espectroscopia de extinção no UV-Vis. A Figura 27 mostra os espectros de extinção no UV-Vis para o crescimento do filme LbL de PAH/AgNPs. A dependência linear da extinção em 405 nm em função do número de bicamadas depositadas é mostrada no *inset* da Figura 27a. A Figura 27b mostra os espectros de extinção com *zoom* na região de 600 a 1000 nm com um *inset* da área (integral) em função do número de bicamadas.

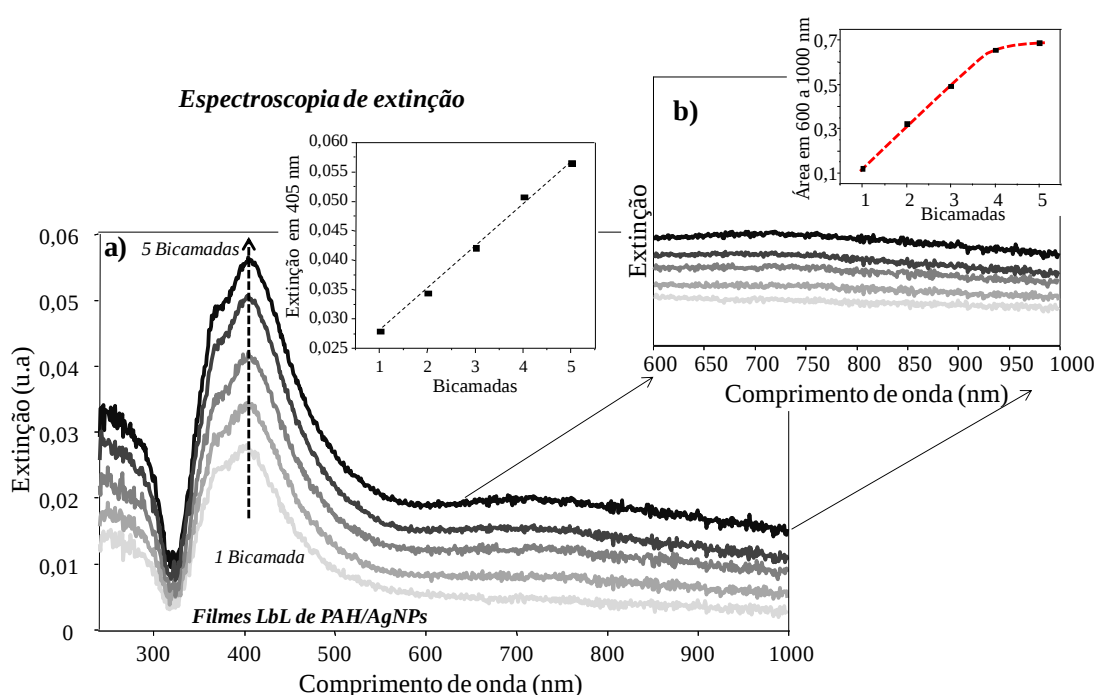


Figura 27: espectros de extinção do filme LbL de PAH/AgNPs contendo 5 bicamadas. O *inset* mostra a dependência linear da extinção em 405 nm em função do número de bicamadas depositadas. b) Espectros de extinção com *zoom* na região de 600 a 1000 nm e um *inset* da área em função do número de bicamadas.

A dependência linear do número de bicamadas depositadas em função da absorbância (*inset*) revela que quantidades semelhantes de AgNPs são adsorvidas em PAH por bicamadas depositada, levando assim a um crescimento controlado dos filmes LbL (Figura 27a). A Figura 27b mostra um aumento da área para região de 600 a 1000 nm. O *inset* da Figura 27b mostra que há um aumento da área de acordo com o número

de bicamadas, no entanto, ao atingir 5 bicamadas o aumento da área é menos significativo. A crescente área sugere que as AgNPs estão se agregando, segundo Aroca *et al.*^{20,47} o aumento na região de elevados comprimentos de onda são atribuídos a absorção por plasma de superfície do modo dipolo, e partículas agregadas^{20,47,64}. Isto sugere que neste trabalho de mestrado as NPs estão se agregando no filme LbL de PAH/AgNPs.

6.2. Aplicação do filme LbL como unidade sensorial na detecção dos herbicidas atrazina e prometrina

A combinação de eletrodos interdigitados, filmes ultrafinos, e espectroscopia de impedância é uma abordagem bem estabelecida para detectar traços de diferentes analitos, incluindo poluentes da água^{99,100}. Como uma abordagem complementar, o desempenho dos filmes LbL de PAH/AgNPs como transdutores em unidades sensoriais foi verificado por imersão em soluções aquosas contendo atrazina ou prometrina em diferentes concentrações. Além das 5 bicamadas do filme LbL de PAH/AgNPs, as unidades sensoriais foram compostas por um eletrodo interdigitado de Pt (*bare*).

As Figuras 28a, b, c e d mostram medidas de capacitância em função da frequência realizadas em tensão alternada para os eletrodos de Pt *bare* (Figura 28a e 28b) e recobertos com 5 bicamadas de filmes LbL de PAH/AgNPs (28c e 28d), ambos os eletrodos foram imersos em soluções de diferentes concentrações de atrazina ou prometrina.

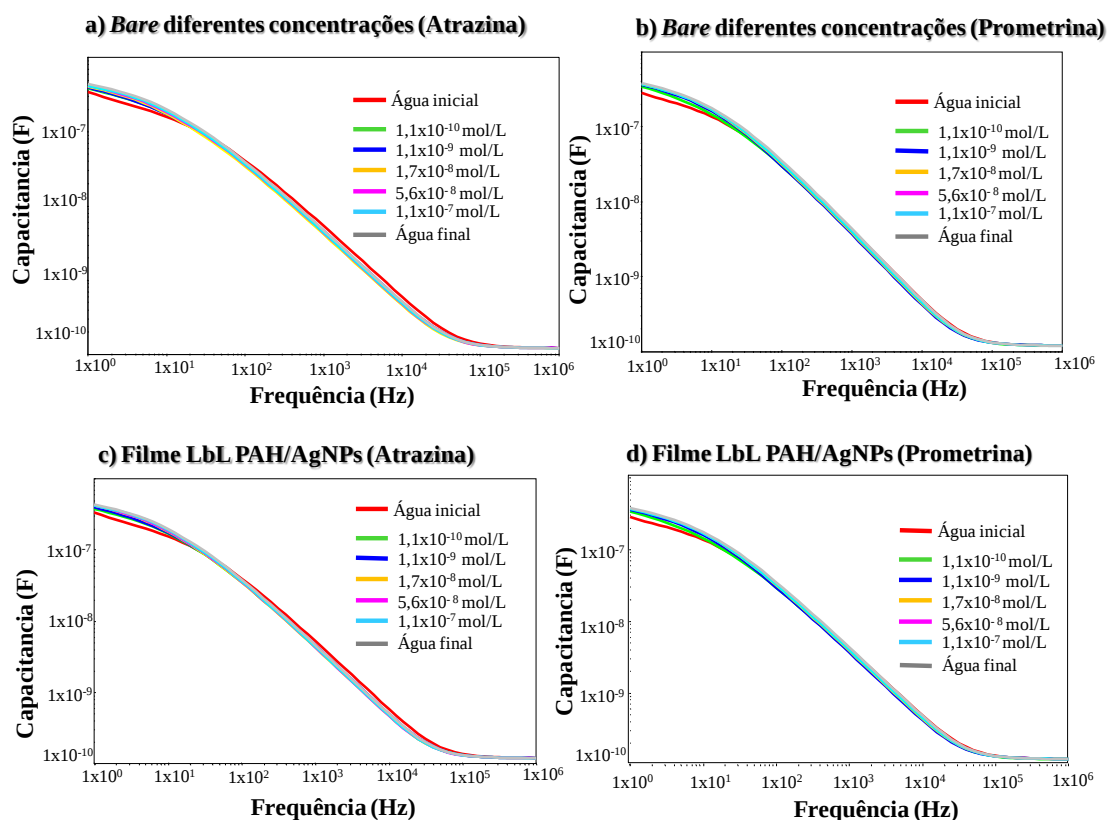


Figura 28: espectroscopia de impedância (capacitância em função da frequência) em eletrodo interdigitado de Pt (*bare*) imersos em diferentes concentrações de a) atrazina e b) prometrina. Filme LbL de PAH/AgNPs imersos em soluções de c) atrazina e d) prometrina.

Uma inspeção visual não permite inferir se as unidades sensoriais conseguem distinguir as amostras em diferentes concentrações de atrazina ou prometrina, no entanto, podemos recorrer à análise por meio de métodos computacionais. As Figuras 29a e 29b mostram medidas de capacitância em função da frequência por meio da técnica de projeção multidimensional IDMAP.

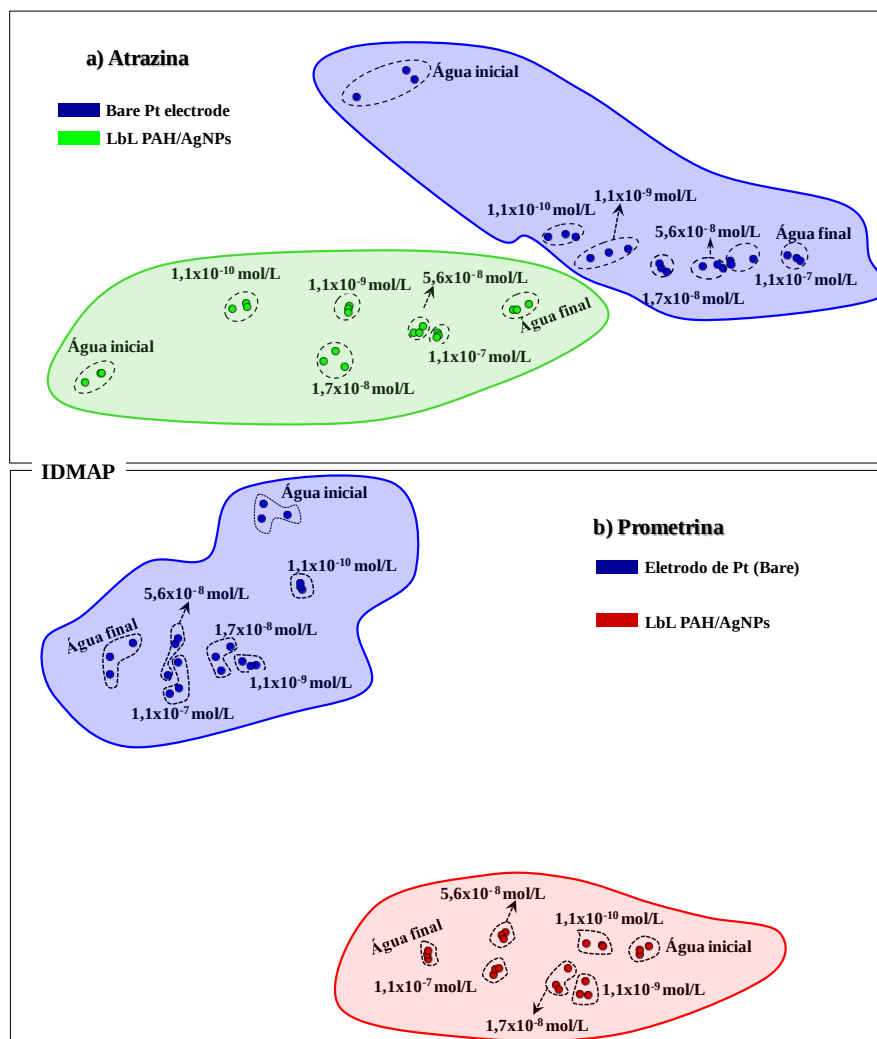


Figura 29: projeção IDMAP para as medidas de impedância obtidas em diferentes concentrações de soluções de a) atrazina e b) prometrina ($1,1 \times 10^{-10}$, $1,1 \times 10^{-9}$, $1,7 \times 10^{-8}$, $5,6 \times 10^{-8}$ e $1,1 \times 10^{-7}$ mol/L), a partir das diferentes unidades sensoriais identificadas pelas cores destacadas.

Os dados para as duas unidades sensoriais (eletrodo de Pt *bare*, filmes LbL PAH/AgNPs em atrazina e prometrina) são combinados para uma análise de projeção. A técnica IDMAP foi usada para identificar a contribuição de cada unidade de detecção pela sua capacidade de distinção. A cor dos círculos indica a unidade de sensor que está na legenda das Figuras 29a e 29b com as concentrações mostradas ao lado de cada círculo na projeção. Portanto, as Figuras 29a e 29b nos permitem a visualização direta do desempenho de cada unidade sensorial. O eletrodo de Pt (*bare*) está posicionado distante da outra unidade de detecção, confirmando que a modificação introduzida pelo

filme LbL de PAH/AgNPs nos eletrodos de Pt é significativa. O filme PAH/AgNPs mostra que há a separação dos *cluster* das distintas concentrações de atrazina (Figura 29a) e prometrina (Figura 29b) alcançando uma separação até a concentração de $1,1 \times 10^{-10}$ mol/L. Não há sobreposições de *clusters* do filme LbL de PAH/AgNPs nas distintas concentrações. A projeção para o eletrodo de Pt *bare* também mostrou que existe a separação dos *clusters* nas distintas concentrações, porém, relativamente com menor capacidade de classificação destes *clusters*.

Uma informação a ser destacada é que as medidas com água ultrapura ao fim dos experimentos indicaram que as unidades sensoriais foram afetadas pelas medições, não coincidindo os *clusters* de dados de "água final" com os da "água inicial". Portanto, embora a adição de pequenas alíquotas das soluções de atrazina ou prometrina para aumentar a concentração leve a mudanças na resposta elétrica, correspondendo assim a uma alta sensibilidade, tais mudanças são irreversíveis. Este mesmo padrão foi observado em trabalhos semelhantes com outros analitos^{80,99}, mostrando que adsorção irreversível sobre os filmes LbL pode ocorrer, não sendo removidas nos procedimentos de lavagem. Em Aoki *et al.*⁸⁰, a adsorção irreversível sobre os filmes LbL foi confirmada com experiências de SERS. Esta confirmação não foi possível neste trabalho de mestrado porque o sinal SERS para a os filmes LbL foi insignificante. Outra possibilidade, não testada neste trabalho, é que a sequência de medidas alternadas e a própria imersão do sensor em meio aquoso podem afetar a estrutura do filme LbL depositado sobre o eletrodo (espessura, morfologia, organização molecular, etc.).

Capítulo VII

Conclusões

Colóide: os espectros SERS deste trabalho de mestrado foram obtidos através de colóides de Ag (nitrato de Ag) sintetizados com hidroxilamina (agente redutor). As nanopartículas de prata (AgNPs) revelaram-se esféricas (preferencialmente) e da mesma ordem de tamanho (diâmetro em torno de 50 nm) que as sintetizadas com citrato (agente redutor), pois o colóide de Ag com hidroxilamina apresentou *plasmon* na região de comprimento de onda de NPs sintetizadas com citrato (417 nm). Medidas de MEV do filme *cast* do colóide de Ag reduzido com hidroxilamina são consistentes com estas características de forma e tamanho. Em relação a carga superficial das AgNPs (potencial zeta), o valor foi de -27,4 mV, próximo do limite inferior adequado para a estabilidade do colóide, não sendo observada a precipitação da Ag.

Deteção/prometrina: a concentração de prometrina detectada neste trabalho de mestrado (10^{-12} mol/L) foi a menor já conseguida para soluções de prometrina em água ultrapura, aproximando-se dos níveis de única molécula. Em um sistema mais próximo ao real, foi detectado o herbicida diluído em coloide de Ag com água deionizada e de torneira até a concentração de 10^{-9} mol/L. Portanto, mesmo no pior cenário representado por soluções com água de torneira, é possível detectar concentrações de prometrina até uma ordem de grandeza abaixo do limite permitido para a água potável. A ferramenta computacional IDMAP (visualização da informação) revelou-se bastante útil na análise (classificação) dos espectros SERS.

Mecanismo de adsorção Ag/prometrina: as moléculas de prometrina devem estar preferencialmente adsorvidas nas AgNPs através átomo de S e com o anel triazínico posicionado paralelo à superfície das AgNPs. Isto foi observado, principalmente, pelo surgimento no espectro SERS da banda em 615 cm^{-1} , a qual é atribuída ao estiramento C-S. Em relação à orientação do anel triazínico, a banda mais intensa do espectro Raman para o pó do herbicida é em 970 cm^{-1} (respiração do anel), entretanto esta banda

diminuiu drasticamente no espectro SERS do herbicida. Em relação a adsorção da prometrina nas AgNPs em sistemas de água deionizada e de torneira, não foram identificadas interações específicas responsáveis pela adsorção devido à grande variação na faixa de intensidades relativas, consequência das impurezas no meio.

Detecção/atrazina: a atrazina foi detectada em água ultrapura através da técnica SERS em concentrações da ordem de 10^{-12} mol/L, conseguindo boa relação sinal/ruído nos espectros. A atrazina também foi detectada via SERS em sistemas de água deionizada até a concentração de 10^{-11} mol/L, porém não foi observada boa relação sinal/ruído nos espectros. A combinação de SERS com métodos de visualização de informação foi aplicada com êxito para diferenciar concentrações de atrazina em água ultrapura e deionizada, sendo que em água de torneira não foi obtido sinal SERS.

Mecanismo de adsorção Ag/atrazina: a adsorção da atrazina no colóide de Ag ocorre pelo átomo de N posicionado entre o radical etil e o átomo de Cl. Esta interação foi confirmada observando a banda em 1610 cm^{-1} atribuída à deformação simétrica do anel (vibração dos átomos C-N-H posicionados entre o radical etil e o átomo de Cl) e a banda na região de 442 cm^{-1} referente à deformação do anel e da vibração Cl-C. Existe ainda um aumento da banda em torno de 200 cm^{-1} que é a região de vibração do N do herbicida com a Ag do colóide. No caso da água deionizada não foi possível determinar interações específicas responsáveis pela adsorção do analito nas AgNPs. Isto é consequência da grande variação nas intensidades relativas das bandas SERS em virtude das impurezas no meio que dificultam o contato direto da molécula de atrazina com a superfície das AgNPs.

Detecção de atrazina e prometrina via espectroscopia de impedância: atrazina e prometrina foram detectadas via espectroscopia de impedância, tendo como elemento transdutor de sinal filmes LbL de PAH/AgNPs depositados em eletrodos interdigitados.

O filme PAH/AgNPs conseguiu separar os *cluster* das distintas concentrações de atrazina e prometrina até a concentração de $1,1 \times 10^{-10}$ mol/L. Os métodos de visualização de informação foram aplicados com êxito para diferenciar as concentrações das curvas de capacitância em função da frequência.

Capítulo VIII

Considerações finais

Esta dissertação de mestrado apresenta resultados a partir das atividades realizadas no período de março/2014 a Julho/2016 referente ao projeto de mestrado financiado pela Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP processo nº 2014/16693-8. Este projeto desenvolvido em 30 meses para a defesa aborda a detecção dos herbicidas atrazina, prometrina. Os resultados deste trabalho proporcionaram submeter um artigo logo no início deste mestrado, o qual foi aceito para a publicação na revista *Colloid and Polymer Science* e intitulado “*Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization*”. Esse artigo serviu como base para aperfeiçoar o estudo de pesticidas com a técnica de *Surface Enhanced Raman Scattering* (SERS). Esse aperfeiçoamento foi verificado no trabalho intitulado “*Probing trace levels of prometryn solutions: from test samples in the lab toward real samples with tap water*” o qual foi submetido para a revista *Journal of Materials Science*, em que conseguimos avançar estudando sistemas mais próximos ao real. Além das atividades desenvolvidas na dissertação de mestrado, foram desenvolvidas colaborações com outros professores, conseguindo a realização de dois artigos intitulados, “*Structural and Electrochemical Properties of Lutetium Bis-Octachloro-Phthalocyaninate Nanostructured Films. Application as Voltammetric Sensors*” e “*Formação de nanopartículas de ouro em filmes de PVDF/Ouro*”. Os Trabalhos descritos proporcionaram a participação em congressos nacionais e internacionais. Abaixo é apresentada a produção científica durante o período do mestrado, até a defesa do mestrado.

Artigos:

- (a) Rubira, R. J. G.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Paulovich, F.V.; Oliveira Jr., O. N.; Constantino, C. J. L. *Probing trace levels of prometryn solutions: from test samples in the lab toward real samples with tap water*. Journal of Materials Science, 2015. DOI:10.1007/s10853-015-9628-2.
- (b) Rubira, R. J. G.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Maximino, M. D.; Aléssio, P.; Martin, C. S.; Oliveira Jr., O. N.; Fatore, F. M.; Paulovich, F. V.; Constantino, C. J. L. *Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization*. Colloid and Polymer Science, 2014. DOI 10.1007/s00396-014-3332-7.
- (c) Alessio, P.; Apetrei, C.; Rubira, R. J. G.; Constantino, C. J. L.; Medina-Plaza, C.; De Saja, J. A.; Rodríguez-Méndez, M. L. *Structural and Electrochemical Properties of Lutetium Bis-Octachloro-Phthalocyaninate Nanostructured Films. Application as Voltammetric Sensors*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2014. DOI 10.1166/jnn.2014.9355.
- (d) Morais, A. J. O.; Cardoso, C. X.; Agostini, D. L. S.; Rubira, R. J. G.; Albas, A. E. S. *Formação de nanopartículas de ouro em filmes de PVDF/Ouro*. Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo, 2014. ISSN 1518-9082.

Congressos:

- a) Rubira, R.J.G.; Camacho, S.A.; Aoki, P.H.B.; Maximino, M.D.; Alessio. P.; Martin, C.S.; Oliveira Jr, O.N.; Fatore, F. M.; Paulovich, F.V.; Constantino, C.J.L. *Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization*. In: Encontro Anual do Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica (INEO/CNPq), 2014, Nazaré Paulista-SP, Brasil.

- b) Rubira, R. J. G.; Camacho, S. A.; Aoki, P. H. B.; Maximino, M. D.; Aléssio, P.; Martin, C. S.; Oliveira Jr., O. N.; Fatore, F. M.; Paulovich, F. V.; Constantino, C. J. L. *Herbicide detection using surface-enhanced Raman scattering and impedance spectroscopy*. In: XIII Encontro da SBPMat, 2014, João Pessoa-PB, Brasil.
- c) Cardoso, C. X.; Agostini, D. L. S.; Rubira, R. J. G.; Albas, A., Teixeira, R.S. *Preparation of nanocomposites of PVDF/AuCl₃: formation of gold nanoparticles*. In: XIII Encontro da SBPMat, 2014, João Pessoa-PB, Brasil.
- d) Morais, A. J. O., Cardoso, C. X.; Agostini, D. L. S.; Rubira, R. J. G.; Albas, A. *Formação de nanopartículas de ouro em filmes de PVDF/Ouro*. CICFAI, Congresso de Iniciação Científica das Faculdades Adamantinense Integradas, 2014, Adamantina-SP, Brasi.
- e) Rubira, R. J. G.; Constantino, C. J. L.; Sanchez-Cortes, S. *Detection of pesticide with plasmonic nanoparticles functionalized with humic substances of different origins giving rise to huge Surface-Enhanced Raman Signals*. ICAVS-8, International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy, 2015, Vienna, Austria.

Durante a realização deste mestrado foi possível estabelecer parcerias com outros pesquisadores que colaboraram de forma com que os objetivos deste trabalho fossem alcançados. Os pesquisadores são o *Dr. Osvaldo N. Oliveira Jr* do Instituto de Física de São Carlos (IFS) da USP/São Carlos, o *Dr Fernando V. Paulovich* do Instituto de Ciências Matemáticas e da Computação da USP/São Carlos e o Dr. Santiago Sanchez-Cortez do Instituto de Estrutura da Matéria (IEM) de Madri/Espanha. A colaboração com o Dr. Santiago Sanchez-Cortez se deu a partir de um convite para a

realização de estágio em seu grupo de pesquisa, o qual foi realizado no período de 11 de Março a 10 de Setembro (documento anexado ao final da dissertação), sendo financiado pela FAPESP processo nº 2014/16693-8. O estágio de seis meses proporcionou o aperfeiçoamento no estudo de detecção de pesticidas através da técnica SERS. Estudando distintas sínteses de nanopartículas e também como ocorre a interação dos herbicidas com substâncias húmicas. Concluindo, foi realizado um estudo em que mostrou a sensível degradação destes pesticidas da família dos triazínicos (atrazina e prometrina) juntamente com cálculos teóricos dos mesmos. Além das atividades proposta pelo projeto, foi realizada uma atividade extra com a participação em uma feira científica em Madri, divulgando o trabalho do IEM.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD

CSIC
INSTITUTO DE ESTRUCTURA
DE LA MATERIA (IEM)

Mr. Rafael Jesus Gonçalves Rubira
UNESP
Presidente Prudente
Brazil

Madrid, 12th September 2014.

It is a pleasure for me inviting you to stay in the *Instituto de Estructura de la Materia* (IEM) of *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC) in Madrid from March 11th to September 10th of 2015. During this period of time in our institute, you will conduct an investigation dealing with the development of a sensor system based on Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) of pollutants with high interest in the environment.

It is mandatory to have a Medical and an Accident Assurance covering all your staying period in the IEM-CSIC.

Sincerely yours,

Dr. Santiago Sánchez Cortés
Investigador Científico del IEM-CSIC

Director Approval

Guillermo Mena Marugán
Director of the IEM-CSIC

Referências

1. IBGE. <http://www.brasildefato.com.br/node/27795>. (2015).
2. Ben-Zur, R., Hake, H., Hassoon, S., Bulatov, V. & Schechter, I. Optical analytical methods for detection of pesticides. *Rev. Anal. Chem.* **30**, (2011).
3. Alloway, B. J. & Ayres, D. C. *Chemical Principles of Environmental Pollution*. (Blackie Academic Professional, 1997).
4. Galli, A. *et al.* Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Quim. Nova* **29**, 105–112 (2006).
5. Zappe, M. E. F. B. e J. A. A Química dos Agrotóxicos. *Química Nov. na Esc.* **Vol. 34, N**, 10–15 (2012).
6. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos . **2014**,
7. Instituto Nacional de Câncer - INCA- http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/comunicacaoinformacao/site/home/namidia/brasile-_O_pais_que_mais_consoma_agrotoxicos_no_mundo. (2016).
8. SINITOX_Sistema nacional de Informações Tóxico farmacológicas.
9. Coutinho, C. F. B. *et al.* Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pestic. Ecotoxicologia e Meio Ambient.* **15**, 65–72 (2005).
10. Belden, J. B., Hanson, B. R., McMurry, S. T., Smith, L. M. & Haukos, D. A. Assessment of the Effects of Farming and Conservation Programs on Pesticide Deposition in High Plains Wetlands. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 3424–3432 (2012).
11. Knauert, S., Escher, B., Singer, H., Hollender, J. & Knauer, K. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 6424–6430 (2008).
12. Prade, L., Huber, R. & Bieseler, B. Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase - explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Struct. with Fold. Des.* **6**, 1445–1452 (1998).
13. Agência de defesa agropecuária do Paraná- <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/GESAGARD>. (2015).
14. Kucka, M., Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Stojilkovic, S. S. & Kovacevic, R. Atrazine acts as an endocrine disrupter by inhibiting cAMP-specific phosphodiesterase-4. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **265**, 19–26 (2012).

15. Rusiecki, J. A. *et al.* Cancer incidence among pesticide applicators exposed to atrazine in the agricultural health study. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 1375–1382 (2004).
16. Chen, F. *et al.* Degradation behaviour of methamidophos and chlorpyrifos in apple juice treated with pulsed electric fields. *Food Chem.* **112**, 956–961 (2009).
17. Fleischmann, M., Hendra, P. J. & McQuillan, A. J. Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163–166 (1974).
18. Jeanmaire D. L., D. R. P. Van. Surface Raman electrochemistry. Part 1. Heterocyclic, aromatic and aliphatic amines adsorbed on the anodised silver electrode. *J. Electroanal. Chem* **84**, 1–20 (1977).
19. Van, D. R. P. Laser excitation of Raman scattering from adsorbed molecules on electrode surfaces. *Chem. Biochem. Appl. Lasers* **4**, 101–185 (1979).
20. R Aroca. *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. (John Wiley & Sons Ltd: Chichester ed: Toronto, 2006).
21. Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy (and related plasmonic effects)*. (Elsevier, 2009).
22. Dean, J. R., Wade, G. & Barnabas, I. J. Determination of triazine herbicides in environmental samples. *J. Chromatogr. A* **733**, 295–335 (1996).
23. Frank, K. W., Gaussoin, R. E., Fry, J. D., Frost, M. D. & Baird, J. H. Nitrogen, phosphorus, and potassium effects on seeded buffalograss establishment. *Hortscience* **37**, 371–373 (2002).
24. Preparo e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como sistema carreador conjunto para os herbicidas atrazina e simazina visando futuras aplicações em agricultura. *Ciências Ambient.* (2015).
25. Abate, G. Propriedades de complexação e adsorção de partículas de interesse ambiental na presença e ausência de ácido húmico. 1. adsorção de Cd(II) e Pb(II) em vermiculita. 2. adsorção de atrazina e metabólitos em solo. *Inst. Química* (2003).
26. Kuklennyik, Z., Panuwet, P., Jayatilaka, N. K., Pirkle, J. L. & Calafat, A. M. Two-dimensional high performance liquid chromatography separation and tandem mass spectrometry detection of atrazine and its metabolic and hydrolysis products in urine. *J. Chromatogr. B-Analytical Technol. Biomed. Life Sci.* **901**, 1–8 (2012).
27. Bono, L. & Magi, E. Fast and Selective Determination of Pesticides in Water by

- Automated On-Line Solid Phase Extraction Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Lett.* **46**, 1467–1476 (2013).
28. Lippolis, M. T. & Concialini, V. Differential pulse polarographic-determination of the herbicides atrazine, prometryne and simazine. *Talanta* **35**, 235–236 (1988).
 29. Tolcha, T., Merdassa, Y. & Megersa, N. Low-density extraction solvent based solvent-terminated dispersive liquid-liquid microextraction for quantitative determination of ionizable pesticides in environmental waters. *J. Sep. Sci.* **36**, 1119–1127 (2013).
 30. dos Santos, L. B. O., Silva, M. S. P. & Masini, J. C. Developing a sequential injection-square wave voltammetry (SI-SWV) method for determination of atrazine using a hanging mercury drop electrode. *Anal. Chim. Acta* **528**, 21–27 (2005).
 31. Guse, D., Bruzek, M. J., DeVos, P. & Brown, J. H. Electrochemical reduction of atrazine: NMR evidence for reduction of the triazine ring. *J. Electroanal. Chem.* **626**, 171–173 (2009).
 32. Dai, C., Feng, B., Cheng, Y., Ding, Y. & Fei, J. Direct Electrochemistry of Cytochrome P450 Enzyme in Polyethylene Glycol-Acetylene Black Composite Film and Its Application for the Determination of Atrazine. *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* **5**, 677–683 (2013).
 33. Svorc, L., Rievaj, M. & Bustin, D. Green electrochemical sensor for environmental monitoring of pesticides: Determination of atrazine in river waters using a boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B-Chemical* **181**, 294–300 (2013).
 34. United States Environmental Protection Agency (USEPA). **2014**, Pesticides EPA 738-R-95-033
 35. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_atrazine.pdf. (2015).
 36. Costa, J. C. S., Ando, R. A., Camargo, P. H. C. & Corio, P. Understanding the Effect of Adsorption Geometry over Substrate Selectivity in the Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Simazine and Atrazine. *J. Phys. Chem. C* **115**, 4184–4190 (2011).
 37. Carrillo-Carrion, C., Simonet, B. M., Valcarcel, M. & Lendl, B. Determination of pesticides by capillary chromatography and SERS detection using a novel Silver-Quantum dots ‘sponge’ nanocomposite. *J. Chromatogr. A* **1225**, 55–61 (2012).

38. Bonora, S. *et al.* Raman and SERS study on atrazine, prometryn and simetryn triazine herbicides. *J. Mol. Struct.* **1040**, 139–148 (2013).
39. Rubira, R. J. G. *et al.* Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization. *Colloid Polym. Sci.* **292**, 2811–2820 (2014).
40. Aoki, P. H. B., Furini, L. N., Alessio, P., Aliaga, A. E. & Constantino, C. J. L. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) applied to cancer diagnosis and detection of pesticides, explosives, and drugs. *Rev. Anal. Chem.* **32**, 55–76 (2013).
41. Xie, Y. *et al.* Establishment of rapid detection method of methamidophos in vegetables by surface enhanced Raman spectroscopy. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 1091–1098 (2012).
42. Liu, B. *et al.* Detection of Pesticides in Fruits by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Coupled with Gold Nanostructures. *Food Bioprocess Technol.* **6**, 710–718 (2013).
43. Canamares, M. V, Garcia-Ramos, J. V, Gomez-Varga, J. D., Domingo, C. & Sanchez-Cortes, S. Comparative study of the morphology, aggregation, adherence to glass, and surface-enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticles prepared by chemical reduction of Ag⁺ using citrate and hydroxylamine. *Langmuir* **21**, 8546–8553 (2005).
44. Oliveira Jr., O. N., Pavinatto, F. J., Constantino, C. J. L., Paulovich, F. V & de Oliveira, M. C. F. Information Visualization to Enhance Sensitivity and Selectivity in Biosensing. *Biointerphases* **7**, (2012).
45. Tejada, E., Minghim, R. & Nonato, L. G. On Improved Projection Techniques to Support Visual Exploration of Multi-Dimensional Data Sets. *Inf. Vis.* **2**, 218–231 (2003).
46. Paulovich, F. V *et al.* Information visualization techniques for sensing and biosensing. *Analyst* **136**, 1344–1350 (2011).
47. Aroca, R. F. *et al.* *Amplificación plasmonica de espectros Raman y de Fluorescencia, SERS y SEF sobre nanoestructuras metálicas.* (Editora:CSIC, 2014).
48. Li, J. F. *et al.* Shell-isolated nanoparticle-enhanced Raman spectroscopy. *Nature* **464**, 392–395 (2010).
49. Liu, B. *et al.* Shell Thickness-Dependent Raman Enhancement for Rapid

- Identification and Detection of Pesticide Residues at Fruit Peels. *Anal. Chem.* **84**, 255–261 (2012).
50. Martinneto, L., Vieira, E. M. & Sposito, G. Mechanism of atrazine sorption by humic-acid- a spectroscop study. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1867–1873 (1994).
 51. Ulrich, P; Weller, MG; Niessner, R. Immunological determination of triazine pesticides bound to soil humic acids (bound residues). **354**, 352–358 (1996).
 52. Lopes, H. J. J. Garantia e Controle da Qualidade no Laboratório Clínico. (2003).
 53. Leopold, N. & Lendl, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *J. Phys. Chem. B* **107**, 5723–5727 (2003).
 54. Lee, P. C. & Meisel, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* **86**, 3391–3395 (1982).
 55. Gorban, A., Kegl, B., Wunsch, D. & Zinovyev, A. *Principal Manifolds for Data Visualisation and Dimension Reduction*. (Springer, 2007).
 56. Minghim, R., Paulovich, F. V. & Andrade Lopes, A. de. in *Vis. Data Anal. 2006* (Erbacher, R. F., Roberts, J. C., Grohn, M. T. & Borner, K.) **6060**, (2006).
 57. Alvarez-Puebla, R. A., Arceo, E., Goulet, P. J. G., Garrido, J. J. & Aroca, R. F. Role of nanoparticle surface charge in surface-enhanced Raman scattering. *J. Phys. Chem. B* **109**, 3787–3792 (2005).
 58. Saade, J. & de Araujo, C. B. Synthesis of silver nanoprisms: A photochemical approach using light emission diodes. *Mater. Chem. Phys.* **148**, 1184–1193 (2014).
 59. Neto, E. A. B. Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas. *Inst. Física São Carlos* (2010).
 60. Gorup, L. F. Nanopartículas coloidais de ouro e prata e sua funcionalização com Dibutil-Doicalgenetos. *Química* (2010).
 61. Izquierdo-Lorenzo, I., Alda, I., Sanchez-Cortes, S. & Vicente Garcia-Ramos, J. Adsorption and Detection of Sport Doping Drugs on Metallic Plasmonic Nanoparticles of Different Morphology. *Langmuir* **28**, 8891–8901 (2012).
 62. Furini, L. N. *et al.* Detection and quantitative analysis of carbendazim herbicide on Ag nanoparticles via surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.* (2015). doi:10.1002/jrs.4737
 63. Lorena Roldan, M., Sanchez-Cortes, S., Vicente Garcia-Ramos, J. & Domingo,

- C. Cucurbit 8 uril-stabilized charge transfer complexes with diquat driven by pH: a SERS study. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 4935–4941 (2012).
64. Pieczonka, N. P. W., Goulet, P. J. G. & Aroca, R. F. Chemically selective sensing through layer-by-layer incorporation of biorecognition into thin film substrates for surface-enhanced resonance Raman scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 12626–12627 (2006).
 65. Koopmans, G. F., Hiemstra, T., Regelink, I. C., Molleman, B. & Comans, R. N. J. Asymmetric flow field-flow fractionation of manufactured silver nanoparticles spiked into soil solution. *J. Chromatogr. A* **1392**, 100–109 (2015).
 66. Giorgetti, E., Marsili, P., Muniz-Miranda, M., Gellini, C. & Giammanco, F. Spectroscopic evidence of positive clusters in Ag colloids obtained by laser ablation in aqueous solutions. *Appl. Phys. a-Materials Sci. Process.* **117**, 327–331 (2014).
 67. Liz-Marzan, L. M. Nanometals formation and color. *Mater. Today* **7**, 26–31 (2004).
 68. Ortega-Arroyo, L. *et al.* Green synthesis method of silver nanoparticles using starch as capping agent applied the methodology of surface response. *Starch-Starke* **65**, 814–821 (2013).
 69. Mock, J. J., Barbic, M., Smith, D. R., Schultz, D. A. & Schultz, S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. *J. Chem. Phys.* **116**, 6755–6759 (2002).
 70. Garcia-Leis, A., Vicente Garcia-Ramos, J. & Sanchez-Cortes, S. Silver Nanostars with High SERS Performance. *J. Phys. Chem. C* **117**, 7791–7795 (2013).
 71. Cai, J. & Elrassi, Z. Micellar electrokinetic capillary chromatography of neural solutes with micelles of adjustable surface-charge density. *J. Chromatogr.* **608**, 31–45 (1992).
 72. Benassi, E., Di Foggia, M. & Bonora, S. Accurate computational prediction of the structural and vibrational properties of s-triazine derivatives in vacuo. A DFT approach. *Comput. Theor. Chem.* **1013**, 85–91 (2013).
 73. Varsanyi, G. & Szoke, S. *Vibrational spectra of benzene derivatives*. (Ney York and London, 1969).
 74. Matulaitiene, L., Kuodis, Z., Eicher-Lorka, O. & Niaura, G. SERS characterization of imidazole ring terminated self-assembled monolayer formed from lipoic acid histamide on silver electrode. *J. Electroanal. Chem.* **700**, 77–85

- (2013).
75. Nie, S. M. & Emery, S. R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science* (80-.). **275**, 1102–1106 (1997).
 76. Kneipp, K. *et al.* Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* **78**, 1667–1670 (1997).
 77. Constantino, C. J. L., Lemma, T., Antunes, P. A. & Aroca, R. Single-molecule detection using surface-enhanced resonance Raman scattering and Langmuir-Blodgett monolayers. *Anal. Chem.* **73**, 3674–3678 (2001).
 78. Aoki, P. H. B. *et al.* SERS Mapping in Langmuir-Blodgett Films and Single-Molecule Detection. *Appl. Spectrosc.* **67**, 563–569 (2013).
 79. Tolaieb, B., Constantino, C. J. L. & Aroca, R. F. Surface-enhanced resonance Raman scattering as an analytical tool for single molecule detection. *Analyst* **129**, 337–341 (2004).
 80. Aoki, P. H. B., Alessio, P., Riul Jr., A., De Saja Saez, J. A. & Constantino, C. J. L. Coupling Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering and Electronic Tongue as Characterization Tools to Investigate Biological Membrane Mimetic Systems. *Anal. Chem.* **82**, 3537–3546 (2010).
 81. Koeber, R. *et al.* Evaluation of a multidimensional solid-phase extraction platform for highly selective on-line cleanup and high-throughput LC-MS analysis of triazines in river water samples using molecularly imprinted polymers. *Anal. Chem.* **73**, 2437–2444 (2001).
 82. Li, R.-H., Liu, D.-H., Yang, Z.-H., Zhou, Z.-Q. & Wang, P. Vortex-assisted surfactant-enhanced-emulsification liquid-liquid microextraction for the determination of triazine herbicides in water samples by microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* **33**, 2176–2183 (2012).
 83. Djozan, D., Farajzadeh, M. A., Sorouraddin, S. M., Baheri, T. & Norouzi, J. Inside-Needle Extraction Method Based on Molecularly Imprinted Polymer for Solid-Phase Dynamic Extraction and Preconcentration of Triazine Herbicides Followed by GC-FID Determination. *Chromatographia* **75**, 139–148 (2012).
 84. Oliveira Brett, A. M. & Da Silva, L. A. Validation of Novel Biosensors in Real Environment and Food Sample. *1st Work. Eval.* 24–27 (2001).
 85. Moskovits, M. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783–826 (1985).
 86. Wang, D. J., Shin, J. Y., Cheney, M. A., Sposito, G. & Spiro, T. G. Manganese

- dioxide as a catalyst for oxygen-independent atrazine dealkylation. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 3160–3165 (1999).
87. Marcacci, S. A phytoremediation approach to remove pesticides (atrazine and lindane) from contaminated environment. *Fac. Environ. Nat. Archit. construit* (2004).
 88. Pereira, S. V. Degradação da atrazina pelo processo uv/h₂o₂ e ozônio, identificação dos intermediários e avaliação da atividade estrogênica. *Eng. Química* (2011).
 89. Djozan, D., Ebrahimi, B., Mahkam, M. & Farajzadeh, M. A. Evaluation of a new method for chemical coating of aluminum wire with molecularly imprinted polymer layer. Application for the fabrication of triazines selective solid-phase microextraction fiber. *Anal. Chim. Acta* **674**, 40–48 (2010).
 90. Tuzimski, T. Application of RP-HPLC-Diode Array Detector after SPE to the Determination of Pesticides in Pepper Samples. *J. Aoac Int.* **95**, 1357–1361 (2012).
 91. Wang, Y. *et al.* Application of liquid phase microextraction based on solidification of floating organic drop for the determination of triazine herbicides in soil samples by gas chromatography with flame photometric detection. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **92**, 1563–1573 (2012).
 92. Djozan, D. & Ebrahimi, B. Preparation of new solid phase micro extraction fiber on the basis of atrazine-molecular imprinted polymer: Application for GC and GC/MS screening of triazine herbicides in water, rice and onion. *Anal. Chim. Acta* **616**, 152–159 (2008).
 93. Bakas, I. *et al.* Electrochemical impedimetric sensor based on molecularly imprinted polymers/sol-gel chemistry for methidathion organophosphorous insecticide recognition. *Talanta* **130**, 294–298 (2014).
 94. Valera, E., Garcia-Febrero, R., Isabel Pividori, M., Sanchez-Baeza, F. & Marco, M. P. Coulombimetric immunosensor for paraquat based on electrochemical nanoprobe. *Sensors and Actuators B-Chemical* **194**, 353–360 (2014).
 95. Kubackova, J., Fabriciova, G., Miskovsky, P., Jancura, D. & Sanchez-Cortes, S. Sensitive Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Detection of Organochlorine Pesticides by Alkyl Dithiol-Functionalized Metal Nanoparticles-Induced Plasmonic Hot Spots. *Anal. Chem.* **87**, 663–669 (2015).
 96. Guerrini, L. *et al.* Functionalization of Ag nanoparticles with the bis-acridinium

- lucigenin as a chemical assembler in the detection of persistent organic pollutants by surface-enhanced Raman scattering. *Anal. Chim. Acta* **624**, 286–293 (2008).
97. Thomas, S. *et al.* Studies on adsorption of 5-amino tetrazole on silver nanoparticles by SERS and DFT calculations. *J. Phys. Chem. A* **109**, 9928–9934 (2005).
 98. Sammon, J. W. A nonlinear mapping for data structure analysis. *Ieee Trans. Comput. C* **18**, 401–& (1969).
 99. Aoki, P. H. B. *et al.* Spray layer-by-layer films based on phospholipid vesicles aiming sensing application via e-tongue system. *Mater. Sci. Eng. C* **32**, 862–871 (2012).
 100. Riul Jr., A., Dantas, C. A. R., Miyazaki, C. M. & Oliveira Jr., O. N. Recent advances in electronic tongues. *Analyst* **135**, 2481 (2010).