

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais
(POSMAT)



**Interação entre modelos de biomembrana
baseados em filmes de Langmuir e vesículas
unilamelares gigantes (GUVs) com herbicidas
triazínicos e detecção via espectroscopia SERS**

Tese de Doutorado
Rafael Jesus Gonçalves Rubira

Presidente Prudente
2020

Rafael Jesus Gonçalves Rubira

Interação entre modelos de biomembrana baseados em filmes de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUVs) com herbicidas triazínicos e detecção via espectroscopia SERS

Tese apresentada como requisito à obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino.

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino

Presidente Prudente – SP

2020

Rubira, Rafael Jesus Gonçalves.

Interação entre modelos de biomembrana baseados em filmes de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUVs) com herbicidas triazínicos e detecção via espectroscopia SERS/ Rafael Jesus Gonçalves Rubira, 2020 147f.

Orientador: Carlos José Leopoldo Constantino

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2020

1. Filmes de Langmuir 2. GUVs. 3.Espalhamento Raman. 4.SERS. 5. Detecção de Herbicidas Triazínicos.

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

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

Aos 03 dias do mês de dezembro do ano de 2020, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de RAFAEL JESUS GONÇALVES RUBIRA, intitulada **Interação entre modelos de biomembrana baseados em filmes de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUVs) com herbicidas triazínicos e detecção via espectroscopia SERS**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / UNESP/Câmpus de Presidente Prudente, Prof. Dr. HENRIQUE DE SANTANA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, Prof. Dr. RÔMULO AUGUSTO ANDO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química Fundamental / Universidade de São Paulo, Profa. Dra. CLARISSA DE ALMEIDA OLIVATI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física, Química e Biologia / UNESP/Câmpus de Presidente Prudente, Profª. Drª. MARYSTELA FERREIRA (Participação Virtual) do(a) Campus Sorocaba / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Carlos José Leopoldo Constantino

Prof. Dr. CARLOS JOSÉ LEOPOLDO CONSTANTINO

Dedicatória

Em primeiro lugar dedico este trabalho a Deus pelo discernimento no momento que mais precisei.

A minha esposa Aline, quem muitas das vezes se abdicou do seu tempo para caminhar ao meu lado. Gratidão, tenha a certeza que essa tese somente foi possível por pessoas como você estarem ao meu lado.

Aos meus pais e Irmão que mesmo com tão pouco financeiramente me mostraram que a melhor ajuda vêm do coração, da alma, do conforto de uma palavra motivacional.

Dedico esta tese de doutorado em especial ao meu Pai, sei que me olha com carinho, e todos os dias me leva pra casa, segura na minha mão e me abraça, e por fim me cobre com as suas asas. Sei que é você que me livra do mal. Também sei meu Pai que o futuro a Deus pertence, então tenho a certeza que cedo ou tarde nós vamos nos encontrar. Te Amo.

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 simplicidade de vocês me ajudaram a enxergar o mundo de uma maneira melhor. Sempre carregarei seus ensinamentos comigo.

Em especial a minha esposa Aline. Pessoa a quem devo tudo, sempre ao meu lado, mostrando o caminho certo a seguir. A pessoa que sempre me coloca pra cima, que levanta a minha cabeça e ajuda a lutar pelos meus sonhos. Obrigado por tudo. Essa conquista é nossa. Te amo.

Aos meus amigos Nena e Erick, obrigado por todos os momentos que passamos juntos. Ao lado de vocês a vida se torna mais leve e divertida.

À minha segunda família: Ne e João, por sempre serem atenciosos e carinhosos comigo. Com vocês aprendi e aprendo muitas coisas. Uma delas foi apreciar e valorizar melhor a família. Além de fazer eu gostar da natureza, da pesca e é claro andar de cavalo. Com vocês comecei a compreender o real sentido da palavra viver. Obrigado.

Aos amigos do Grupo Noix, começando por aqueles que me receberam no grupo, Diogão, Pedrera, Priscila, Gabriel, Léo e Jony... Aos meus amigos que passaram e permanecem no grupo NOIX com quem pude trocar experiências, Bina, Diegão, Mateuzão, Henry, Cibely, Luis, Gilia, Wally, Tati e Marcelão.

Gostaria de agradecer em especial ao meu amigo Léo, parceiro de laboratório e da vida. Pessoa que vi toda a caminhada científica, desde ao entrar no grupo até hoje se tornar professor universitário. Você é um dos poucos que sempre me motiva a lutar pelo meu sonho, sempre olhando o lado positivo. Obrigado.

Agradecer a Priscila que no início da IC teve toda paciência comigo, pegando em minha mão e me ajudando em todos os aspectos. Obrigado de coração. Foi devido a perseverança de pessoas como você que consegui chegar até aqui. Missão dada é missão cumprida !!

A mi maestro que me hizo amar la España. Y me ayudó a comprender que en la vida tenemos que vivir. Sus enseñanzas van más allá de esta tesis. Usted es mi espejo, en la cuestión profesional o como un ser humano. Muchas gracias.

Ao meu orientador, amigo, maestro e tutor. Casé em toda minha oração agradeço pelo dia em que você me convidou a fazer parte do grupo Noix, isso há 10 anos atrás. A partir desse momento, você mudou a minha realidade, transformou a minha vida. Obrigado por acreditar em mim. Tudo que sei cientificamente devo ao senhor. Foi vendo o senhor ao longo desses anos que tive a certeza da profissão que escolhi. Meu muito obrigado....Gratidão.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro da bolsa no País (Processo: 2016/09634-0) e pela Bolsa de Estágio no Exterior (BEPE) (Processo: 2018/04628-8). Obrigado por acreditar no ganho científico dessa tese.

“É necessário fazer outras perguntas, ir atrás das indagações que produzem o novo saber, observar com outros olhares através da história pessoal e coletiva, evitando a empáfia daqueles e daquelas que supõem já estar de posse do conhecimento e da certeza”

Mario Sergio Cortella

“Superar a pobreza não é uma tarefa de caridade, é um ato de justiça. Como a escravidão e o apartheid, a pobreza não é natural. É feita pelo homem e pode ser superada e erradicada pelas ações dos seres humanos. Às vezes, cai em uma geração para ser grande. VOCÊ pode ser essa grande geração. Deixe sua grandeza florescer”

Nelson Mandela

Esta tese é dividida em duas vertentes, sendo uma biológica estudando a interação entre herbicidas triazínicos e modelos simples da membrana celular, e outra ambiental tratando da detecção destes herbicidas em meio aquoso. Na primeira vertente foram conduzidos estudos de dois sistemas miméticos simples da estrutura lipídica da membrana plasmática: filmes de Langmuir (monocamadas lipídicas) e vesículas unilamelares gigantes (GUVs – bicamadas lipídicas). Os efeitos causados pelos herbicidas ametrina (AMT), atrazina (ATZ) e prometrina (PRM) no fosfolípido dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) foram estudados em ambos os sistemas miméticos. As interações entre o fosfolípido e os herbicidas foram analisadas por meio de filmes de Langmuir de DPPC com os herbicidas dissolvidos na subfase aquosa e caracterizados por isotermas de pressão de superfície vs área molecular média (isotermas π -A), microscopia de ângulo de Brewster (BAM) e espectroscopia no infravermelho com modulação de polarização (PM-IRRAS). Já as GUVs de DPPC foram produzidas através da técnica de eletroformação e caracterizadas por microscopia de contraste de fase. Ambos os modelos simples mostraram que os herbicidas AMT, ATZ e PRM afetam a estruturação do DPPC nas mono e nas bicamadas. A AMT foi o herbicida que induziu mudanças mais drásticas nesta estruturação: 85% das GUVs perderam o contraste de fase (tais valores foram de 38% e 30% para ATZ e PRM, respectivamente) e nas monocamadas de Langmuir foi o herbicida que mais deslocou as isotermas π -A de monocamadas de filmes de Langmuir para maiores valores de áreas (seguida por ATZ e PRM, nesta ordem) e também o único a causar ruptura nesta monocamada.

Na vertente ambiental foi estudada a detecção dos herbicidas (PRM, AMT e ATZ) por meio da técnica de espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS) em meio aquoso. Como plataforma SERS foram utilizados colóides de prata (nanopartículas esféricas de prata - AgNP) caracterizados por espectroscopia de extinção no UV-Vis, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta. Foi observado que os herbicidas sofrem hidroxilação em ambientes ácidos e isto interfere diretamente na afinidade com a superfície das AgNP (adsorção), crucial em SERS. Em $\text{pH} < 5$, a PRM e a AMT interagem com as AgNP através do C=O enquanto que em $\text{pH} > 5$ a interação se dá através do nitrogênio protonado. Não foi possível obter espectros SERS da ATZ em $\text{pH} > 2$, provavelmente devido à baixa afinidade com a superfície metálica em virtude da presença do cloro (Cl) na estrutura molecular da ATZ que dificulta a adsorção no metal. Na análise quantitativa, a PRM apresentou isotermas de adsorção do tipo Langmuir enquanto a AMT isotermas do tipo sigmoidal. O limite de detecção (LOD), determinado no intervalo linear de cada isoterma de adsorção, foi de 9,2 ppb para a PRM e 3 ppb para a AMT, concentrações essas abaixo do limite máximo de resíduo permitido para água potável, tanto no Brasil quanto na Europa.

Abstract

This thesis is divided in two aspects, the interaction between herbicides and simple model of the plasma membrane (biological aspect) and the detection of these herbicides (environmental aspect). The biological aspect of the work contains the results of two mimetic systems of the lipid structure of the plasma membrane: Langmuir films (DPPC monolayers) and giant unilamellar vesicles (GUVs - DPPC bilayers). The effects caused by the herbicides ametryn (AMT), atrazine (ATZ) and prometryn (PRM) on phospholipid dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) for both mimetic systems were studied. The interactions between phospholipid and herbicides were analyzed by means of DPPC Langmuir films with the herbicides in the aqueous subphase characterized by surface pressure isotherms vs average molecular area (π -A isotherms), Brewster angle microscopy (BAM) and Infrared reflection absorption spectroscopy with polarization modulation (PM-IRRAS). DPPC GUVs were produced using the electroforming technique and characterized by phase contrast microscopy. Both simple models of mimicry showed that the herbicides AMT, ATZ and PRM have some effect on the structuring of DPPC. However, in both systems, AMT was the herbicide that induced the most dramatic changes in this structure: 85% of the GUVs lost their phase contrast (these values were 38% and 30% for ATZ and PRM, respectively) and in the aqueous subphase it was the herbicide that most displaced the π -A isotherms of Langmuir film monolayers to greater values of areas (followed by ATZ and PRM) and also the only one to cause rupture in this monolayer.

In the environmental aspect, the detection of herbicides (PRM, AMT and ATZ) was carried out using the surface-enhanced Raman scattering (SERS). As SERS platform, silver nanoparticles (AgNP) were used, characterized by UV-Vis absorption spectroscopy, dynamic light scattering (DLS) and zeta potential. Herbicides suffer hydroxylation in acidic environments and this directly interferes in the affinity with the surface of AgNP, crucial in SERS. At $\text{pH} < 5$, PRM and AMT interact with AgNP through $\text{C} = \text{O}$, while at $\text{pH} > 5$ the interaction occurs in the protonated nitrogen. It was not possible to obtain SERS spectra from ATZ at $\text{pH} > 2$, probably due to the low affinity with the metallic surface, the chlorine (Cl) present in its molecular structure hinders the adsorption on the metal. In the quantitative analysis, the PRM presented adsorption isotherms of the Langmuir type while the AMT showed isotherms of the sigmoidal type. The detection limit (LOD), determined in the linear range of each isotherm, was 9.2 ppb for PRM and 3 ppb for AMT, these concentrations are below the limit allowed by the regulatory agencies for drinking water, in Brazil, and in Europe.

Key words: triazine herbicide, SERS, GUVs, analytical detection

Apresentação da tese de doutorado.....	1
Capítulo 1: Introdução.....	2
1.1. Motivação.....	2
1.2. Sistemas miméticos da membrana plasmática (arcabouço lipídico)	6
1.3. Herbicidas.....	9
1.4. Motivação para uso da técnica SERS.....	11
1.5. Sistemas de detecção dos herbicidas via SERS.....	13
1.6. Objetivos.....	15
Capítulo 2: Materiais e métodos.....	17
2.1. Materiais.....	17
2.2. Preparação dos filmes de Langmuir.....	18
2.3. Ciclos de compressão-descompressão.....	19
2.4. Estudo da estabilidade dos filmes.....	20
2.5. Módulo compressional (Cs^{-1})	20
2.6. Análise de dados: projeção multidimensional.....	21
2.7. Microscopia de ângulo de Brewster (BAM) e PM-IRRAS.....	21
2.8. Preparação das vesículas unilamelares gigantes (GUVs).....	23
2.9. Microscopia de contraste de fase.....	24
2.10. Purificação dos herbicidas: PRM e ATZ.....	26
2.11. Síntese do coloide de Ag.....	27
2.12. Medidas de potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	27
2.13. Extinção no UV-Vis.....	28
2.14. Raman e SERS: PRM, ATZ e ATZ em diferentes pH.....	28
2.15. Análise quantitativa.....	30
Capítulo 3: Interação entre modelos de biomembrana baseados em filmes de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUVs) com AMT, ATZ e PRM.....	33
3.1. Filmes de Langmuir: monocamadas de DPPC na ausência e na presença de AMT, ATZ e PRM.....	33
3.2. Microscopia BAM dos filmes de Langmuir em monocamadas de DPPC na ausência e na presença de AMT, ATZ e PRM na subfase.....	41
3.3. Ciclos de compressão - descompressão.....	44
3.4. Estabilidade: DPPC na ausência e na presença dos herbicidas.....	45
3.5. Módulo compressional (Cs^{-1}): DPPC na ausência e na presença dos herbicidas.....	48
3.6. PM-IRRAS: monocamadas de DPPC na ausência e na presença de AMT, ATZ e PRM.....	50
3.7. Interações do DPPC com a AMT, ATZ e PRM: resumo.....	59
3.8. GUVs de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas: microscopia de contraste de fase.....	65
Capítulo 4: Análise dos herbicidas triazínicos via SERS.....	69
4.1. Caracterização do coloide de Ag na ausência e na presença dos herbicidas.....	69
4.1.1. TEM, potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	69
4.1.2. Espectro de extinção.....	73
4.2. Medidas Raman e SERS: PRM e AMT em coloide de Ag.....	74
4.3. Espectros SERS da PRM, AMT e ATZ em diferentes pH.....	78
4.4. Mecanismo de interação.....	83

4.5. Análise quantitativa.....	85
4.5.1. PRM.....	85
4.5.2. AMT.....	90
Capítulo 5: Conclusões.....	95
5.1. Vertente biológica.....	95
5.2. Vertente ambiental.....	97
Capítulo 6: Considerações finais.....	99
Referências	106

Figura 1: aumento do consumo de agrotóxicos (ingredientes ativos) e da safra de grãos no Brasil. Fonte IBAMA ¹	3
Figura 2: registro de liberação de agrotóxico no Brasil nos últimos 14 anos. A liberação teve uma ascensão brusca a partir de 2016. Fonte adaptada: Ministério da Agricultura ²	3
Figura 3: área ocupada com cana-de-açúcar (em verde) na região de Presidente Prudente nos anos de 2002 e 2016. Fonte: Prof. Dr. Antonio Thomaz Júnior, coordenador do grupo do Centro de Estudos de Geografia do Trabalho" (CEGeT).....	5
Figura 4: a) ilustração da membrana celular via modelo mosaico fluido. Disponível em: http://www.ebah.com.br/content/ABAAfQO8AI/membrana-plasmatica# . b) ilustração adaptada de Jacob Cortez <i>et al</i> ³¹ . Acesso em 07 de Novembro de 2020 ³	7
Figura 5: a) estrutura molecular do a) DPPC em 3D e 2D com seus grupos constituintes b) colina, fosfato e ésteres.....	8
Figura 6: representação da estrutura molecular geral da família dos derivados triazínicos com seus grupos substituintes R1, R2 e R3 dos herbicidas AMT, ATZ e PRM.....	10
Figura 7: estruturas moleculares do DPPC, AMT, ATZ e PRM. As numerações representam os modos vibracionais relacionados às bandas dos espectros Raman/SERS.....	18
Figura 8: ilustração do filme de Langmuir de DPPC mostrando a compressão das barreiras até a fase condensada (30 mN/m) na a) ausência e na b) presença de herbicida na subfase. Acessórios como as barreiras móveis e o sensor de Wilhelmy também estão representados.....	19
Figura 9: a) elipsômetro EP4SE acoplado a uma cuba de Langmuir modelo <i>mini trough</i> para as medidas de BAM. b) imagem digital do equipamento utilizado para as medidas de PM-IRRAS.....	22
Figura 10: ilustração do esquema experimental da célula de eletroformação com placas de ITO e espaçador de teflon. a) Representação da célula de eletroformação com fonte de tensão AC aberta e b) fechada durante o processo de eletroformação. c) Resumo dos procedimentos a e b em que através do fosfolípido DPPC espalhado em uma célula para a eletroformação (1V, 1/0Hz) forma as GUVs.....	24
Figura 11: imagem do microscópio confocal Nikon, modelo C2/C2si.....	25
Figura 12: ilustração do método adotado para a obtenção dos espectros SERS dos herbicidas PRM, ATZ purificados (sem degradação). Método semelhante ao trabalho de Rubira <i>et al.</i> ⁴	26
Figura 13: ilustração da dupla camada elétrica e do potencial zeta do coloide de Ag reduzido com cloridrato de hidroxilamina. Imagem adaptada de Aroca ⁵	28

Figura 14: procedimento experimental para a obtenção dos espectros SERS dos herbicidas em coloide de Ag.....	29
Figura 15: ilustração do modo de obtenção dos espectros SERS dos herbicidas para a realização da curva analítica. As áreas das bandas em 965 cm^{-1} (anel triazínico) e 3400 cm^{-1} (água) são destacadas.....	31
Figura 16: isotermas π -A de DPPC (0,5 mg/mL) em subfase de água ultrapura realizadas em triplicatas.....	33
Figura 17: isotermas π -A obtidas espalhando-se 25 μL de solução de DPPC (linha pontilhada) (0,50 mg/mL) sobre subfases de água ultrapura contendo (a) AMT, (b) ATZ e (c) PRM nas concentrações 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L mantidas a 23°C , com velocidade das barreiras de 10 mm/min. A área expandida (área expandida ($\text{\AA}^2$) vs. pressão de superfície (mN/m)) é mostrada ao lado das isotermas π -A com a barra de erro que representa a dispersão em torno da média das três medidas (isotermas π -A).....	34
Figura 18: projeção multidimensional agrupando por semelhança as isotermas π -A de DPPC para diferentes concentrações (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L) de a) AMT, b) ATZ e c) PRM na subfase.....	36
Figura 19: isotermas π -A de DPPC (linha pontilhada) (0,50 mg/mL) na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM nas concentrações 10^{-5} mol/L (a), 10^{-6} mol/L (b) e 10^{-7} mol/L (c). Ao lado das isotermas π -A é mostrada a área expandida ($\text{\AA}$) vs. pressão de superfície (mN/m). A barra de erro representa a dispersão em torno da média das três medidas (isotermas π -A)	38
Figura 20: projeção multidimensional agrupando por semelhança as isotermas π -A de DPPC para diferentes concentrações a) 10^{-5} mol/L, b) 10^{-6} mol/L e c) 10^{-7} mol/L dos herbicidas AMT, ATZ e PRM na subfase.....	40
Figura 21: imagens de BAM para filmes de Langmuir de monocamadas de DPPC (a) na ausência e na presença dos herbicidas AMT (b), ATZ (c) e PRM (d). Imagens obtidas em diferentes valores de pressão de superfície (π) dos filmes de Langmuir. A pressão de superfície é dada em mN/m.....	42
Figura 22: ciclos de compressão – descompressão das monocamadas de a) DPPC na ausência e presença da b) AMT, c) ATZ e d) PRM na concentração de 10^{-5} mol/L. As monocamadas foram comprimidas com velocidade das barreiras de 10 mm/min, a 23°C	44
Figura 23: teste de estabilidade do filme de DPPC (35 μL depositado na superfície, concentração de 0,5 mg/mL) em pressão de superfície fixada em 30mN/m por 5500 segundos, em uma cuba de Langmuir KSV, modelo mini-micro, a $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$	46

- Figura 24:** estabilidade do filme de DPPC em subfase de água ultrapura (35 μL espalhados na superfície, concentração de 0,5 mg/mL) na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM (10^{-5} mol/L). A curva mostra a área molecular média em função do tempo (5000 segundos) para uma pressão de superfície fixada em 30mN/m, O estudo foi realizado em uma cuba de Langmuir KSV, modelo mini-micro, a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 47
- Figura 25:** a) gráfico do módulo compressional (Cs^{-1}) por pressão de superfície do DPPC (0,5 mg/mL) na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM (10^{-5} mol/L) na subfase. b) Valores em gráficos de barra do módulo compressional do DPPC na ausência e na presença dos herbicidas em pressão de superfície fixada a 30 mN/m (fase líquido condensada) 49
- Figura 26:** espectros de PM-IRRAS (2800 a 3000 cm^{-1}) obtidos a 30 mN/m para monocamadas de DPPC na ausência e na presença de (a) AMT, (b) ATZ e (c) PRM na concentração de 10^{-5} mol/L na subfase. Espectro de FTIR do DPPC na parte superior da figura em filme *cast* sobre substrato de ZnSe..... 50
- Figura 27:** intensidade relativa do estiramento CH_2 simétrico em relação ao estiramento CH_2 antissimétrico ($\nu_{\text{s}}\text{CH}_2/\nu_{\text{as}}\text{CH}_2$). O gráfico de coluna mostra os valores obtidos dos espectros PM-IRRAS para monocamadas de DPPC na ausência e presença de AMT, ATZ e PRM (10^{-5} mol/L) em 30 mN/m na subfase..... 52
- Figura 28:** espectro de PM-IRRAS de DPPC com os grupos que constituem o fosfolípido, em pontilhado é observado na estrutura molecular do mesmo os respectivos números de onda do espectro. Os grupos presentes são: colina (verde), fosfato (vermelho), região do CH_2 do início da cauda (marrom) e os grupos ésteres (azul)..... 54
- Figura 29:** espectros de PM-IRRAS na região de 920 à 1800 cm^{-1} (referente a cabeça do DPPC) para monocamadas de DPPC a 30 mN/m na ausência e na presença de AMT (10^{-5} mol/L). Espectro FTIR de DPPC em filme *cast* sobre substrato de ZnSe. As alterações causadas por meio do herbicida na subfase são mostradas em pontilhados..... 55
- Figura 30:** espectros de PM-IRRAS na região de 920 à 1800 cm^{-1} (referente a região hidrofílica do DPPC) para monocamadas de DPPC (30 mN/m) na ausência e na presença de ATZ (10^{-5} mol/L). Espectro de FTIR de DPPC em filme *cast* sobre substrato de ZnSe. As alterações causadas por meio do herbicida na subfase aquosa em monocamada de DPPC são mostradas em pontilhados..... 56
- Figura 31:** espectros de PM-IRRAS na região de 920 à 1800 cm^{-1} (referente a região hidrofílica do DPPC) para monocamadas de DPPC (30 mN/m) na ausência e na presença de PRM (10^{-5} mol/L). Espectro de FTIR de DPPC em filme *cast* sobre substrato de ZnSe. As alterações causadas por meio do herbicida na subfase aquosa em monocamada de DPPC são mostradas em pontilhados..... 56

Figura 32: representação das possíveis interações de monocamadas de DPPC na presença de a) AMT, b) ATZ, e c) PRM na interface ar/água à 30 mN/m: O tamanho das barreiras em relação às moléculas não foram levadas em consideração, este <i>cartoon</i> é uma ilustração para simplificar/melhorar a visualização das possíveis interações (DPPC/herbicidas) por meio dos espectros de PM-IRRAS.....	60
Figura 33: imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM na concentração $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, no intervalo de tempo até 30 min.....	65
Figura 34: imagem de TEM e o histograma de distribuição de diâmetros do coloide de Ag.....	69
Figura 35: a) DLS do coloide de Ag na ausência e na presença da b) AMT, c) ATZ e d) PRM. Nas abscissas estão o diâmetro das AgNP em função da intensidade, presente nas ordenadas.....	71
Figura 36: espectros de extinção no UV-Vis do coloide de Ag na ausência e na presença da AMT, PRM e ATZ na concentração de 10^{-4} mol/L.....	73
Figura 37: espectro Raman da PRM em pó (purificado). Espectro SERS de PRM a 10^{-4} mol/L em coloide de Ag (pH 6). O espectro Raman do coloide de Ag é dado como referência (controle). a) Frequências mais baixas e b) frequências mais altas (os espectros são normalizados separadamente em a) e b)). Linha de laser a 532 nm. A inserção mostra a estrutura neutra na molécula de PRM.....	74
Figura 38: espectro Raman da AMT em pó. Espectro SERS de AMT a 10^{-4} mol/L em coloide de Ag (pH 6). O espectro Raman do coloide de Ag é dado como referência (controle). a) Frequências mais baixas e b) frequências mais altas (os espectros são normalizados separadamente em a) e b)). Linha de laser a 532 nm. A inserção mostra a molécula de AMT em seu estado neutra.....	75
Figura 39: espectros SERS da PRM purificada (10^{-4} mol / L) obtidos em diferentes pHs. a) Frequências mais baixas e b) frequências mais altas (os espectros são normalizados separadamente em a) e b)). Linha de laser a 532 nm.....	78
Figura 40: diagrama que ilustra a protonação e desprotonação da PRM em diferentes pH..	79
Figura 41: a) variação da área integrada da banda do anel da PRM (purificada) em relação a banda da água ($965\text{cm}^{-1}/3400\text{cm}^{-1}$) a diferentes pH. b) Variação das áreas integradas da banda hidroxila em relação à banda do anel ($1540 \text{ à } 1680 \text{ cm}^{-1}/965 \text{ cm}^{-1}$) para o sinal SERS da PRM (10^{-4} mol/L), a diferentes pH (1 to 13). O <i>Inset</i> mostra os espectros SERS da PRM a pH 6 e pH3, ao lado a estrutura molecular da PRM com a formação de hidroxila, acarretando no tautomerismo.....	80
Figura 42: espectros SERS da AMT (10^{-4} mol / L) em diferentes pHs. a) Frequências mais baixas e b) frequências mais altas (os espectros são normalizados separadamente em a) e b)). Linha de laser a 532 nm.....	81

Figura 43: a) Variação da área integrada da banda do anel da AMT em relação a banda da água ($965\text{cm}^{-1}/3400\text{cm}^{-1}$) a diferentes pHs. b) Variação das áreas integradas da banda hidroxila em relação à banda do anel ($1540 \text{ a } 1680 \text{ cm}^{-1}/965 \text{ cm}^{-1}$) para o sinal SERS da AMT (10^{-4} mol/L), a diferentes pHs (1 to 13). <i>Inset</i> mostra os espectros SERS da AMT em pH 6 e pH 3 com formação da hidroxila, ocorrendo o efeito de tautomerismo na estrutura molecular da AMT.....	81
Figura 44: espectros SERS da ATZ purificada em coloide de Ag nos pHs 1.5 e 6. Laser 532 nm.....	82
Figura 45: a) e b) Mecanismo de interação proposto para análise das bandas correspondentes em 220 e 245 cm^{-1} . c) Espectros SERS da PRM (10^{-4} mol/L) a baixo comprimentos de onda em diferentes pHs.....	84
Figura 46: espectros SERS da PRM (10^{-4} mol/L) em distintos pHs (1 a 13) em baixos números de onda. Laser 532 nm.....	85
Figura 47: espectros SERS de PRM purificada em diferentes concentrações em pH 11. Linha de laser: 532 nm.....	86
Figura 48: espectros SERS da PRM purificada em diferentes concentrações em pH 7. Linha de laser: 532 nm.....	87
Figura 49: isoterma de adsorção com regime linear traçado para a obtenção das curvas analíticas de PRM com base na intensidade SERS das bandas em $965/3400$. pHs 7 e 11	88
Figura 50: isoterma de adsorção com regime linear traçado para a obtenção das curvas analíticas da PRM com base na intensidade SERS para a área da banda em 965 cm^{-1} . pHs 7 e 11.....	89
Figura 51: espectros SERS da AMT em coloide de Ag na faixa de concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ a $4,0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ em pH 7. Linha de laser: 532 nm.....	90
Figure 52: isoterma de adsorção com regime linear traçado para a obtenção da curva analítica da AMT com base na intensidade SERS da área da banda em 965 cm^{-1} . pH 7..	91
Figura 53: “modelo B.D.D.T”: classificação das isotermas de adsorção considerando a interação adsorbato/superfície (K_{ad}). Além das interações intermoleculares adsorbato/adsorbato (K_2). Imagem adaptada de Brunauer <i>et al.</i> ⁶	92

Lista de Acrônimos e Siglas

AgNP	Nanopartícula de prata
AMT	Ametrina
ATZ	Atrazina
BAM	Microscopia de ângulo de Brewster
BEPE	Bolsa de estágio e pesquisa no exterior
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina
FAPESP	Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDMAP	Mapa de documento interativo
LbL	Filmes <i>layer-by-layer</i>
LOD	Limite de detecção
LUV	Vesículas unilamelares grandes
NP	Nanopartícula
OMS	Organização mundial da saúde
PAH	Poli (hidrocloro de alilamina)
PC	Fosfatidilcolina
PCA	Análise de componentes principais
PM-IRRAS	Polarização modulada - espectroscopia de absorção e reflexão no infravermelho
PRM	Prometrina
Pt	Platina
SERS	Espalhamento Raman amplificado em superfície
SUV	Vesículas unilamelares pequenas
TEM	Microscópio Eletrônico de Transmissão
TPM	Técnica de projeção multidimensional
USEPA	Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos
UV-Vis	Absorção no ultravioleta-visível
ZnSe	Seleneto de zinco
Zp	Potencial zeta

Esta tese apresenta os resultados do período entre julho de 2016 e outubro de 2020. O trabalho foi realizado em sua maioria nos laboratórios do Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP, campus de Presidente Prudente, sob orientação do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino, com financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Um estágio de doutorado sanduíche foi realizado com financiamento da FAPESP por um período de um ano (12 de setembro/2018 a 12 de setembro/2019), sendo desenvolvido no Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Estructura de la Materia (IEM), Madri, Espanha, sob orientação do pesquisador Dr. Santiago Sánchez Cortés.

A tese está dividida em seis capítulos. O capítulo 1 apresenta uma breve introdução com a motivação, e sucintos tópicos referentes aos variados temas, como sistemas miméticos de membrana, detecção via técnica SERS, e os objetivos. O capítulo 2 aborda os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento da tese, descrevendo a preparação das soluções, o processo de preparação e caracterização dos filmes de Langmuir. Contempla também os procedimentos utilizados na obtenção das vesículas unilamelares gigantes (GUVs). O capítulo aborda ainda a preparação das nanopartículas de prata (AgNP), a caracterização e o método analítico empregado para a obtenção dos limites de detecção (LOD) dos herbicidas. Os resultados referentes à interação entre os herbicidas e os modelos de biomembrana são apresentados no capítulo 3, enquanto que o capítulo 4 aborda os resultados dos estudos via SERS, desde caracterização até as curvas analíticas. No capítulo 5 são dadas as conclusões, e finalizando, no capítulo 6 estão as considerações finais.

Capítulo 1

1. 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 nocivos IBGE⁷”.

Em 2017 os agricultores brasileiros utilizaram por volta de 540 mil toneladas de ingredientes ativos de agrotóxicos (geralmente, cada 1 L de ingrediente ativo é dissolvido em 100 L de água), o que representa 50% a mais do que em 2010, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)^{1,8}. Alega-se que houve o aumento no consumo de alimentos, sendo necessário o elevado uso de agrotóxico para suprir a demanda crescente⁹. De fato, de acordo com o IBAMA, a safra de grãos teve um aumento de 149 milhões de toneladas em 2010 para 238 milhões em 2017¹(Figura 1). Outro fator que possivelmente pode justificar a elevada utilização de agrotóxicos é o clima. Em virtude de o Brasil ser um país tropical, a agricultura brasileira não conta com o período de inverno para interromper o ciclo das pragas, como ocorre em países de clima temperado¹.

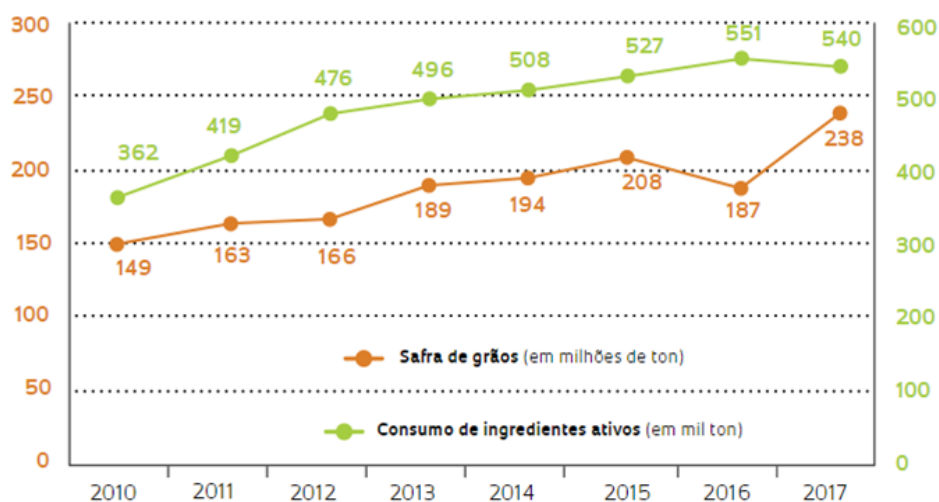
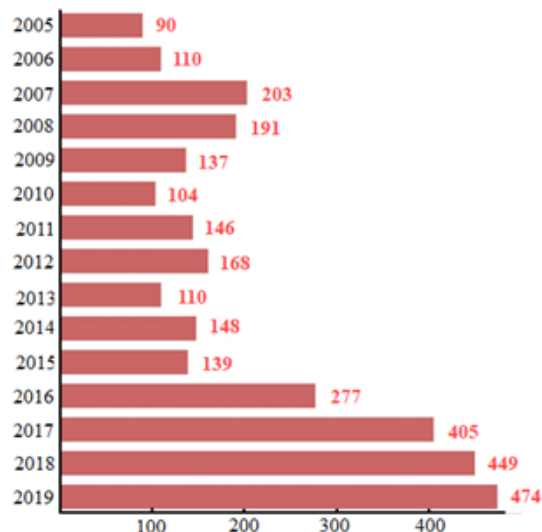


Figura 1: aumento do consumo de agrotóxicos (ingredientes ativos) e da safra de grãos no Brasil. Fonte IBAMA¹.

Porém, ao invés de investir em meios que auxiliem na melhoria da produção agrícola, a política governamental no Brasil, principalmente nos últimos anos, vai no sentido da liberação de mais agrotóxicos. O Brasil aprovou o registro de 474 novos agrotóxicos em 2019, maior número documentado pelo Ministério da Agricultura desde 2005. É um número ainda 5,5% maior do que 2018, quando foram liberados 449 pesticidas, um recorde até então¹⁰. A Figura 2, retirada do site do Ministério da Agricultura, ilustra esse aumento de registro de agrotóxico no Brasil nesses últimos 14 anos. Complementarmente, um estudo publicado na revista *Nature* em 2013, de Natasha

Registro de Agrotóxicos no Brasil



Gilbert¹¹, mostra o aumento da resistência das plantas invasoras aos agrotóxicos, em virtude do uso indevido e/ou inadequado destes compostos, alimentando um círculo vicioso.

Figura2: registro de liberação de agrotóxico no Brasil nos últimos 14 anos. A liberação teve uma ascensão brusca a partir de 2016. Fonte adaptada: Ministério da Agricultura².

Os pesticidas são uma classe de agrotóxicos e seu elevado consumo causa danos irreversíveis para a saúde humana, como por exemplo, doenças cancerígenas, e para o meio ambiente, contaminando o solo e, principalmente, os lençóis freáticos e mananciais^{12,13}. Segundo um relatório da Organização das Nações Unidas (ONU), estima-se que cerca de 200 mil pessoas morrem anualmente no mundo vítimas de envenenamento agudo por agrotóxicos, basicamente trabalhadores rurais e moradores do campo¹⁰. No Brasil, cerca de 85 mil pessoas sofreram intoxicação após exposição a agrotóxicos entre 2007 à 2015, sendo uma média de 25 intoxicações por dia, conforme os dados do Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos de 2018¹¹ elaborado pelo Ministério da Saúde. A maior causa de óbitos por intoxicação humana é por meio de herbicidas, correspondendo a 38% dos casos, seguida dos remédios 15% e drogas de abuso 15%¹⁴.

O aumento populacional exige uma produção em alta escala de alimentos para atender a demanda mundial como mencionado acima. O modo de cultivo para a produção em alta escala, tanto no Brasil como no mundo, são em sua maioria na forma de monoculturas (grandes propriedades rurais)^{7,15,16}. No entanto, esta prática é associada a problemas causados ao meio ambiente, pois é necessária a retirada de uma enorme área de vegetação nativa. O desmatamento dessas áreas provoca alterações climáticas, perda de biodiversidade e também desequilíbrio ecológico, o que força várias espécies a migrarem para outros locais. Inclusive, neste caso existe outro problema ambiental que é a questão do solo. O cultivo de uma única espécie em uma mesma área sem alternância de cultura/vegetação provoca a exaustão ou o esgotamento dos nutrientes do solo^{16,17}. Portanto, o solo sofre com o uso de agrotóxicos na monocultura, pois, sem vegetação fica propenso a erosão, o que facilita ainda mais a contaminação da superfície

e dos lençóis freáticos¹⁷, gerando um desequilíbrio da vida aquática e a intoxicação dos seres vivos, provocando possíveis doenças nos seres humanos^{2,16,17}.

A cana-de-açúcar merece destaque entre as monoculturas, pois o Brasil é o maior produtor do mundo, seguido pela Índia. O estado de São Paulo produz cerca de 60% de toda a cana-de-açúcar e etanol do país¹⁸. O professor e pesquisador Dr. Antônio Thomaz Júnior, coordenador do grupo do Centro de Estudos de Geografia do Trabalho" (CEGeT) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNESP de Presidente Prudente e coordenador do projeto FAPESP Temático Processo 2012/23959-9, mostra a expansão de plantação de cana-de-açúcar (em verde) na região de Presidente Prudente (Figura 3) referente aos anos de 2002 e 2016.

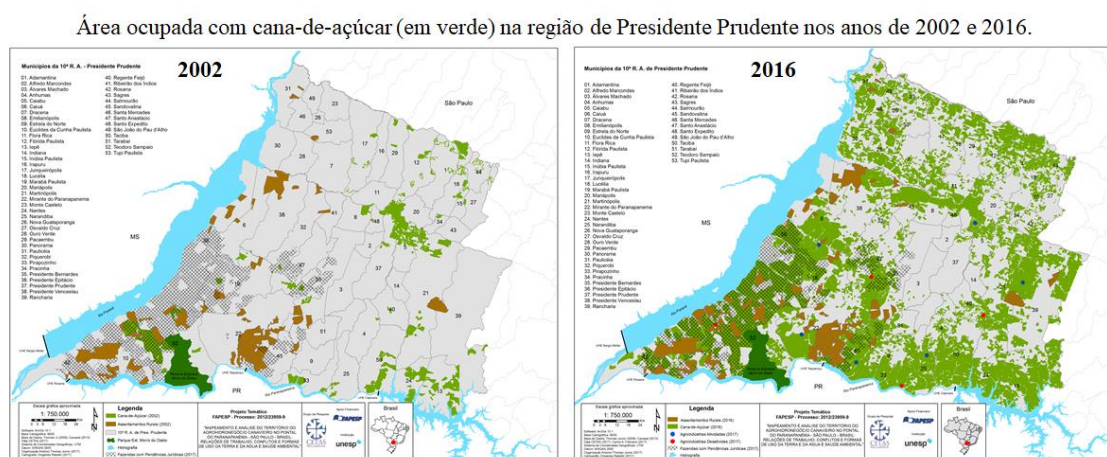


Figura 3: 10ª região administrativa do estado de SP, que contempla 53 municípios, população de cerca de 903 mil habitantes e tem Presidente Prudente como cidade sede¹⁹. Em destaque a área ocupada com cana-de-açúcar (em verde) nos anos de 2002 e 2016. Fonte: Prof. Dr. Antônio Thomaz Júnior, coordenador do grupo do Centro de Estudos de Geografia do Trabalho" (CEGeT).

Portanto, a necessidade do uso dos herbicidas em grande escala e suas consequências danosas justificam os estudos envolvendo a detecção destes herbicidas em concentrações de toxicidade estabelecidas pelas agências governamentais responsáveis por esta regulação. Desse modo, também justifica o estudo da ação destes herbicidas no corpo humano por distintas estratégias, como os sistemas miméticos da estrutura lipídica da membrana plasmática propostos nesta tese de doutorado.

1.2. Sistemas miméticos da membrana plasmática (arcabouço lipídico)

A membrana plasmática regula muitos processos fisiológicos nos sistemas celulares a partir do fluxo de entrada e saída de substâncias na célula. São constituídas principalmente por lipídios, fosfolipídios, glicolipídios, oligossacarídeos, esteróis, colesterol, e proteínas, responsáveis pela sua funcionalização. A dificuldade em utilizar as membranas *in vivo* para estudar interações com fármacos²⁰ e outros contaminantes²¹ leva a utilização dos sistemas miméticos simples da estrutura lipídica da membrana plasmática como um primeiro passo para compreender os efeitos sobre o sistema vivo^{22,23}. Dada esta dificuldade, são muito estudados os sistemas biomiméticos de membranas através de filmes de Langmuir (monocamadas (lipídicas neste caso) formadas na interface água/ar) e Langmuir Blodgett (LB) (monocamadas de Langmuir transferidas para substratos sólidos formando mono ou multicamadas)^{24,25}. De maneira complementar aos filmes de Langmuir, vesículas unilamelares gigantes (GUVs) também são eficientes como modelos simples da membrana plasmática²⁶. As GUVs são estruturas lipídicas automontadas formadas por um entorno de apenas uma ou poucas bicamadas lipídicas com diâmetro variando de 50 a 100 µm. Suas vantagens incluem a capacidade de encapsular grandes moléculas, e permitir observação direta com microscopias ópticas, como as de contraste de fase, fluorescência e confocal²⁷. A microscopia confocal, em particular, apresenta elevado potencial para observar sistemas mais complexos, como GUVs formadas por fosfolipídios com propensão à separação de fases²⁸.

O modelo de membrana celular segundo Nicolson *et al.*²⁹ é constituído por uma dupla camada de fosfolipídios fluídica, e as proteínas estão do lado interno, externo, ou atravessando completamente a membrana, como se fossem peças de um mosaico. A fluidez está condicionada ao tipo de interações intermoleculares na membrana. Este

modelo é assim chamado devido ao fato de admitir que a membrana não é uma estrutura rígida, existindo movimentos das moléculas que a constituem, sendo, assim, de grande fluidez²⁹. Além do modelo de Nicolson *et al.*²⁹, há o modelo proposto por Simons e Van Meer³⁰ (1988). O qual contempla as jangadas lipídicas (em inglês, *lipid rafts*), microdomínios da membrana plasmática que possuem elevada concentração de colesterol e de esfingolipídios. A Figura 4a mostra a ilustração do modelo mosaico fluido, e em 4b o modelo de jangadas lipídicas proposto por Simons e Van Meer³⁰.

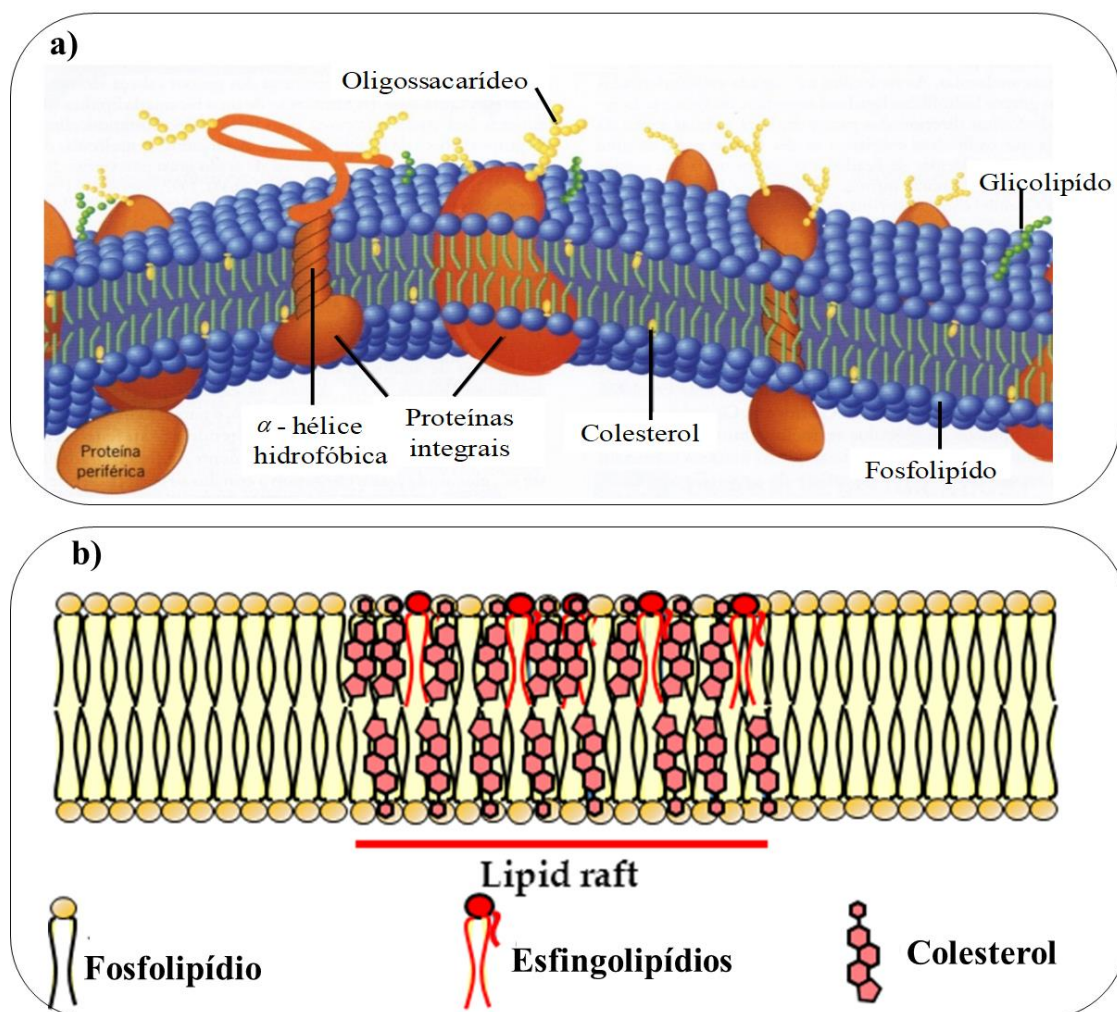


Figura 4: a) ilustração da membrana celular via modelo mosaico fluido. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfqO8AI/membrana-plasmatica#>. b) Ilustração adaptada de Jacob Cortez *et al*³¹. Acesso em 06 de Novembro de 2020³.

O fosfolipídio estudado nesta monografia L- α -1,2-Dipalmitoil-sn-3-Glicero-Fosfatidilcolinas (DPPC) foi escolhido por dois motivos fundamentais: i) as fosfatidilcolinas (PC) estão entre os fosfolipídios mais abundantes encontrados nas membranas celulares de mamíferos, cerca de 45-55 %^{32,33} fornecendo assim um modelo simples do ambiente lipídico para imitar as membranas celulares, mesmo sabendo que o DPPC em si esteja presente principalmente apenas nos tecidos pulmonares e cerebrais^{34,35}. ii) O DPPC tem sido amplamente utilizado nas monocamadas de Langmuir como modelo simples de membranas, para o qual há ampla literatura para comparação³⁶⁻³⁹. Daí a importância em escolher um fosfolipídio (DPPC) pertencente às fosfatidilcolinas (PC) para este trabalho. A Figura 5a mostra a estrutura molecular do fosfolipídio DPPC em 3D e 2D, apresentando seus grupos constituintes na Figura 5b.

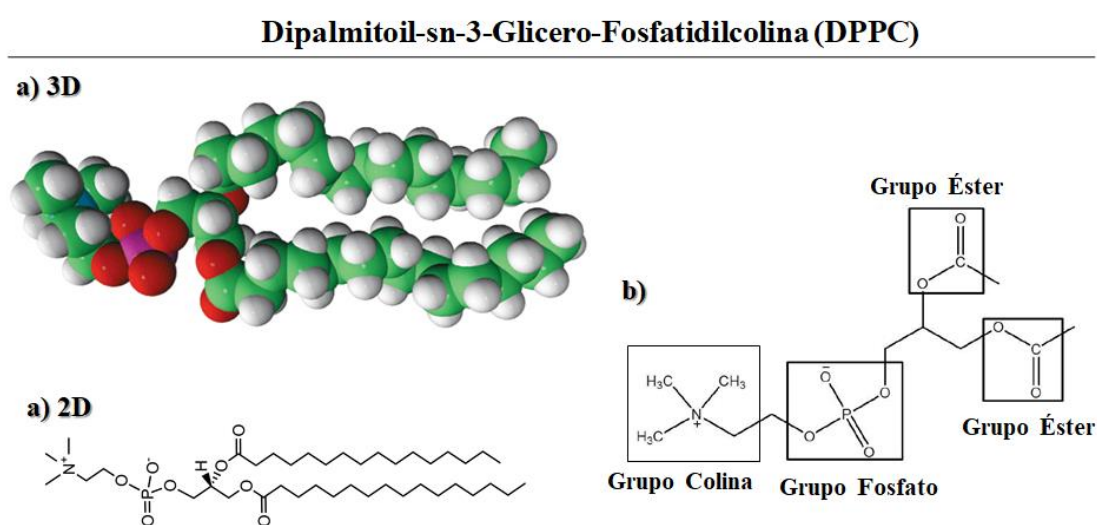


Figura 5: a) estrutura molecular do a) DPPC em 3D e 2D com seus grupos constituintes b) colina, fosfato e ésteres.

Na literatura há poucos trabalhos que relatam a interação de pesticidas com modelo de membrana celular. O trabalho de Bertoluzza *et. al.*⁴⁰ mostra estudos do fosfolipídio DPPC na forma de vesícula com o pesticida paraquat (PQ). Propriedades físico-químicas do fosfolipídio DPPC em interação com o PQ foram discutidas em função da variação do pH por meio de medidas de calorimetria exploratória diferencial

(DSC). A principal conclusão daquele trabalho é que a interação entre o PQ e o fosfolipídio é eletrostática e quando o PQ é adicionado aos lipossomas de DPPC existe uma pequena penetração do PQ na cauda hidrofóbica das bicamadas lipídicas. Estudos posteriores de Bertoluzza *et al.*⁴¹ evidenciaram a interação dos fosfolipídios, DPPC e DPPA, na forma de vesículas multilamelares com os herbicidas triazínicos, PRM e ATZ, por meio de espectroscopia e DSC. O trabalho traz conclusões relevantes acerca de estudos que evidenciam que os herbicidas, em determinados pH, têm melhor interação com os fosfolipídios. No caso do DPPC, a interação diminui quando há decréscimo do pH, mostrando que os herbicidas protonados facilitam as interações eletrostáticas. Em relação à ATZ, Baumner *et al.*⁴² mostraram os efeitos da incorporação do herbicida em lipossomas de uma mistura ternária de DPPC/DPPG/colesterol contendo ácido ascórbico como marcador, em um sistema em que lipossomas marcados foram ligados a um anticorpo anti-ATZ. Foi concluído que a composição dos lipossomas auxilia a incorporação do anticorpo imobilizado, permitindo a utilização desses sistemas em biossensores eletroquímicos ou ópticos. Trabalhos envolvendo a interação entre fosfolipídios e o herbicida AMT não foram encontrados na literatura em consultas na base de dados *Web of Science* (agosto/2019).

1.3. Herbicidas

Os herbicidas da família das s-triazinas são utilizados no controle pré e pós-emergência de plantas infestantes de diversas culturas agrícolas, como milho, sorgo e cana-de-açúcar^{43,44,45}. As s-triazinas são bases de Lewis já que seus nitrogênios (N) do anel podem doar pares de elétrons para formação de ligações covalentes¹⁷. Em sistemas aquosos as s-triazinas existem em formas neutras ou protonadas dependendo do pKa do composto e do pH do sistema. Os locais mais prováveis de protonação das s-triazinas

são as amins que ligam o anel triazínico¹⁷. Importante mencionar que as s-triazinas apresentam tanto funções hidrofóbicas (cadeias laterais alifáticas), como hidrofílicas (anel triazínico), possuindo um comportamento de solubilidade duplo, análogo ao exibido pelos detergentes ou até mesmo os próprios fosfolipídios¹⁷.

Dentre os herbicidas da família dos triazínicos estão a ametrina (AMT), atrazina (ATZ) e prometrina (PRM). Os herbicidas da família dos derivados triazínicos apresentam algumas características em comum, como um anel aromático hexamérico, simétrico e constituído de três átomos de carbono e três átomos de nitrogênio em posições alternadas. A solubilidade e a terminação dos nomes das triazinas são indicadas através do substituinte posicionado em R1 como mostra a Figura 4. Por exemplo, a terminação “azina” vem do átomo de Cl na posição R1; “etrina” do grupo SCH₃ e “tona” do grupo OCH₃⁴⁶. Enquanto, os grupos laterais nas posições R2 e R3 apresentados na Figura 6 diferenciam o nome dos herbicidas dentro do próprio grupo pertencente. A Figura 6 exhibe a estrutura molecular geral dos herbicidas triazínicos com os substituintes R1, R2 e R3, evidenciando o anel triazínico, bem como a estrutura molecular dos herbicidas AMT, ATZ e PRM. Na Tabela I, têm-se os nomes dos herbicidas mostrados na Figura 6 de acordo com a nomenclatura dos grupos substituintes R1, R2 e R3.

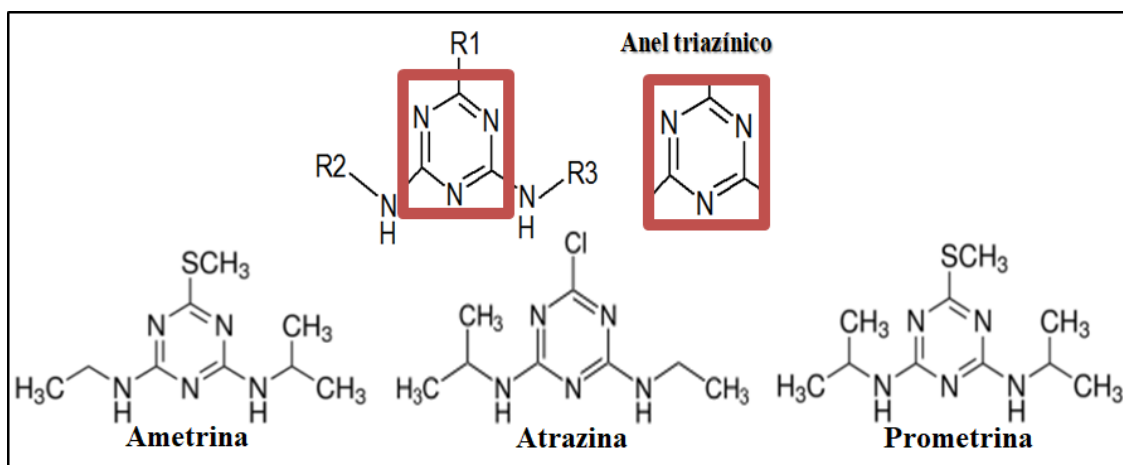


Figura 6: representação da estrutura molecular geral da família dos derivados triazínicos com seus grupos substituintes R1, R2 e R3 dos herbicidas AMT, ATZ e PRM.

Tabela I: herbicidas AMT, ATZ e PRM com seus grupos substituintes R1, R2 e R3.

Nome	R1	R2	R3
Ametrina	-SCH ₃	-CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
Atrazina	Cl	-CH ₂ CH ₃	-CH(CH ₃) ₂
Prometrina	-SCH ₃	-CH(CH ₃) ₂	-CH(CH ₃) ₂

A ATZ é um herbicida organoclorado por apresentar um Cl ligado ao anel triazínico⁴⁷⁻⁴⁹ contendo grupos laterais alifáticos diferentes: o grupo R2 (CH₂CH₃) é um etil e o grupo R3 [CH(CH₃)₂] um isopropil. Já a AMT apresenta os mesmos grupos laterais que a ATZ, apenas representados em posições invertidas R2 e R3 na Figura 6. Os herbicidas AMT e PRM são diferentes da ATZ, pois apresentam o enxofre (S) e um grupo metila (CH₃) ligado ao anel triazínico⁵⁰. Tais diferenças na estrutura molecular dos herbicidas resultam em distintas interações com a membrana do fosfolípido DPPC.

1.4. Motivação para uso da técnica SERS

A seção de choque do espalhamento Raman é baixa e limita a utilização desta técnica em filmes ultrafinos (de monocamadas a espessuras nanométricas) ou soluções muito diluídas (< 10⁻⁸ mol/L). Porém, a adsorção das moléculas alvo sobre superfícies metálicas rugosas, ou nanopartículas, em determinadas condições, promove a amplificação do sinal Raman em até 10⁶ vezes em média^{5,51}. Tal processo é denominado espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS). O fenômeno SERS foi observado por Fleischmann *et al.*⁵² trabalhando com eletrodos de Ag em 1973 e 1974⁵². Porém, implicações mais significativas destas observações não foram reconhecidas até 1977 quando os grupos de Van Duyne⁵⁰ e Albrecht e Creighton⁵³ publicaram trabalhos independentes. Van Duyne fez uma revisão dos trabalhos deste período⁵⁴ e a partir de então inúmeros estudos passaram a ser publicados relatando este fenômeno. O

mecanismo de amplificação, em última análise, é atribuído à intensificação do campo eletromagnético na superfície de determinados metais (denominado mecanismo eletromagnético)^{5,51}. A superfície de um condutor possui ressonâncias eletromagnéticas chamadas plasmas de superfície cuja origem está na oscilação coletiva da nuvem eletrônica do metal. Um *plasmon* corresponde a um *quantum* de energia proveniente do plasma de superfície excitado pela radiação eletromagnética. Quando o plasma de superfície é excitado por uma radiação incidente, pode haver um acoplamento da oscilação coletiva dos elétrons da superfície metálica com a radiação eletromagnética produzindo um intenso campo elétrico evanescente no local em uma superfície rugosa (ou em nanopartículas), sendo esse responsável pela intensificação do sinal Raman^{5,51,55}.

No caso das nanopartículas, fatores como tamanho, forma, agregação, funções dielétricas do metal e do meio, e a frequência da radiação de excitação influenciam no fator de amplificação do sinal Raman (SERS). Nanopartículas metálicas de Au, Ag ou Cu são normalmente aplicadas com radiações excitantes (lasers) na faixa do visível^{5,51}. Para moléculas alvo nos interstícios das nanopartículas, o fator de amplificação pode chegar até 10^{10} (regiões chamadas *hot spots*), de forma que até moléculas individuais podem ser detectadas (SMD, do inglês *single molecule detection*)⁵⁶⁻⁵⁸. Em alguns casos, pode ocorrer uma mudança nas propriedades ópticas da espécie adsorvida ou até mesmo a interação química desta espécie com a superfície metálica, o que também contribuiria para a amplificação do sinal Raman (denominado efeito químico)^{5,51}. Em nosso grupo de pesquisa temos trabalhado com SERS desde 2000 a partir de monocamadas Langmuir-Blodgett (LB) de derivados de perileno depositadas sobre filmes evaporados de Ag. Estes filmes cuja espessura é em torno de 6 nm dão origem a um substrato SERS recoberto por ilhas de prata com diâmetros entre 20 e 80 nm⁵⁸. Isto abriu perspectivas para os trabalhos envolvendo SMD tanto a partir de monocamadas LB sobre tais filmes

evaporados^{58,59}, bem como coloides de Ag ou Au⁶⁰ aplicados na detecção do fungicida carbendazim⁶¹ e do parasiticida tiabendazol⁶² via SERS. Associando a experiência de nosso grupo de pesquisa e os objetivos desta tese buscamos aplicar a técnica SERS como ferramenta analítica para outros pesticidas. Tal aplicação ainda é um desafio na área em virtude da dependência dos fatores de amplificação do sinal SERS com os vários aspectos mencionados acima envolvendo os substratos SERS em si, além dos mecanismos de adsorção das moléculas na superfície metálica. Neste contexto, aplicação analítica de SERS via sistemas coloidais, temos contato com a colaboração do Dr. Santiago Sánchez Cortés, CSIC, Madri, Espanha.

1.5. Sistemas de detecção dos herbicidas triazínicos via SERS

Aplicamos a técnica SERS para detectar os herbicidas PRM, AMT e ATZ em baixas concentrações (ppb) usando AgNP em sistemas coloidais. Geralmente, técnicas como cromatografia líquida de alta performance (HPLC) são utilizadas como método analítico de detecção dos herbicidas triazínicos em baixas concentrações ($\sim \mu\text{M}$)⁶³. Buscando técnicas alternativas para explorar métodos sensíveis e seletivos, nosso grupo relatou⁶⁴ a detecção da PRM por SERS usando AgNP, porém, neste caso, não foi realizado uma análise quantitativa. O trabalho detectou a PRM em sistemas de amostras mais próximas às reais, com dispersão desse herbicida em água de torneira. A técnica de projeção multidimensional foi aplicada para discriminar diferentes concentrações do herbicida, na ordem de 10^{-9} mol/L (ou 10^{-12} mol/L usando água ultrapura). A técnica SERS ainda permanece um desafio como ferramenta analítica devido ao fato de que a detecção é mediada pela adsorção molecular na superfície e isso pode causar uma eventual agregação do coloide, levando a flutuações na intensidade do sinal. No entanto, em concentrações relativamente baixas, o efeito da agregação pode ser minimizado. Como já mencionado, a eficiência do fenômeno SERS como ferramenta analítica está

relacionada ao tamanho, forma e agregação de nanopartículas metálicas, que estão na origem do fator de amplificação do sinal Raman, levando ao sinal SERS^{5,51,55}. Portanto, o conhecimento sobre o mecanismo de interação entre adsorbato em análise e o metal é um importante fator no desenvolvimento de plataformas de detecção mais eficientes baseadas no efeito SERS. Nesse sentido, o pH é um importante agente que pode modificar a afinidade da adsorção molecular na superfície^{65,66}

A interação entre os herbicidas triazínicos e a superfície metálica foi estudada usando cálculos teóricos e espectros experimentais de SERS^{67,68}. Por exemplo, Costa *et al.*⁶⁹ relatam uma dependência da adsorção de atrazina e simazina em uma superfície metálica. Enquanto locais semelhantes de interação foram observados para ambas as moléculas usando nanopartículas de ouro, para as AgNP o local de interação foi diferente. Já a simazina adsorve na superfície da Ag, de preferência via nitrogênio na posição 3 do anel triazina (definição IUPAC) e a atrazina via nitrogênio na posição 5. Por outro lado, Bonora *et al.*⁷⁰ relatam interação da atrazina com as AgNP via nitrogênio na posição 1 do anel triazina. Além disso, eles sugerem dois locais para interação entre PRM e AgNP: nitrogênio na posição 3 ou 5, sendo este último mais provável. Um problema inerente aos pesticidas triazínicos em geral, é a degradação que esses compostos sofrem. Esta degradação envolve um processo de desalquilação tornando esses analitos parcial ou completamente ausentes de suas cadeias laterais alifáticas^{4,71,72} quando exposto à luz ou temperatura superior a 30°C^{4,17}.

Nesta tese, pretendemos superar as deficiências observadas na detecção de pesticidas triazínicos explorando a análise quantitativa de PRM, AMT e ATZ usando SERS. Para isso, tentamos otimizar a análise da PRM, AMT e ATZ explorando os espectros SERS em diferentes pHs e concentrações, além de considerar possíveis processos de degradação destes herbicidas, seja no material armazenado, ainda antes do processo de

medidas, e/ou ao longo do processo de medida. Dessa forma, o controle da síntese do coloide de Ag é uma etapa crucial, tornando as AgNP reprodutíveis em termos de tamanho e forma, de lote para lote, como anteriormente realizado pelo nosso grupo para o fungicida carbendazim⁷³. O mecanismo de interação entre as moléculas de PRM, AMT e a superfície da Ag também foi investigado considerando as diferentes espécies químicas que podem ser adsorvidas na superfície das AgNP.

1.6. Objetivos

Esta tese tem dois objetivos gerais:

i) Determinar os efeitos dos herbicidas AMT, ATZ e PRM sobre monocamadas e bicamadas de DPPC como sistemas miméticos simples da estrutura lipídica da membrana plasmática utilizando filmes de Langmuir (monocamadas) e GUVs (bicamadas). Tais efeitos são estudados por meio de isotermas π -A, BAM e PM-IRRAS para as monocamadas, e microscopia de contraste de fase para as GUVs.

ii) Detecção dos herbicidas AMT, ATZ e PRM por meio da técnica SERS. Neste caso, os herbicidas são diluídos em sistema coloidal de AgNP com o objetivo de quantificá-los através de curvas analíticas a partir da adsorção dos herbicidas sobre a superfície das AgNP obtendo seus limites de detecção (LOD), tendo como referência os limites máximos de resíduo permitidos pelas agências reguladoras.

Abaixo estão listadas as etapas específicas desenvolvidas para atingir-se os objetivos gerais:

i) Isotermas π -A de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM na subfase em concentrações de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L.

ii) Projeção multidimensional agrupando por semelhança as isotermas π -A de DPPC para diferentes concentrações (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L) de AMT, ATZ e PRM na subfase.

- iii) Imagens de BAM para filmes de Langmuir de monocamadas de DPPC na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM na concentração de 10^{-5} mol/L na subfase.
- iv) Medida de ciclos de compressão – descompressão, estabilidade e o módulo compressional (C_s^{-1}) de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM em concentração de 10^{-5} mol/L.
- v) PM-IRRAS para monocamadas de DPPC na ausência e na presença de AMT, ATZ e PRM na concentração de 10^{-5} mol/L na subfase.
- vi) Imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM na concentração 10^{-5} mol/L, no intervalo de tempo até 30 min.
- vii) Síntese e caracterização do coloide de Ag na ausência e na presença da AMT, PRM e ATZ por meio das técnicas TEM, absorção no UV-Vis, potencial zeta, DLS, espalhamento Raman.
- viii) Espectros SERS dos herbicidas diluídos no coloide de Ag em distintos pH.
- ix) Análise quantitativa dos herbicidas por meio dos espectros SERS.

Capítulo 2

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Prometrina (PRM, $C_{10}H_{19}N_5S$, massa molar = 241,2 g/mol), Ametrina (AMT, $C_9H_{17}N_5S$, massa molar=227,33 g/mol), Atrazina (ATZ, $C_8H_{14}ClN_5$, massa molar=215,68 g/mol), cloridrato de hidroxilamina ($NH_2OH \cdot HCl$, massa molar = 69,49 g/mol, 99 %), nitrato de potássio (KNO_3 , massa molar = 101,10 g/mol, 99 %), Nitrato de Ag ($AgNO_3$, massa molar = 169,87 g/mol, 99 %) e hidróxido de sódio ($NaOH$, massa molar = 40,00 g/mol, 97 %) foram adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich. Os dados referentes aos herbicidas PRM, AMT e ATZ também são mostrados na forma de Tabela (Tabela II) para melhor visualização. Todas as soluções estoques dos herbicidas foram preparadas com etanol (absoluto) obtido da VWR, Prolab. O fosfolipídio zwitteriônico L- α -1,2-dipalmitoil-sn-3-glicero-fosfatidilcolina (DPPC, $C_{44}H_{80}NO_8P$, massa molar = 782,08 g/mol) foi comprado da Avanti Polar Lipids Inc. A água ultrapura foi obtida de um sistema de água Milli-Q (resistividade de 18,2 M Ω .cm e pH ~5,6). A Figura 7 mostra as estruturas moleculares dos herbicidas (PRM, AMT e ATZ) em sua forma neutra e do fosfolipídio DPPC.

Tabela II: dados dos herbicidas PRM, AMT e ATZ.

	Solubilidade em água	Massa Molar	Formula Estrutural	Pureza	Marca
Prometrina	33 mg/L	241, 36 g/mol	$C_{10}H_{19}N_5S$	98,8 %	Fluka
Ametrina	200 mg/L	227,33 g/mol	$C_9H_{17}N_5S$	98,8 %	Fluka
Atrazina	33 mg/L	215, 68 g/mol	$C_8H_{14}ClN_5$	98,8%	Fluka

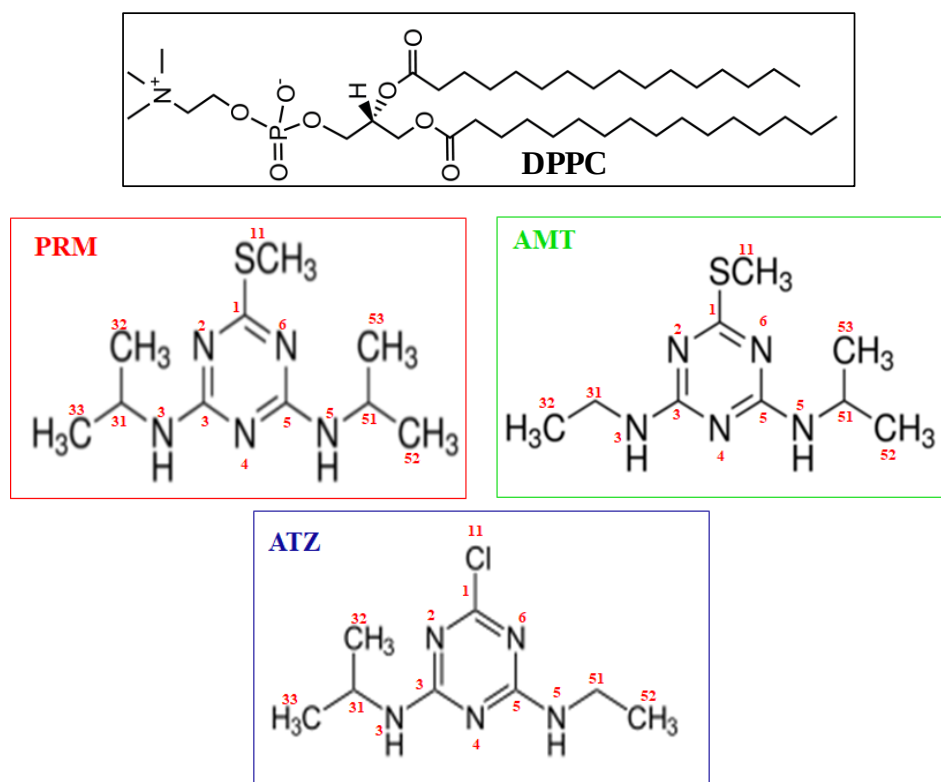


Figura 7: estruturas moleculares do DPPC, PRM, AMT e ATZ. As numerações representam os modos vibracionais relacionados às bandas dos espectros Raman/SERS.

2.2. Fabricação dos filmes de Langmuir

Filmes de Langmuir foram fabricados para o fosfolípido DPPC na ausência (Figura 8a) e na presença (Figura 8b) dos herbicidas AMT, ATZ e PRM já dissolvidos na subfase aquosa em diferentes concentrações (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L), a fim de verificar a influência desses herbicidas na formação da membrana. Os filmes foram produzidos em uma cuba de Langmuir KSV, modelo mini-micro, equipada com um sensor de Wilhelmy e barreiras móveis para a compressão do filme, com volume da subfase de 48 mL. A água ultrapura (resistividade de 18,2 MΩ.cm, pH ~5,6) para a subfase foi obtida a partir de um sistema Milli-Q, modelo Simplicity. Testes iniciais foram realizados para determinar alguns parâmetros, tais como: concentração da solução de DPPC (0,5 mg/mL), volume espalhado de DPPC (25 µL), velocidade das barreiras (10 mm/min), tempo de espera para evaporação do solvente clorofórmio utilizado na solução de DPPC

(15 min). Em relação à presença dos herbicidas na subfase, os parâmetros foram: adição de uma alíquota de solução estoque de herbicida (AMT, ATZ ou PRM) com volume e concentração de i) 48 μL a $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L, ii) 48 μL a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, e iii) 5 μL a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, obtendo subfases da ordem de concentrações de herbicidas a i) 10^{-5} mol/L, ii) 10^{-6} mol/L e iii) 10^{-7} mol/L, respectivamente. As soluções estoque dos herbicidas foram preparadas e, adicionadas na cuba de Langmuir (subfase: 210 mL). Em seguida, foram espalhados cerca de 25 μL de DPPC (0,5 mg/mL) na cuba. Esperou-se por volta de 15 minutos para evaporar o solvente orgânico e assim começar as isotermas π -A.

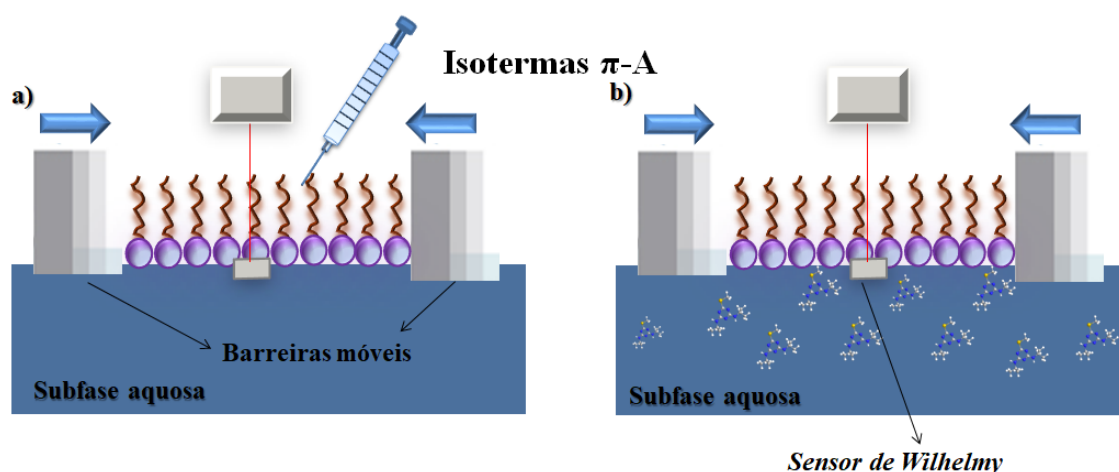


Figura 8: ilustração do filme de Langmuir de DPPC mostrando a compressão das barreiras até a fase condensada (30 mN/m) na a) ausência e na b) presença de herbicida na subfase. Acessórios como as barreiras móveis e o sensor de Wilhelmy também estão representados.

2.3. Ciclos de compressão - descompressão

Os filmes de Langmuir foram produzidos em uma cuba de Langmuir KSV, modelo mini-micro. Inicialmente para o filme de DPPC puro foi preenchida a cuba com um volume de 210 mL de água ultrapura, posterior a isso foram espalhados 35 μL de DPPC (0,5 mg/mL). Já para os filmes de DPPC na presença dos herbicidas foram preparadas soluções contendo AMT, ATZ e PRM (separadamente), adicionadas na cuba de Langmuir (subfase: 210 mL). Em seguida, foram espalhados cerca de 35 μL de DPPC

(0,5 mg/mL) na cuba. Esperou-se por volta de 15 minutos para evaporar o solvente orgânico e assim começar os ciclos de compressão-descompressão até a pressão de superfície 30 mN/m (fase condensada). Os ciclos de compressão e de descompressão dos filmes de Langmuir foram monitorados via isotermas π -A e realizados com o intuito de verificar a presença do fenômeno de histerese, podendo revelar a capacidade de empacotamento do fosfolipídio no filme de Langmuir.

2.4. Estudo da estabilidade dos filmes

A estabilidade do filme de Langmuir foi realizado com uma solução de DPPC (0,5 mg/ml) espalhada na superfície aquosa, na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM (10^{-5} mol/L). Após 15 minutos, as barreiras foram comprimidas até o filme apresentar uma pressão de superfície de 30 mN/m. Esta pressão de superfície foi mantida constante pela movimentação compensatória das barreiras (controladas pelo computador) durante o tempo determinado do experimento, por volta de 5500 segundos. A estabilidade do filme foi avaliada pela variação da área média ocupada pelas moléculas na superfície em função do tempo.

2.5. Módulo compressional (C_S^{-1})

A análise do fator de compressibilidade (C_S) ou módulo compressional (C_S^{-1}) foi realizada a partir dos dados das isotermas π -A de DPPC (0,5 mg/mL) na ausência e na presença dos herbicidas (10^{-5} mol/L). O processo para obtenção dos valores de C_S^{-1} foi de acordo com a Equação 1. Os gráficos foram adquiridos plotando o C_S^{-1} em função da pressão de superfície.

$$C_S^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \text{ (eq.1)}$$

Sendo π a pressão de superfície, A à área molecular média. Essa relação é proporcional à inclinação da curva π -A, ou seja, quanto maior o aumento da pressão de

superfície devido a uma compressão durante a isoterma π -A, maior será o valor de C_S^{-1} , logo, maior será a rigidez da monocamada.

2.6. Análise de dados: projeção multidimensional

As isotermas π -A foram tratadas usando uma técnica de projeção, na qual os dados de um espaço multidimensional são projetados em um plano considerando as semelhanças (e as diferenças) no conjunto de dados. A flexibilidade dessa abordagem de otimização surge da disponibilidade de várias funções de custo (ou erro) para colocar os marcadores gráficos em 2D. Aqui aplicamos os mapeamentos chamados de Sammon e *Interactive Document Map* (IDMAP),⁷⁴ cujas funções de erro são dadas:

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

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

$$S_{IDMAP} = \frac{\delta(x_i, x_j) - \delta_{\min}}{\delta_{\max} - \delta_{\min}} - d(y_i, y_j) \quad (\text{eq.3})$$

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

2.7. Microscopia de ângulo de Brewster (BAM) e PRM-IRRAS

As medidas de BAM foram realizadas no IFSC/USP em colaboração com o professor Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr no grupo de Polímeros Bernhard Gross. O equipamento multiusuário (EP4SE) elipsômetro com imageamento e opção para filmes de Langmuir e microscopia de ângulo de Brewster está instalado em uma sala limpa do grupo de Polímeros Bernhard Gross, IFSC/USP. O equipamento está acoplado a uma cuba de Langmuir KSV, modelo mini *trough*, cujo volume da subfase é de 120 mL e possui uma lente ultra objetiva para microscopia de ângulo de Brewster (BAM) em filmes de Langmuir. Imagens de BAM foram obtidas para os filmes de Langmuir de

DPPC na ausência e na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM (com concentração final de 10^{-5} mol/L) na subfase aquosa. Para a formação da monocamada de Langmuir foram espalhados 40 μ L da solução de DPPC (0,5 mol/L) na interface ar/água e para a monocamada de DPPC na presença dos herbicidas foram adicionados 120 μ L de solução estoque de herbicida ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) na subfase. A Figura 9a mostra uma imagem do equipamento elipsômetro EP4SE.

As medidas de PM-IRRAS também foram realizadas no IFSC/USP em colaboração com o professor Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr no grupo de Polímeros Bernhard Gross. As medidas foram realizadas em filmes de Langmuir com o objetivo de estudar a interação de monocamadas de DPPC na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM na subfase aquosa da cuba de Langmuir. As medidas foram obtidas em um equipamento modelo PM1550 da KSV Instruments (Finlândia), que conta com uma lâmpada de carbeto de silício (Globar) como fonte de luz IV, e um modulador de polarização fotoelástico composto por um cristal de ZnSe (operando em 50 KHz), um detector de HgCdTe (MCT), modelo PCI-3TE-10.6 com área ativa de $1 \times 1 \text{ mm}^2$. Todas as medidas foram realizadas com ângulo de incidência de 80° e a temperatura de 23°C . A Figura 9b mostra uma imagem do equipamento acoplado a uma cuba de Langmuir modelo mini trough.

a) BAM



b) PRM-IRRAS



Figura 9: a) elipsômetro EP4SE acoplado a uma cuba de Langmuir modelo mini trough para as medidas de BAM. b) imagem digital do equipamento utilizado para as medidas de PM-IRRAS.

2.8. *Preparação das vesículas unilamelares gigantes (GUVs)*

A eletroformação das GUVs, foi detalhada pela primeira vez por Angelova⁷⁵, consiste na aplicação de um campo elétrico em um filme hidratado para formar vesículas esféricas utilizando a molécula desejada, neste caso o fosfolipídio DPPC. Para isto, as GUVs foram crescidas por meio do método de eletroformação, utilizando um substrato de ITO (eletrodo de vidro recoberto com óxido de estanho dopado com índio) como base condutora. A superfície dos substratos foi limpa com água Milli Q, álcool isopropílico e clorofórmio, o espaçador de teflon foi limpo da mesma maneira. Em cada superfície do ITO foram espalhados 10 μ L do fosfolipídio DPPC, com concentração de 1 mmol/L, e esperou-se evaporar o solvente volátil em bomba de vácuo por uma hora. Posterior a esse passo, foi montada a célula para eletroformação como é mostrada na Figura 10a. A célula foi preenchida com uma solução de sacarose de concentração 0,2 mol/L. Foi utilizada uma fonte de tensão AC (corrente alternada) modelo Minipa MFG-4202 *Function Signal Generator*, sendo aplicada sobre a célula hidratada com uma tensão de 1V e frequência de 10 Hz, por um período de uma hora (Figura 10b). Por fim, as GUVs foram formadas (Figuras 10b e 10c) e removidas da célula com muito cuidado por meio de uma microsseringa, colocando-as em uma *eppendorf*. É de suma importância lembrar que as GUVs de DPPC foram eletroformadas na temperatura de 50°C devido à temperatura de transição da fase gel (L_β) para a fase líquido-cristalino (L_α) do DPPC ocorrer por volta dos 41°C.

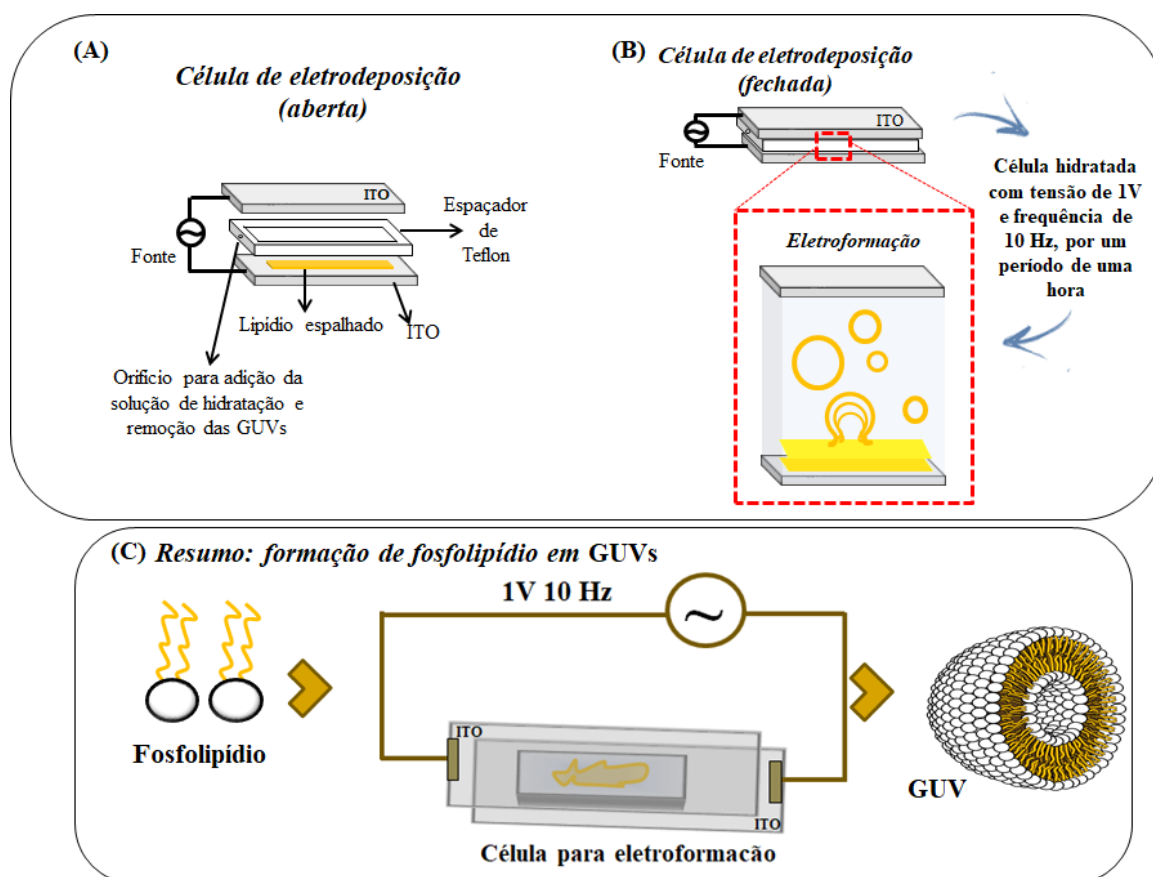


Figura 10: ilustração do esquema experimental da célula de eletroformação com placas de ITO e espaçador de Teflon. a) Representação da célula de eletroformação com fonte de tensão AC aberta e b) fechada durante o processo de eletroformação. c) Resumo dos procedimentos a e b em que através do fosfolipídio DPPC espalhado em uma célula para a eletroformação (1V, 10Hz) forma as GUVs.

2.9. Microscopia de contraste de fase

As medidas de microscopia de contraste de fase foram realizadas em um microscópio de fluorescência confocal da marca Nikon, modelo C2/C2si. A Figura 11 mostra o equipamento, que está instalado no departamento de Física da Unesp de Presidente Prudente. O equipamento, além das imagens por contraste de fase, permite realizar medidas de fluorescência confocal. A caracterização foi realizada em temperatura ambiente (23 °C), com lente de 40x e abertura numérica 0,6 para os vídeos e imagens coletadas no momento do experimento. As alíquotas das amostras foram colocadas sobre uma lamínula do tipo Ibidi μ -Slide 8 Well Glass Bottom, adicionando-

se 200 μL de uma solução de glicose com concentração de 0,2 mol/L. Foram realizadas medidas utilizando a concentração dos herbicidas (AMT, ATZ e PRM) $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Em cada medida foi adicionado um volume de 10 μL dos herbicidas, sendo todos de uma mesma solução estoque do poluente de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Em seguida, a amostra foi agitada para garantir a homogeneidade do poluente na solução. Após a agitação, foram adicionados 50 μL da amostra de DPPC das GUVs na lamínula. A partir deste ponto as GUVs foram encontradas o mais rápido possível para evitar que as vesículas interagissem com o poluente antes de estarem em foco (tempo este menor que um minuto), sendo assim iniciada a gravação do vídeo durante um intervalo de tempo de 30 min. Foi realizada uma análise quantitativa das GUVs afetadas pela presença dos herbicidas. Além dos vídeos (3 vídeos), uma série de imagens foram capturadas após o término das gravações (por volta de 14 imagens para cada vídeo realizado), de forma que se obtiveram imagens que continham o máximo de GUVs possível. Tais GUVs foram contadas e separadas por tamanho ($> 30 \mu\text{m}$, entre 10 e $30 \mu\text{m}$ e menores que $10 \mu\text{m}$), de modo que se obteve a porcentagem das vesículas afetadas.

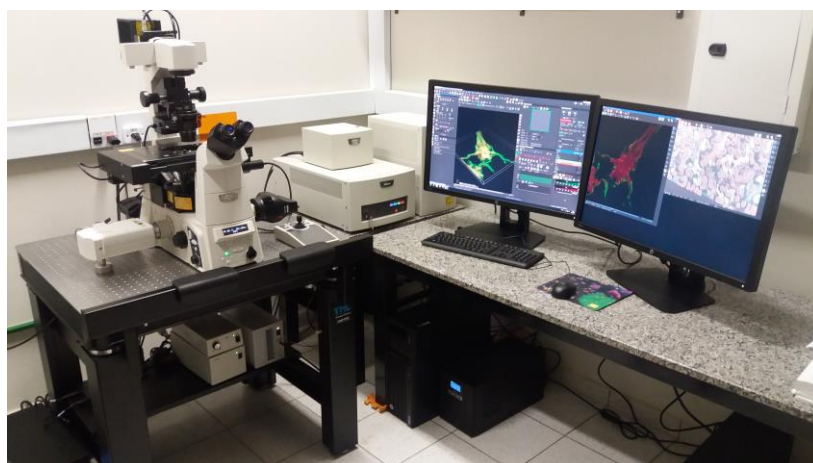


Figura 11: imagem do microscópio confocal Nikon, modelo C2/C2si.

2.10. Purificação dos herbicidas: PRM e ATZ

Os pós da PRM e ATZ foram purificados para remover impurezas solúveis em água. O processo de purificação foi realizado da seguinte maneira: 7,0 mg de PRM ou ATZ em pó foram colocados em um eppendorf com água, o mesmo foi agitado e centrifugado por 3 minutos. Em seguida, o sobrenadante (contendo impurezas) foi removido e etanol foi adicionado ao resíduo sólido para obter soluções de PRM ou ATZ na concentração desejada. O método de purificação adotado é mostrado na Figura 12e foi semelhante ao trabalho de Rubira *et al.*⁴. No caso da AMT não foi necessário utilizar este método de purificação, pois o herbicida apresentou sinal SERS semelhante ao Raman do pó do material comprado.

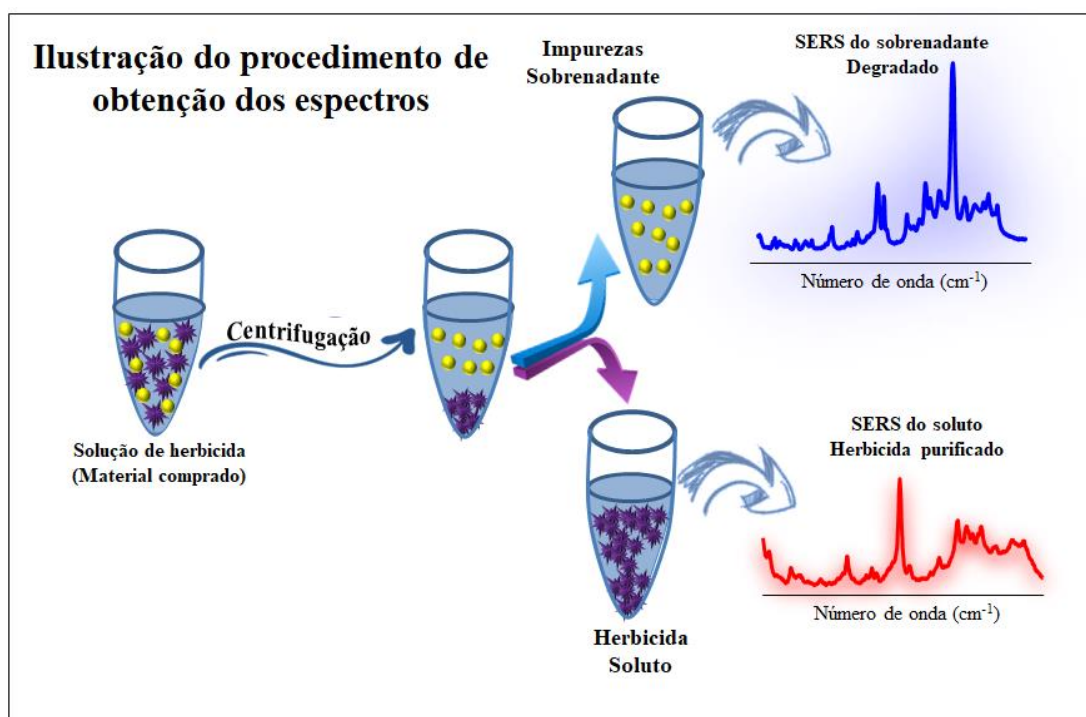


Figura 12: ilustração do método adotado para a obtenção dos espectros SERS dos herbicidas PRM e ATZ purificados (sem degradação). Método semelhante ao trabalho de Rubira *et al.*⁴.

2.11. Síntese do coloide de Ag

O procedimento adotado para sintetizar o coloide de Ag (acarretando nas AgNP) foi o mesmo descrito por Leopold e Lendl⁷⁶. Basicamente, o método consiste em adicionar 300,0 µL de hidróxido de sódio (1,0 mol/L) em 90 mL de solução aquosa de cloridrato de hidroxilamina ($1,66 \times 10^{-3}$ mol/L) sob agitação. Em seguida, 10,0 mL da solução aquosa de nitrato de Ag ($1,0 \times 10^{-2}$ mol/L) foram adicionados a esta mistura, gota a gota sob agitação por 10 minutos. Finalmente, a suspensão coloidal em temperatura ambiente descansou por pelo menos 24 horas, antes de iniciar os experimentos.

2.12. Medidas de potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As medidas de potencial zeta e de DLS foram realizadas usando o equipamento ZetaSizer 3000 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 e DLS foram realizadas no grupo do professor Dr. Eloi da Silva Feitosa da UNESP, Campus de São José do Rio Preto. No primeiro instante foram realizadas medidas de potencial zeta e DLS das AgNP na ausência dos herbicidas. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo, onde foram adicionados 2 mL do coloide de Ag. Em seguida foram adicionados 100 µL dos herbicidas em 2 mL de AgNP para as medidas de potencial zeta e DLS. A concentração final da solução de AgNP + herbicida foi de $1,1 \times 10^{-4}$ mol/L. A Figura 13 ilustra um esquema do coloide de Ag e suas respectivas características, como a camada de contra-íons junto à faixa negativa formada pelo íon cloro (Cl) do agente redutor cloridrato de hidroxilamina⁵. Assim, forma-se uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido, que dá origem ao potencial zeta.

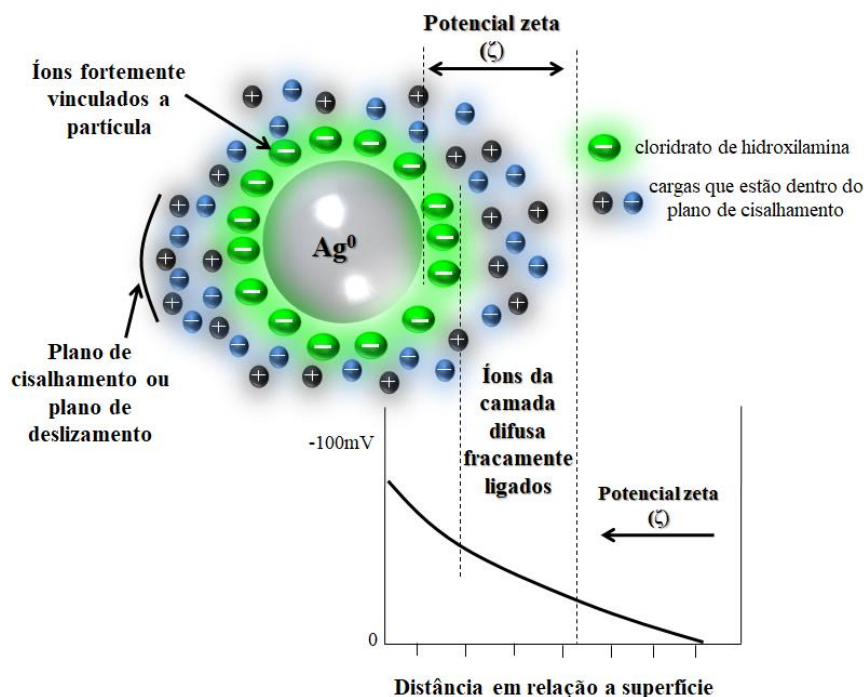


Figura 13: ilustração da dupla camada elétrica e do potencial zeta do colóide de Ag reduzido com cloridrato de hidroxilamina. Imagem adaptada de Aroca⁵.

2.13. Extinção no UV-Vis

Os espectros de extinção no UV-Vis foram coletados em um espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50, na região de 190 a 1100 nm. As medidas foram realizadas para o colóide de Ag na ausência e na presença dos herbicidas PRM, AMT e ATZ na concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L. Funções Gaussianas e Lorentzian foram usadas para ajustar os espectros por meio do software GRAMMS, e obter parâmetros como o número de onda e/ou o máximo da banda. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo (1cm de caminho óptico).

2.14. Raman e SERS: PRM, AMT e ATZ em diferentes pH

Os espectros Raman e SERS foram coletados usando um espectrógrafo micro-Raman Renishaw In-Via equipado com uma câmera CCD, a linha de laser utilizada foi de 514,5 nm e uma rede de difração com 1800 l/mm. Os espectros SERS da PRM, AMT e ATZ foram obtidos pela adição de uma alíquota de 970,0 µL de colóide Ag (solução padrão) em uma cubeta com subsequente adição de 20,0 µL de KNO₃ (0,5 mol/L). A Figura 14 mostra

o procedimento experimental para a obtenção dos espectros SERS. A mistura foi agitada (durante 3 segundos) para induzir agregação do coloide. Finalmente, 10,0 μL da solução de PRM, AMT ou ATZ com a concentração desejada foram adicionados à cubeta e agitados novamente. As medidas SERS foram realizadas com foco do feixe de laser no interior da cubeta (1,0 cm $\times$ 1,0 cm) contendo coloide de Ag + KNO_3 + Herbicida (Figura 14b). Este procedimento foi repetido, independentemente, três vezes para cada concentração, usando o mesmo lote de coloide de Ag.

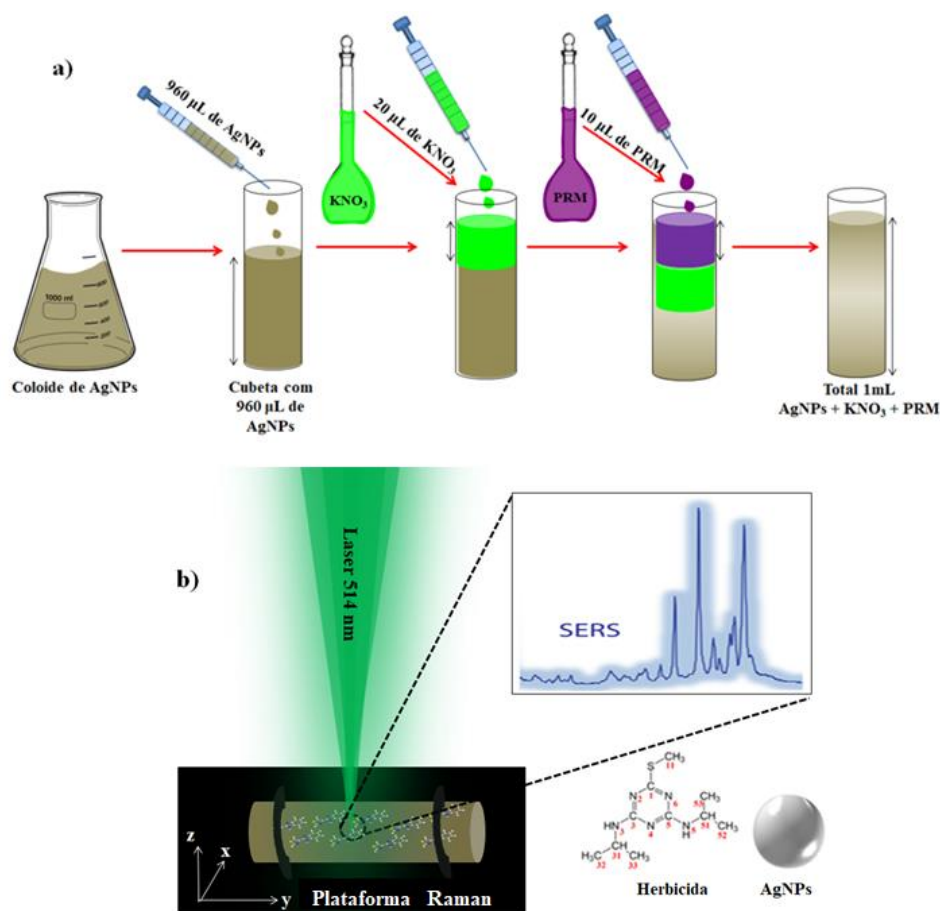


Figura 14: procedimento experimental para a obtenção dos espectros SERS dos herbicidas em coloide de Ag.

O estudo do pH para os compostos PRM e AMT foi realizado usando uma faixa de pH de 1 a 11. Os pHs 1, 2, 3 e 4 foram alcançados pela adição de diferentes volumes (20, 8,5, 3,0 e 2,0 μL) de HNO_3 (1,0 mol/L) e os pHs 6, 7, 8, 9, 10 e 11 foram ajustados por adição (1,2, 1,8, 2,1, 4, 5, 6 e 50,0 μL) de NaOH (2,0 mol/L). No caso da ATZ, as medidas de

SERS foram realizadas a pH de 1.5, alcançado por meio da adição de 14 μL de HNO_3 (1,0 mol/L). Os volumes de HNO_3 e NaOH mencionados acima para a faixa de pH 1 a 11 foram adicionados ao coloide de Ag. Posterior a isso, houve a adição dos herbicidas (PRM e AMT), e por fim os valores de pH foram confirmados/medidos usando uma tira indicadora de pH (MColorpHast, Merck).

2.15. Análise quantitativa SERS

A análise quantitativa foi realizada pela média dos valores de intensidade de determinadas bandas dos espectros SERS obtidos a partir de um conjunto de três medidas para cada concentração. Duas metodologias foram adotadas: i) um padrão interno (banda da água em aproximadamente 3400 cm^{-1}) foi empregado para compensar as possíveis variações produzidas pela agregação intrínseca das nanopartículas. Assim, a área integrada da banda SERS mais intensa do herbicida em 965 cm^{-1} , atribuída ao modo de respiração do anel triazínico, foi normalizada em relação à banda de água que aparece em aproximadamente 3400 cm^{-1} (atribuída ao estiramento O-H). ii) Como procedimento alternativo ao emprego do padrão interno, foi construída uma curva analítica considerando apenas a área absoluta da banda atribuída ao anel triazínico (965 cm^{-1}), ou seja, sem o processo de normalização com o padrão interno (banda da água).

No caso da PRM, a análise quantitativa foi realizada em diferentes pHs. Duas regiões de diferentes pHs foram investigadas, onde a PRM é supostamente não hidrolisada, pHs 7 e 11, para testar a capacidade de detecção da técnica SERS em relação à protonação da PRM. O limite de detecção (LOD) foi estimado usando a equação $3\sigma/\text{sensibilidade}$, onde σ é a intensidade do ruído do branco e a sensibilidade é o coeficiente angular da reta obtida plotando “intensidade SERS vs concentração do herbicida”^{73,77,78}.

Os detalhes sobre como foi calculado o LOD para a PRM e a AMT são fornecidos abaixo. A Figura 15 mostra como os espectros SERS foram obtidos (em triplicatas) e o

destaque para as áreas das bandas centradas em 965 (PRM) e 3400 (água) cm^{-1} . Este procedimento da Figura 15 foi utilizado para ambos herbicidas (PRM nos pHs 7 e 11, e AMT pH 7). Além do mais, todas as tabelas utilizadas para realizar os cálculos do LOD estão presentes em forma de anexo nesta tese.

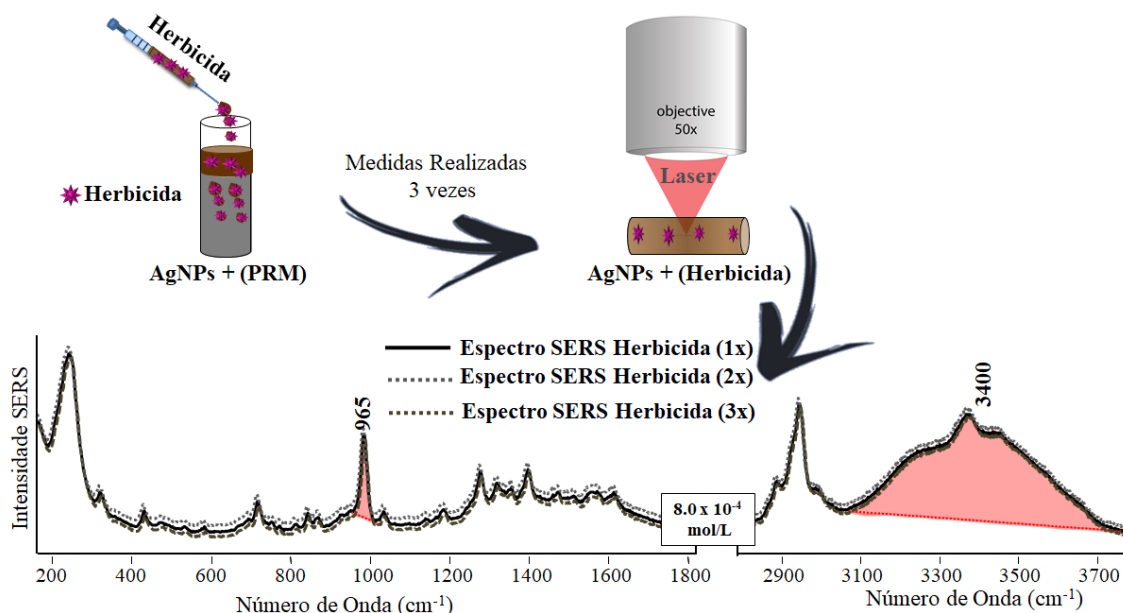


Figura 15: ilustração do procedimento para a construção da curva analítica. As áreas das bandas em 965 cm^{-1} (anel triazínico) e 3400 cm^{-1} (água) são destacadas.

A construção do gráfico do tipo “intensidade SERS vs concentração do herbicida” se deu da seguinte forma: foram tomados os valores das áreas integradas da banda do herbicida (965 cm^{-1}) e os valores das áreas integradas da banda da água (3400 cm^{-1}) de três medidas independentes (Tabelas I, IV e VI em anexo). Os valores da banda do herbicida foram normalizados (divididos) em relação à banda da água (Tabelas II, V e VII em anexo) e calculados a média e desvio padrão para as três medidas de cada concentração. Uma vez construído o gráfico (intensidade SERS vs concentração herbicida) com os valores médios (e os respectivos desvios padrão) foi determinado o intervalo linear da curva, ou seja, o intervalo em que a intensidade SERS é diretamente proporcional à concentração do herbicida. Uma vez obtida a equação da reta, o LOD foi determinado através da relação $3\sigma/b$, onde σ representa a intensidade do ruído do branco

no intervalo da banda em análise (cujos valores estão nas Tabelas III e VIII em anexo) e b é o coeficiente angular da reta, obtido através da linearização previamente realizada. No caso das curvas de concentração construídas a partir dos valores absolutos da área integrada do herbicida, a única etapa suprimida foi a normalização com a banda da água (padrão interno), sendo as demais realizadas da mesma maneira.

O LOD da PRM em pH 11 foi calculado de acordo com a equação: $LOD = 3\sigma/b$ (1). Utilizando a 4ª coluna da Tabela III (anexo) (razão (965)/(3400)) para desvio padrão, obteve-se $\sigma = 4,42831 \times 10^{-6}$. Ao traçar a "coluna média com o respectivo erro (eixo Y) vs a coluna de concentrações de PRM em pH 11 (eixo X)" presente na tabela II (anexo) uma relação linear é obtida na faixa de concentração de $6,0 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-6}$ mol/L. A partir dos valores da Tabela II, obtém-se o ajuste linear, a sensibilidade que é interpretada como a inclinação da curva ajustada ("b"). Portanto, usando a equação (1) encontramos o LOD:

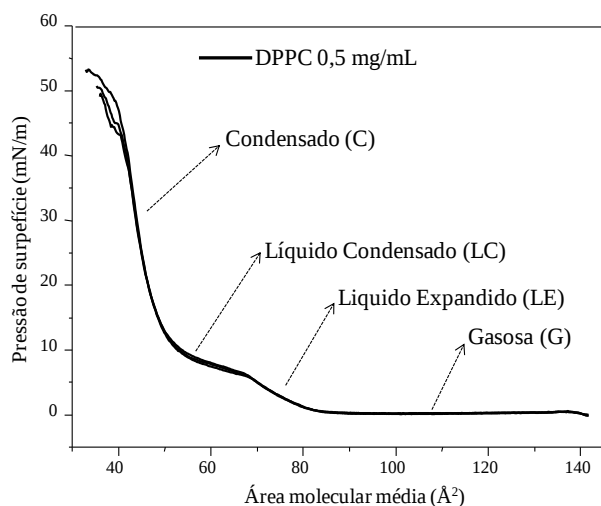
$$LOD = \frac{3.\sigma}{b} = \frac{3.(4,42831 \times 10^{-6})}{114} \approx 1,2 \times 10^{-7} \text{ mol/L}, \text{ ou } LOD \approx 28 \text{ ppb}.$$

Capítulo 3

3. Interação entre modelos de biomembrana baseados em filmes de Langmuir e vesículas unilamelares gigantes (GUVs) com AMT, ATZ e PRM

3.1. Filmes de Langmuir: monocamadas de DPPC na ausência e na presença de AMT, ATZ e PRM

A Figura 16 mostra isotermas π -A em triplicatas de DPPC com água ultrapura na subfase. As transições de fase, gasosa (G), líquida-expandida (LE), líquida-condensada (LC) e condensada (C) durante a compressão do filme de Langmuir para a monocamada do DPPC são delimitadas na Figura 16. Já a Figura 17 mostra as isotermas π -A de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas AMT (Figura 17a), ATZ (Figura 17b) e PRM (Figura 17c) variando as concentrações 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L. Ao lado das isotermas estão os gráficos dos valores de área expandida em função da pressão de superfície (com pontos de 5 em 5 mN/m) para AMT, ATZ e PRM em 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L. A área expandida trata-se da diferença entre a isoterma π -A de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas. A barra de erro no gráfico da área expandida representa a dispersão em



torno da média das três medidas (isotermas π -A).

Figura 16: isotermas π -A de DPPC (0,5 mg/mL) em subfase de água ultrapura realizadas em triplicatas.

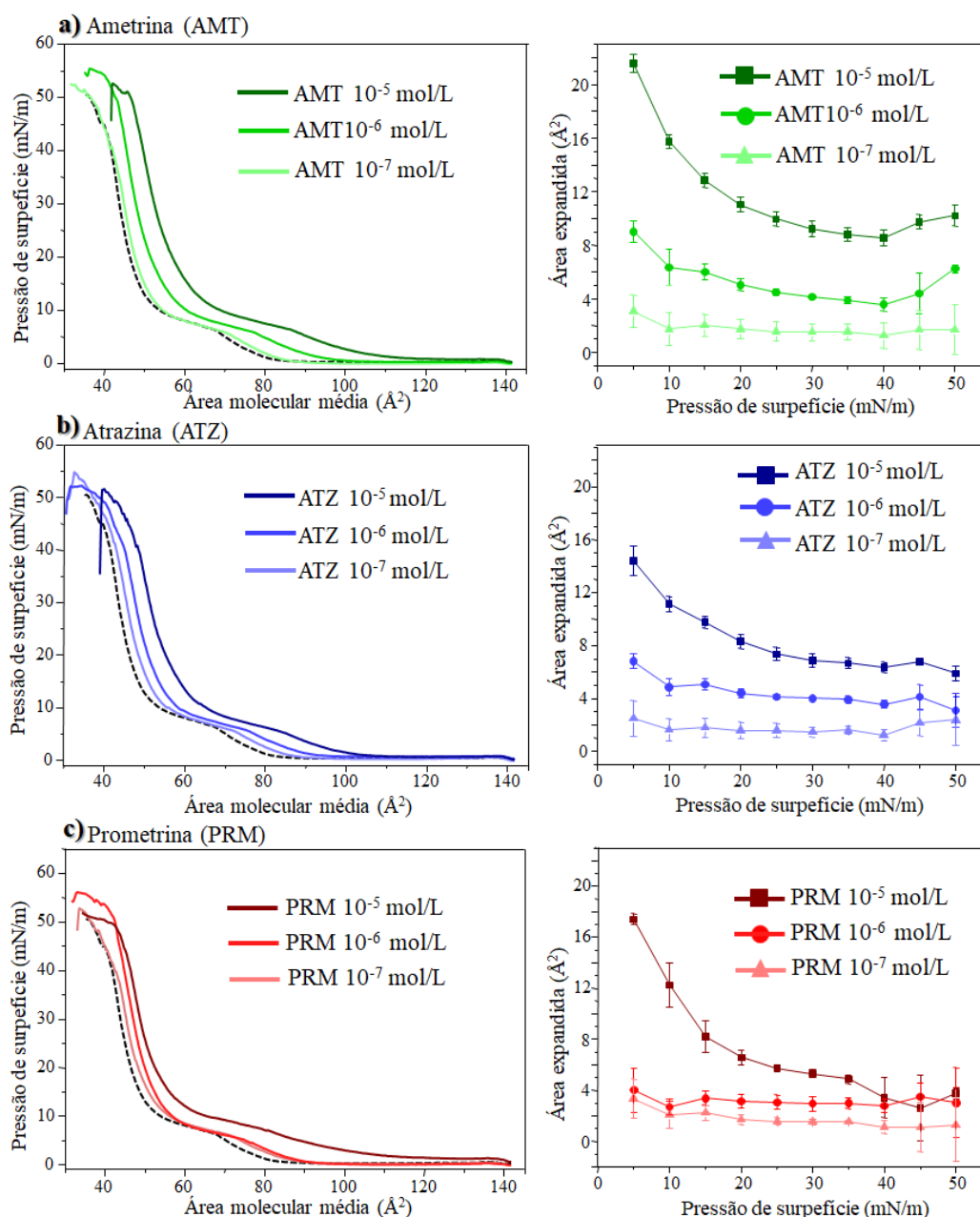


Figura 17: isothermas π -A obtidas espalhando-se 25 μL de solução de DPPC (linha pontilhada) (0,50 mg/mL) sobre subfases de água ultrapura contendo (a) AMT, (b) ATZ e (c) PRM nas concentrações 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L mantidas a 23°C , com velocidade das barreiras de 10 mm/min. A área expandida (área expandida ($\text{\AA}^2$) vs. pressão de superfície (mN/m)) é mostrada ao lado das isothermas π -A com a barra de erro que representa a dispersão em torno da média das três medidas (isothermas π -A).

As Figuras 16 e 17 das isothermas π -A de DPPC apresentam um patamar aproximadamente em 6 mN/m referente à transição de fase LE-LC. A pressão de colapso ocorre em torno de 50 mN/m com uma área molecular média de aproximadamente 59

Å². Esses resultados são consistentes com os reportados por Aoki *et al.*⁷⁹, entre outros^{80,81}. De modo geral, a presença dos herbicidas na subfase faz com que a isoterma π -A de DPPC se desloque para maiores valores de áreas de acordo com o aumento da concentração ($10^{-5} > 10^{-6} > 10^{-7}$ mol/L). Em concentrações de 10^{-5} e 10^{-6} mol/L todos os herbicidas causam deslocamentos nas isotermas π -A de DPPC para maiores valores de área. No entanto, ao abaixar a concentração do herbicida na subfase para 10^{-7} mol/L, não há alterações significativas nas isotermas π -A de DPPC. As isotermas π -A que se deslocam para maiores valores de áreas se deu para os herbicidas em concentração 10^{-5} mol/L, como esperado, pois existem quantidades maiores de moléculas para interagirem com o DPPC. Foi utilizada a análise de dados, por meio da técnica de projeção multidimensional. A técnica de projeção não considera apenas a distância entre as isotermas π -A, mas também o formato delas. Esta combinação afeta a distância entre os *clusters* na Figura 18. Esta outra ferramenta mostra a separação das concentrações ($10^{-5} > 10^{-6} > 10^{-7}$ mol/L) para cada herbicida na subfase (Figura 18). Na projeção multidimensional cada ponto dentro dos *clusters* significa uma isoterma π -A (esta análise foi realizada para triplicatas de isotermas π -A).

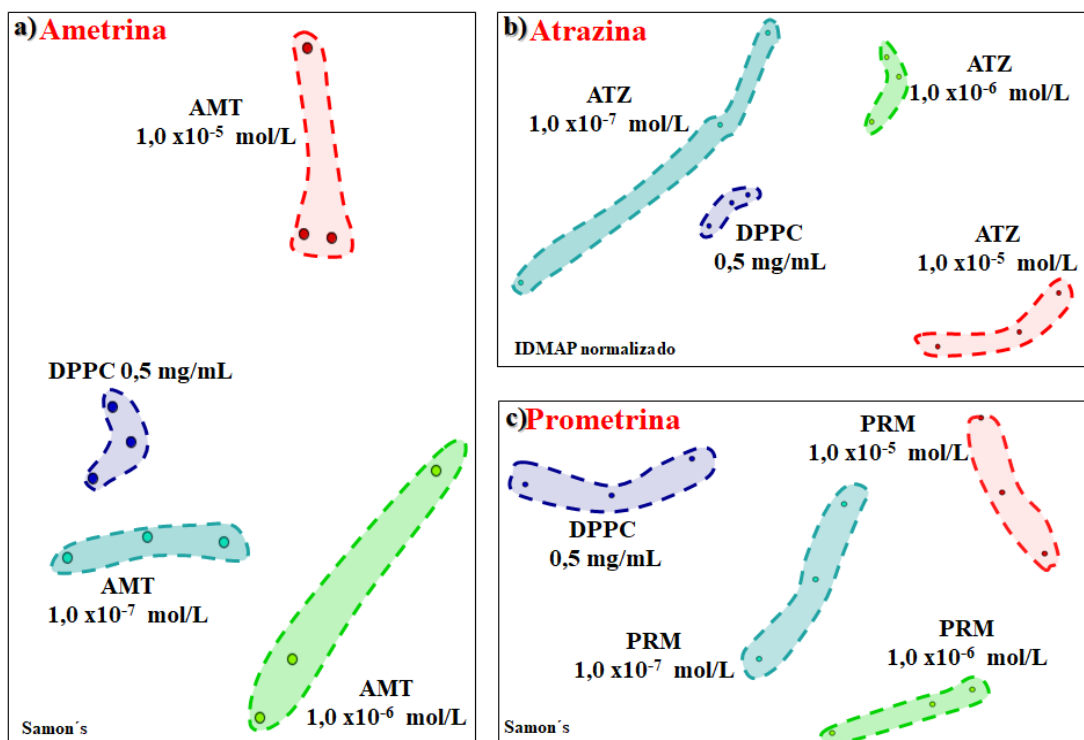


Figura 18: projeção multidimensional agrupando por semelhança as isotermas π -A de DPPC para diferentes concentrações (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L) de a) AMT, b) ATZ e c) PRM na subfase.

Nosso grupo de pesquisa tem aplicado a técnica de projeção na análise de curvas de impedância^{82,83} e espectros Raman^{84,85} em experimentos envolvendo análise sensorial (detecção de analitos distintos), principalmente nos casos em que os dados distinguem-se pouco uns dos outros. Foi realizada uma busca na literatura para verificar trabalhos que relacionam as isotermas π -A com a técnica de projeção, mas não foram encontrados. Portanto, até onde sabemos, esta é a primeira vez que se utiliza a técnica de projeção multidimensional em isotermas π -A. Este resultado corrobora com as isotermas π -A da Figura 17, pois auxilia a melhor comparar os deslocamentos das isotermas π -A para maiores valores de áreas quando monocamadas de DPPC estão com herbicidas na subfase. A Figura 18 mostra por meio de projeção que os herbicidas AMT, ATZ e PRM na subfase em concentração 10^{-5} mol/L têm uma maior distância em relação ao *cluster* de DPPC. Este resultado se relaciona com os obtidos na Figura 17 (isotermas π -A), pois é observado que quando os herbicidas estão com concentração de 10^{-5} mol/L na subfase

as isotermas π -A se deslocam para maiores valores de áreas (área expandida). Os *clusters* para concentração de herbicidas 10^{-7} mol/L na subfase estão próximos do *cluster* de DPPC na ausência do herbicida. Isto era esperado, pois a quantidade de herbicida na subfase é menor se comparada às concentrações (10^{-5} e 10^{-6} mol/L). No entanto, apesar da baixa concentração (10^{-7} mol/L), os *clusters* da AMT, ATZ e PRM claramente distinguem-se dos *clusters* de DPPC, mostrando que mesmo os herbicidas estando em 10^{-7} mol/L na subfase há a interferência na monocamada do fosfolipídio.

A seguir, a Figura 19 mostra qual herbicida (AMT, ATZ ou PRM) na subfase causa maior expansão de área para concentrações fixas. Portanto, a Figura 19 mostra isotermas π -A de DPPC na presença da AMT, ATZ e PRM, porém fixando as concentrações para 10^{-5} mol/L (Figura 19a), 10^{-6} mol/L (Figura 19b) e 10^{-7} mol/L (Figura 19c). Ao lado das isotermas π -A estão as áreas expandidas de DPPC na presença da AMT, ATZ e PRM para as concentrações de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L.

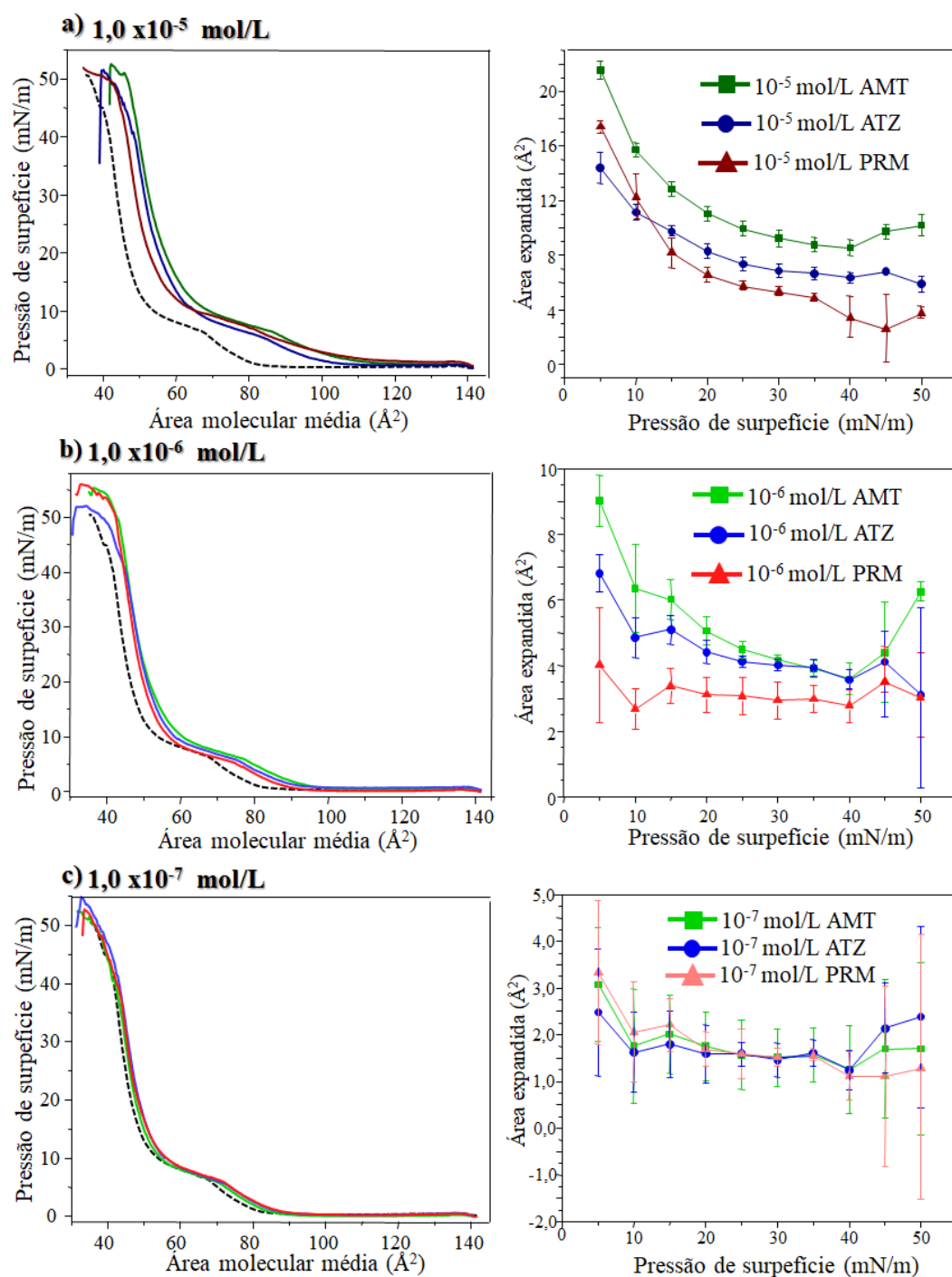


Figura 19: isothermas π -A de DPPC (linha pontilhada) (0,50 mg/mL) na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM nas concentrações 10^{-5} mol/L (a), 10^{-6} mol/L (b) e 10^{-7} mol/L (c). Ao lado das isothermas π -A é mostrada a área expandida ($\text{\AA}^2$) vs. pressão de superfície (mN/m). A barra de erro representa a dispersão em torno da média das três medidas (isothermas π -A).

A Figura 19a e 19b mostra que a AMT nas concentrações de 10^{-5} e 10^{-6} mol/L na subfase causa a maior expansão de área nas isothermas π -A do DPPC em relação aos

herbicidas ATZ e PRM. No entanto, todos os herbicidas demonstraram deslocamentos significativos das isotermas π -A para maiores valores de áreas nas concentrações 10^{-5} e 10^{-6} mol/L nos seus diversos estágios de compressão. Importante, mencionar que mesmo em pressão de superfície de 30 mN/m (fase condensada) os três herbicidas causam a expansão de área para as concentrações de 10^{-5} e 10^{-6} mol/L em subfase. Já a Figura 19c mostra sobreposição das isotermas π -A de DPPC na presença da AMT, ATZ e PRM na subfase em concentração de 10^{-7} mol/L. Desse modo, as isotermas π -A dos herbicidas em concentração de 10^{-7} mol/L na subfase não apresentam um deslocamento significativo, estando muito próximas das isotermas π -A de DPPC na ausência dos herbicidas. Entretanto, apesar da sobreposição das isotermas π -A, a projeção multidimensional mostra que os *clusters* do DPPC na presença da AMT, ATZ e PRM (10^{-7} mol/L) conseguem diferenciá-los do *cluster* de DPPC (Figura 20c).

A Tabela III mostra os deslocamentos das isotermas π -A de DPPC para maiores valores de áreas (30 mN/m) na presença da AMT, ATZ e PRM em concentrações 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L.

Tabela III: área em 30 mN/m das isotermas π -A de DPPC na presença de concentrações 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} mol/L dos herbicidas AMT, ATZ e PRM.

	AMT	ATZ	PRM
Concentrações (mol/L)	Área expandida a 30 mN/m (Å ²)		
$1,0 \times 10^{-5}$	$52,3 \pm 0,6$	$51,2 \pm 0,5$	$48,7 \pm 0,3$
$1,0 \times 10^{-6}$	$48,0 \pm 0,1$	$47,8 \pm 0,2$	$47,1 \pm 0,6$
$1,0 \times 10^{-7}$	$44,9 \pm 0,7$	$45,5 \pm 0,2$	$45,2 \pm 0,2$

O efeito de maiores deslocamentos das isotermas π -A para maiores valores de áreas com a AMT na subfase corrobora com as imagens de BAM como será visto adiante (Figura 20b). Pois, além das imagens apresentarem pontos de agregados, houve a ruptura da monocamada de DPPC, o que não foi observado com a mesma relevância para os outros herbicidas (ATZ e PRM). Este fator possivelmente contribui para a AMT

causar a maior expansão de área na monocamada de DPPC. No entanto, para auxiliar a visualização de qual herbicida separa/desloca mais em comparação a isoterma π -A de DPPC em água ultrapura, foi realizada uma análise por meio da técnica de projeção multidimensional, cujos resultados são mostrados na Figura 20. Cada ponto dentro dos *clusters* significa uma isoterma π -A e a análise foi realizada em triplicatas.

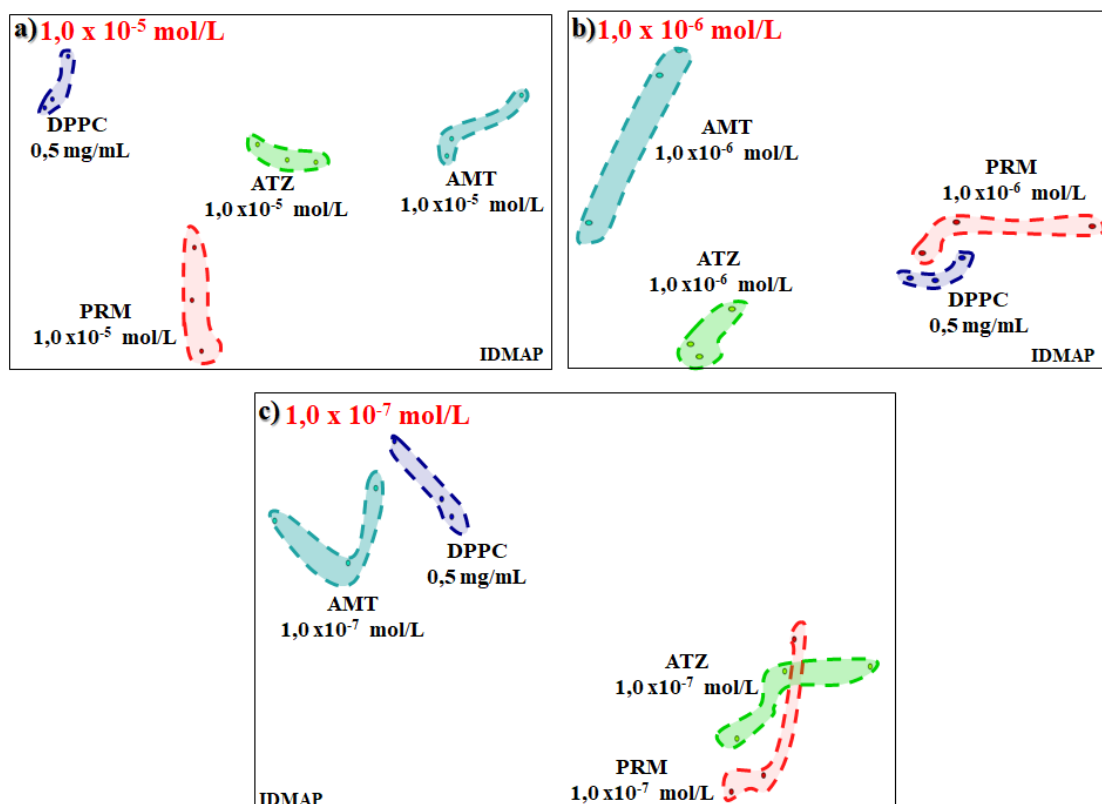


Figura 20: projeção multidimensional agrupando por semelhança as isotermas π -A de DPPC para diferentes concentrações a) 10^{-5} mol/L , b) 10^{-6} mol/L e c) 10^{-7} mol/L dos herbicidas AMT, ATZ e PRM na subfase.

A Figura 20 mostra uma menor flutuação nos pontos (isotermas π -A) dentro dos *clusters* para os herbicidas com concentração 10^{-5} mol/L na subfase em relação as concentrações de 10^{-6} mol/L e 10^{-7} mol/L na subfase (Figuras 20b e 20c). No entanto, quando fixa-se a concentração da AMT, ATZ e PRM na subfase (Figuras 19 e 20) e compara-se qual ocasiona uma maior expansão das isotermas π -A para maiores valores de áreas ou um maior distanciamento em relação ao DPPC puro, a AMT destaca-se para ambas as concentrações 10^{-5} e 10^{-6} mol/L . Como esperado, para a concentração de 10^{-7}

10^{-6} mol/L de herbicida na subfase, as isothermas π -A (pontos) estão mais próximas do DPPC puro, se comparado aos *clusters* da Figura 20a. Provavelmente, isto está ocorrendo porque a concentração de herbicida na subfase é menor que a da Figura 20a (10^{-5} mol/L), logo existe menor quantidade de moléculas de herbicidas para interagir com o DPPC diminuindo assim as distâncias dos *clusters* em relação ao DPPC na ausência de herbicida. Já para a concentração de 10^{-7} mol/L de herbicidas na subfase de DPPC existe sobreposição nos *clusters* do DPPC na presença da ATZ e PRM, com a AMT diferenciando-se destes e do *cluster* de DPPC (Figura 20c). Estes resultados sugerem que o método de projeções multidimensional aplicado a isothermas π -A é uma ferramenta útil na análise de tais resultados.

3.2. Microscopia BAM dos filmes de Langmuir em monocamadas de DPPC na ausência e na presença de AMT, ATZ e PRM na subfase

A Figura 21 mostra imagens de BAM para caracterizar morfologicamente os filmes de Langmuir de monocamadas de DPPC na ausência (Figura 21a) e na presença dos herbicidas AMT (Figura 21b), ATZ (Figura 21c) e PRM (Figura 21d) na concentração de 10^{-5} mol/L na subfase. As imagens de BAM foram capturadas em distintas pressões de superfície (π).

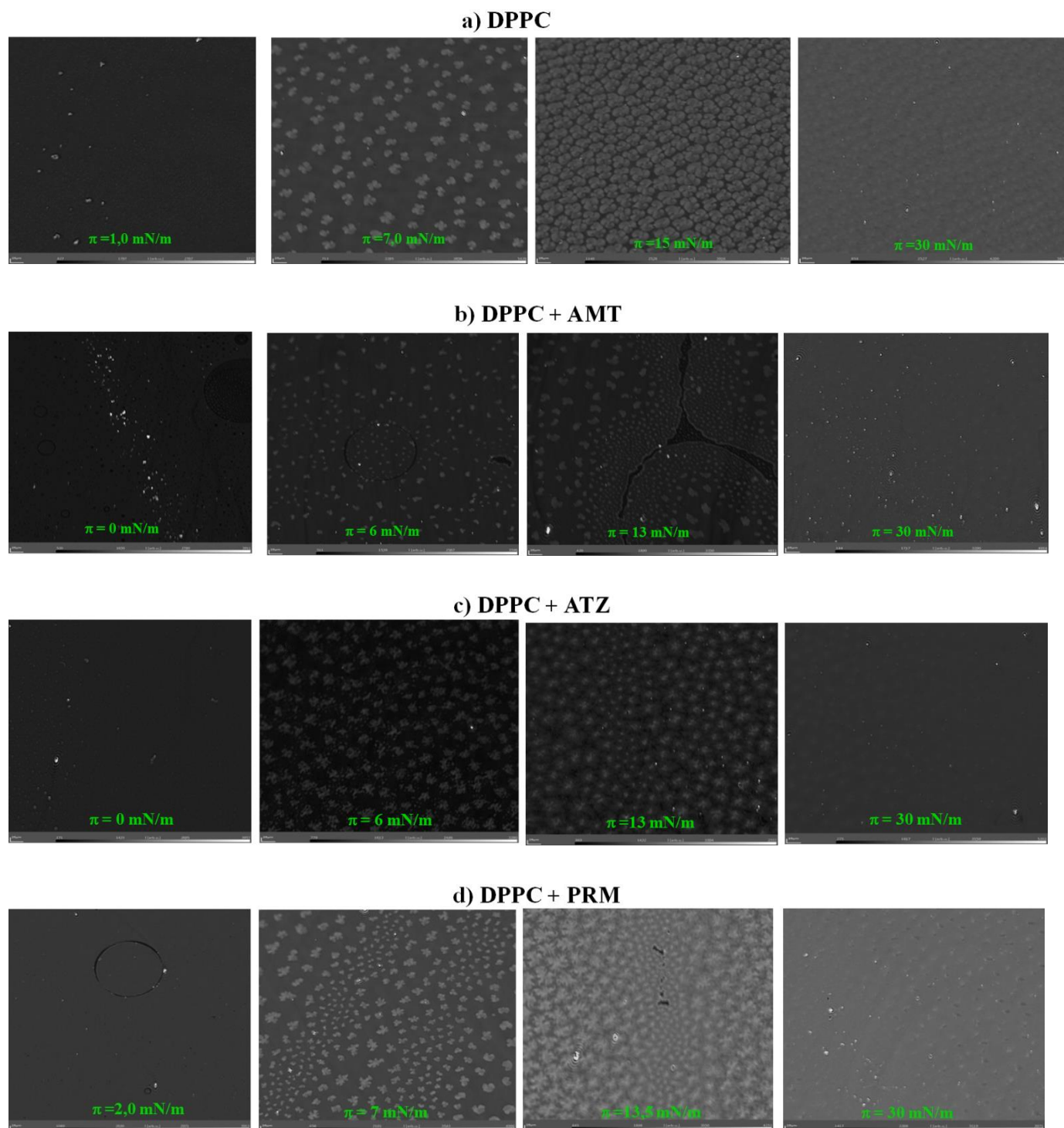


Figura 21: imagens de BAM para filmes de Langmuir de monocamadas de DPPC (a) na ausência e na presença dos herbicidas AMT (b), ATZ (c) e PRM (d). Imagens obtidas em diferentes valores de pressão de superfície (π) dos filmes de Langmuir. A pressão de superfície é dada em mN/m.

A Figura 21a mostra a formação dos domínios do DPPC nas distintas pressões de superfície do filme de Langmuir. Este resultado é similar aos trabalhos encontrados na

literatura⁸⁶⁻⁸⁸. No entanto, as imagens de BAM de monocamadas de DPPC na presença dos herbicidas mostram uma desestruturação dos domínios do fosfolipídio causado pelos herbicidas na subfase em diferentes pressões de superfície do filme de Langmuir. De forma geral, os domínios do DPPC na presença dos herbicidas diminuíram em tamanho e apresentam formas irregulares para todos os herbicidas (AMT, ATZ e PRM). Este mesmo efeito foi observado no trabalho de Mariani *et al.*⁸⁹ para o DPPC na presença dos pesticidas Tujona e Dihidrocarvona⁸⁹. De acordo com Mariani *et al.*⁸⁹ os pesticidas penetram as monocamadas lipídicas de DPPC permanecendo incorporados na membrana, produzindo assim as irregularidades nos domínios do DPPC⁸⁹. Possivelmente, os herbicidas (AMT, ATZ e PRM) na subfase da monocamada de DPPC (Figuras 21b, 21c e 21d) possuem o mesmo comportamento que no trabalho de Mariani *et al.*⁸⁹. Pois, além do herbicida AMT provocar a deformação dos domínios do DPPC, ele causa uma ruptura na monocamada do filme de Langmuir ($\pi \approx 13$ mN/m), o que não foi observado para os outros herbicidas (ATZ e PRM). O trabalho de Ciunac *et al.*⁸⁸ mostra que peptídeo na subfase também induz alterações significativas na monocamada de DPPC, afetando a forma regular dos domínios⁸⁸. As imagens de BAM de DPPC na presença dos herbicidas apresentam alguns pontos claros (diferentes texturas) no valor de pressão superficial alta ($\pi \approx 30$ mN/m), lembrando que esta pressão corresponde às condições em membranas biológicas. Esses pontos claros são evidentes nas monocamadas de DPPC na presença de todos os herbicidas AMT, ATZ e PRM. No entanto, na presença da AMT os pontos claros estão em maiores quantidades, tanto em pressões altas como em baixas, sugerindo que seja AMT na interface ar/água embebida entre as moléculas de DPPC. No trabalho de Chachaj-Brekiesz *et al.*⁹⁰ é possível observar esses pontos brancos/claros, correspondente as diferentes texturas no filme de Langmuir de monocamadas de fosfolipídios na presença de colesterol⁹⁰. Os pontos

brancos/claros observados no filme de Langmuir por meio de imagens BAM de DPPC na presença de AMT, podem ser tanto agregados do pesticida, como ser agregado do fosfolípido, ou então resultado de uma mistura de herbicida/fosfolípidos.

3.3. Ciclos de compressão - descompressão

Ciclos de compressão-descompressão da monocamada de DPPC na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM na concentração de 10^{-5} mol/L na subfase foram realizados. Estes estudos foram realizados para observar se ocorre a formação de agregados estáveis durante o processo de compressão e descompressão, o que implicaria na presença da histerese. Dois ciclos de compressão e descompressão foram analisados até a pressão de superfície de 30 mN/m^1 (fase condensada), Figura 22.

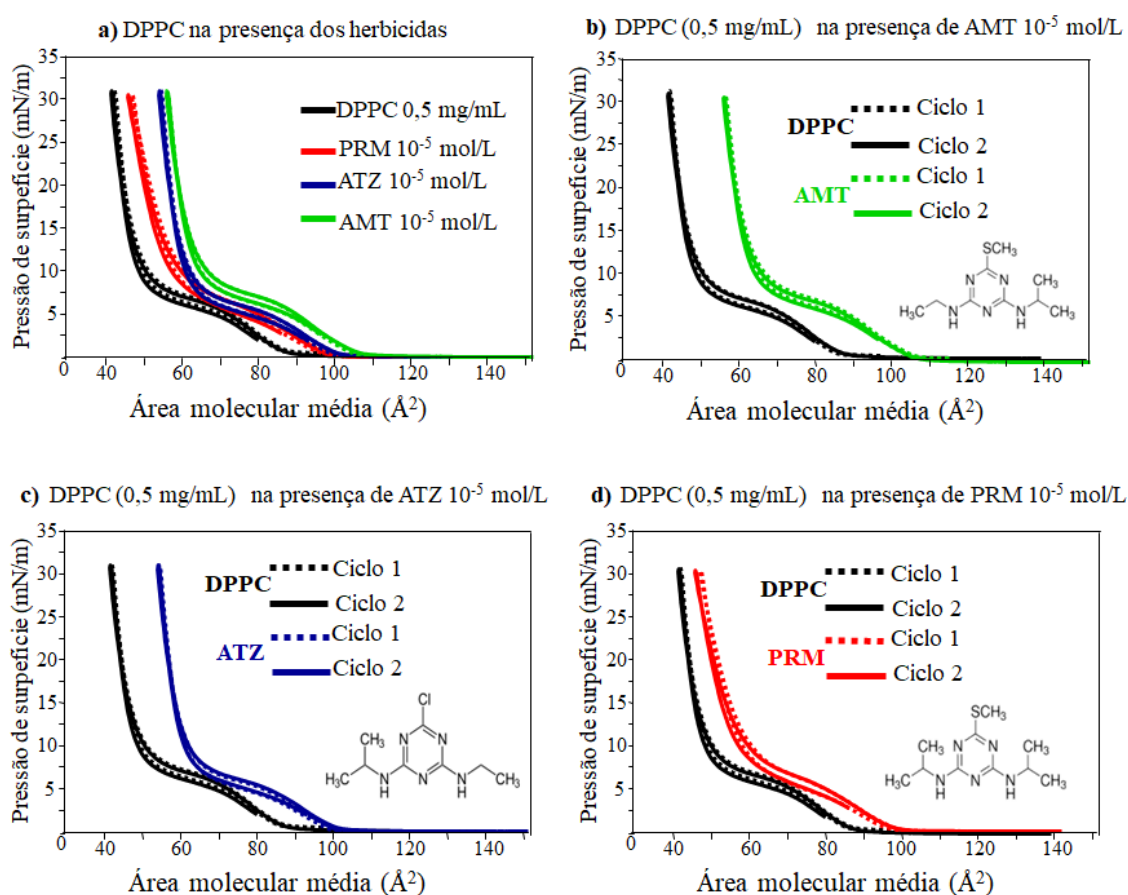


Figura 22: ciclos de compressão – descompressão das monocamadas de a) DPPC na ausência e presença da b) AMT, c) ATZ e d) PRM na concentração de 10^{-5} mol/L. As monocamadas foram comprimidas com velocidade das barreiras de 10 mm/min, a 23°C .

De maneira geral, as isotermas π -A de compressão são semelhantes as obtidas nas Figuras 17 e 19a. As isotermas π -A de descompressão (momento de abertura das barreiras) praticamente coincidem com a isoterma π -A de compressão, e retornam à pressão nula ao final de cada ciclo. Há uma pequena diminuição de área molecular média observada durante a compressão em relação a descompressão nas isotermas π -A de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas. Resultados semelhantes foram observados para as monocamadas de DPPC no trabalho de Xu *et al.*⁹¹, em que mostra uma pequena diminuição de área durante ciclos de compressão e descompressão do fosfolípido⁹¹. Porém, Xu *et al.* mostram que este pequeno deslocamento da isoterma π -A durante os ciclos de compressão e descompressão não sugere que o filme forme agregados. As isotermas π -A de DPPC na presença dos herbicidas (Figuras 22b, 22c e 22d) mostram ainda que os dois ciclos de compressão-descompressão os herbicidas permanecem embebidos nas monocamadas de DPPC. Este resultado mostra que a interação DPPC-herbicida é forte o suficiente para que os herbicidas permaneçam embebidos nas monocamadas de DPPC durante a compressão-descompressão, até mesmo durante a pressão na fase condensada (30 mN/m¹).

3.4. Estabilidade: DPPC na ausência e na presença dos herbicidas

A estabilidade do filme de Langmuir de DPPC também foi estudada na pressão de superfície de 30 mN/m durante o tempo de 5500 segundos. O experimento além da curva de pressão de superfície constante em função do tempo (em azul), permite obter uma curva da estabilidade por meio da área molecular média em função do tempo (em preto). Ambas as curvas estão à pressão constante em 30 mN/m como mostra a Figura 23. Como mencionado para os estudos de BAM (Figura 21), esta pressão de 30 mN/m

foi determinada baseada na pressão que corresponde às condições em membranas biológicas^{29,32}.

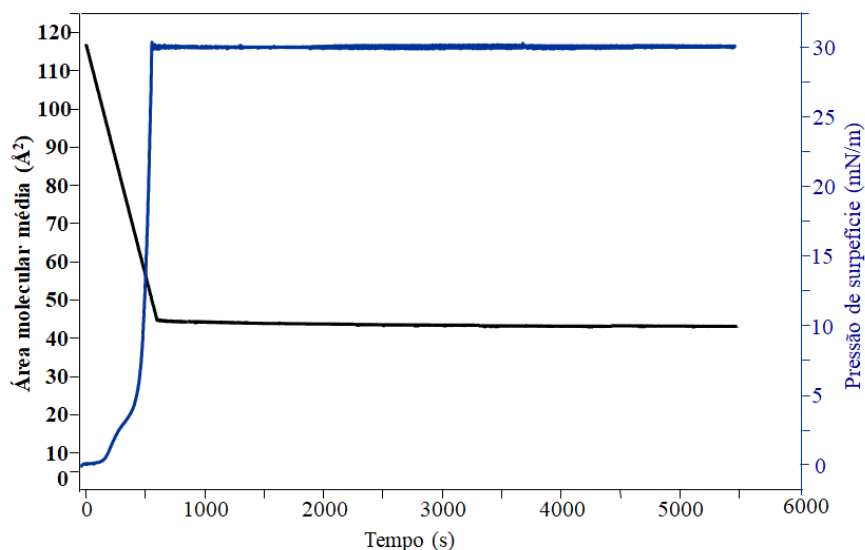


Figura 23: teste de estabilidade do filme de DPPC (35 μ L depositado na superfície, concentração de 0,5 mg/mL) em pressão de superfície fixada em 30mN/m por 5500 segundos, em uma cuba de Langmuir KSV, modelo mini-micro, a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A monocamada do DPPC mostrou-se bem estável com o transcorrer do tempo, pois se mantiveram na interface ar-água preservando a área molecular média em um valor constante, durante aproximadamente 1h50min (5500s) do experimento. Consequentemente, a pressão superficial também manteve-se constante, como pode ser observado na Figura 23. Já a Figura 24 mostra a análise por meio da estabilidade do filme de Langmuir de DPPC (0,5 mg/mL) na ausência e na presença dos herbicidas (AMT, ATZ e PRM) na subfase com concentração de 10^{-5} mol/L. Neste caso a estabilidade do filme foi obtida somente para área molecular média ocupada pelas moléculas em função do tempo, a pressão constante de 30 mN/m por volta de 5000 segundos.

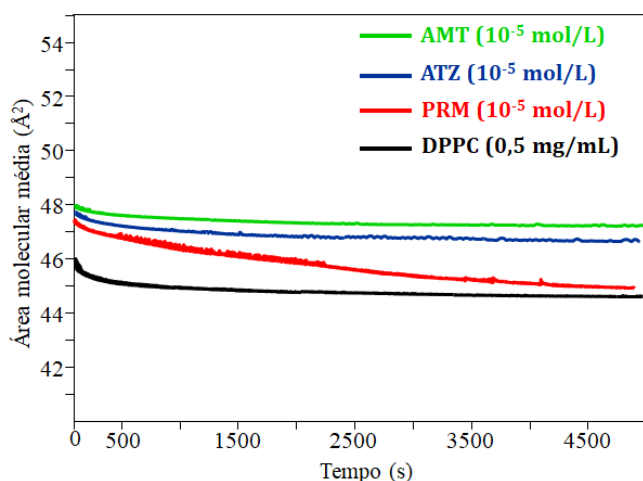


Figura 24: estabilidade do filme de DPPC em subfase de água ultrapura (35 μL espalhados na superfície, concentração de 0,5 mg/mL) na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM (10^{-5} mol/L). A curva mostra a área molecular média em função do tempo (5000 segundos) para uma pressão de superfície fixada em 30mN/m. O estudo foi realizado em uma cuba de Langmuir KSV, modelo mini-micro, a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A curva do DPPC da Figura 24 mostra a estabilidade da monocamada na interface ar-água. Um filme é considerado estável quando mantém suas propriedades em função do tempo⁹². Neste caso o filme do DPPC permaneceu estável com uma variação de área (ΔA) praticamente nula (constante) na ausência dos herbicidas. Por outro lado, quando o DPPC está na presença da AMT, ATZ e PRM em concentração de 10^{-5} mol/L há um aumento de área desde o início da contagem do experimento com as barreiras a pressão constante de 30 mN/m. De modo geral, a presença dos herbicidas na subfase faz com que a área molecular média do DPPC se desloque para maiores valores de área ao longo do tempo, com a seguinte ordem de ΔA : $\text{AMT} > \text{ATZ} > \text{PRM}$. Este resultado indica o favorecimento da interação DPPC-herbicidas, como também indicado pelas isotermas π -A discutidas no item anterior. De forma mais específica, este resultado corrobora com as isotermas π -A observadas na Figura 19a, pois as mesmas mostram que há deslocamentos para maiores valores de áreas das isotermas π -A de DPPC na presença dos herbicidas na subfase. Além disso, os deslocamentos observados na Figura 19a são semelhantes em ordem de herbicida como mostra a Figura 24 ($\text{AMT} > \text{ATZ} > \text{PRM}$). O filme de DPPC+AMT (10^{-5} mol/L) mostra que além do herbicida estar embebido na monocamada de DPPC, a AMT permanece entre as moléculas de DPPC ao longo do tempo. O mesmo é observado para a ATZ na subfase, pois além de aumentar a área

molecular média, houve a permanência do herbicida entre as moléculas de DPPC com estabilidade do filme ao longo do tempo. Por outro lado, a PRM na subfase apesar de mostrar desde o início do experimento um aumento de área ao longo do tempo, a área molecular média diminui. Portanto, para PRM na subfase, possivelmente o herbicida está sendo expulso da monocamada do fosfolipídio, dificultando a sua permanência entre as moléculas do DPPC. O trabalho de Quial *et al.*⁹³ também mostram uma diminuição de área do filme de Langmuir do DPPC na presença do fosfolipídio DOPC ao longo do tempo. Porém, ao contrário dos filmes de estabilidade de DPPC + herbicidas desta tese de doutorado, o filme de DPPC na presença de diferentes concentrações de DOPC no trabalho de Quial *et al.* deslocou-se para valores menores de área molecular média em relação ao DPPC, pois o DOPC fluidifica a monocamada. O estudo de estabilidade do filme de Langmuir de DPPC também foi analisado no trabalho de Zhao *et al.*⁹⁴ na presença de Paclitaxel (medicamento usado em tratamento de câncer) na subfase. Por meio do estudo de estabilidade Zhao *et al.* mostram a penetração do Paclitaxel em monocamadas de distintos fosfolipídios, entre eles o DPPC. Neste caso, o resultado é semelhante ao que obtivemos neste trabalho para os filmes de DPPC+herbicidas. Zhao *et al.* mostram que o Paclitaxel está embebido na monocamada do DPPC, ou seja, entre as moléculas do fosfolipídio, fazendo com que as curvas de estabilidade se desloquem para valores maiores de áreas ao longo do tempo⁹⁵.

3.5. Módulo compressional (C_s^{-1}): DPPC na ausência e na presença dos herbicidas

A Figura 25 mostra o módulo compressional (C_s^{-1}) do filme de Langmuir do DPPC na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM na concentração de 10^{-5} mol/L. A análise por meio do módulo compressional permite saber se os herbicidas influenciam na fluidez da monocamada do filme de DPPC.

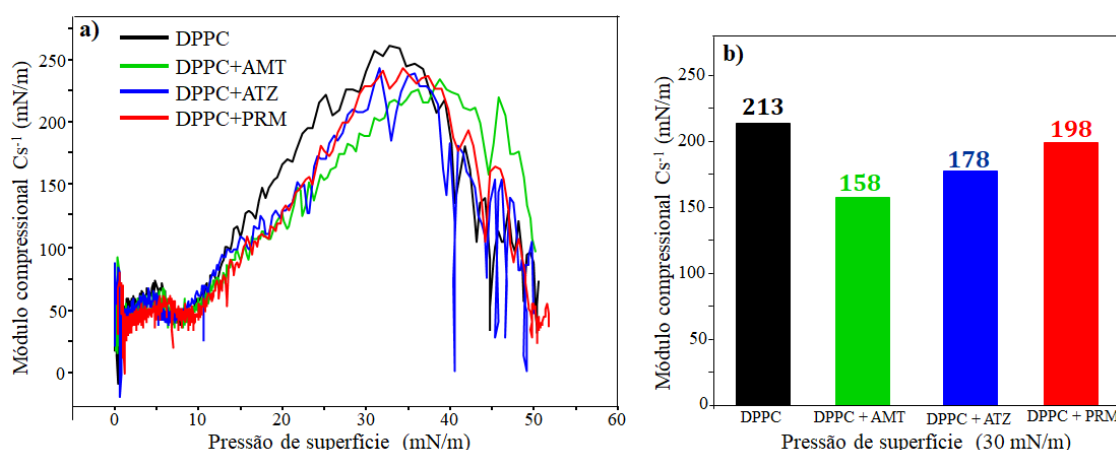


Figura 25: a) gráfico do módulo compressional (Cs^{-1}) por pressão de superfície do DPPC (0,5 mg/mL) na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM (10^{-5} mol/L) na subfase. b) Valores em gráficos de barra do módulo compressional do DPPC na ausência e na presença dos herbicidas em pressão de superfície fixada a 30 mN/m (fase líquido condensada).

O valor do Cs^{-1} do DPPC na ausência dos herbicidas foi por volta de 213 mN/m, coerente com valores reportado na literatura⁹⁶. Os valores do Cs^{-1} obtidos na ausência e na presença dos herbicidas estão dentro da faixa da fase líquido condensada referente ao intervalo do Cs^{-1} , entre 100 e 250 mN/m⁹⁶. Portanto, mesmo a 30 mN/m a monocamada de DPPC está na fase LC como mostra os valores de Cs^{-1} da Figura 25b. Dessa forma, os herbicidas na subfase alteram o valor do Cs^{-1} . Porém, essa alteração para valores menores de Cs^{-1} do DPPC na presença dos herbicida não é suficiente para proporcionar uma mudança na fase do fosfolípido. Ao contrário, o trabalho de Jurak *et al.*⁹⁷ mostram uma mudança de fase do filme de DPPC na presença da Vitamina E- α -tocopherol (TF). O trabalho mostra que a presença do TF torna menos compactadas e menos ordenadas as monocamadas de DPPC. De maneira geral, o TF fluidifica a monocamada, provocando o desaparecimento da transição de fase líquido expandido (LE)/LC⁹⁷. Estes efeitos não foram observados nesta tese, pois a presença dos herbicidas na subfase do filme de DPPC não ocasiona mudanças significativas/importantes na elasticidade da monocamada. Entretanto, nota-se uma pequena diminuição nos valores de Cs^{-1} na pressão superficial de 30 mN/m, o que sugere um pequeno aumento na fluidez

da monocamada. Principalmente, quando o DPPC está na presença da AMT, pois dentre os herbicidas foi a maior mudança observada do módulo Cs^{-1} , de 213 para 158 mN/m.

3.6. PM-IRRAS: monocamadas de DPPC na ausência e na presença de AMT, ATZ e PRM

A fim de determinar as possíveis interações entre o lipídio e os herbicidas triazínicos, foram realizados estudos de PM-IRRAS em monocamadas de DPPC na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM na subfase. A Figura 26 mostra os espectros de PM-IRRAS de 2800 a 3000 cm^{-1} (região referente à cauda do DPPC). Os espectros foram obtidos para filmes de Langmuir a 30 mN/m (fase condensada) de DPPC na ausência e na presença de (a) AMT, (b) ATZ e (c) PRM na concentração de 10^{-5} mol/L na subfase. O espectro de FTIR em filme *cast* de DPPC está na Figura 26 para comparação com o espectro de PM-IRRAS do fosfolipídio. As atribuições referentes aos espectros de PM-IRRAS para as bandas na região de 2800 a 3000 cm^{-1} do DPPC em filmes de Langmuir formados a 30 mN/m são mostradas na Tabela IV.

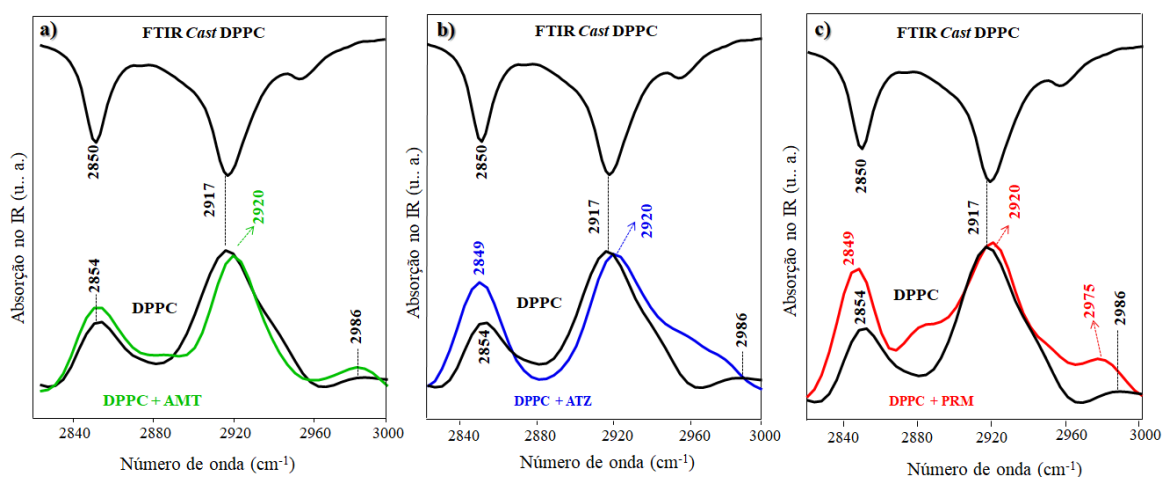


Figura 26: espectros de PM-IRRAS (2800 a 3000 cm^{-1}) obtidos a 30 mN/m para monocamadas de DPPC na ausência e na presença de (a) AMT, (b) ATZ e (c) PRM na concentração de 10^{-5} mol/L na subfase. Espectro de FTIR do DPPC na parte superior da figura em filme *cast* sobre substrato de ZnSe.

Tabela IV: atribuições referentes aos espectros de PM-IRRAS de DPPC na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM para a região da cauda (2800 a 3000 cm^{-1}) do fosfolípido. Filmes de Langmuir formados a 30 mN/m.

DPPC (cm^{-1})	DPPC + AMT (cm^{-1})	DPPC + ATZ (cm^{-1})	DPPC +PRM (cm^{-1})	Atribuições
2854	2853	2849	2849	$\nu_s\text{CH}_2$
2917	2920	2920	2920	$\nu_{as}\text{CH}_2$
2986	2986	-----	2975	$\nu_{as}\text{CH}_3$

Os intervalos de números de onda para os espectros da Figura 26, e as atribuições da Tabela IV, mostram o estiramento simétrico (2854 cm^{-1}) e assimétrico (2917 cm^{-1}) do CH_2 , bem como, o estiramento assimétrico do grupo CH_3 (2986 cm^{-1})^{79,98,99} para monocamadas de DPPC. Os deslocamentos observados nos espectros de PM-IRRAS do DPPC na presença dos herbicidas na região da cauda não são significativos para inferir alguma interação dos herbicidas com a região das cadeias hidrofóbicas do fosfolípido. Porém, independentemente de uma interação herbicida/cadeia hidrofóbica, a presença dos herbicidas na monocamada de DPPC pode influenciar a ordem (orientação) da cadeia alquila. Este efeito pode ser evidenciado por mudanças na intensidade relativa do estiramento simétrico de CH_2 (2854 cm^{-1}) em relação ao estiramento assimétrico também do CH_2 (2917 cm^{-1})^{100,101} para o DPPC. Quanto maior o valor da relação ($\nu_s\text{CH}_2/\nu_{as}\text{CH}_2$) da intensidade relativa, maior é a desordem (desorientação) das cadeias do DPPC^{79,100}. A Figura 27 mostra a relação de intensidade relativa $\nu_s\text{CH}_2/\nu_{as}\text{CH}_2$ observada nos espectros de PM-IRRAS (região da cauda) obtida para monocamadas de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM. Os espectros de PM-IRRAS na região da cauda do DPPC foram normalizados e em seguida medida a intensidade de pico das bandas para realizar a relação $\nu_s\text{CH}_2/\nu_{as}\text{CH}_2$. Lembrando que para todos os espectros foram realizadas linha de base (foram utilizados os mesmos pontos para todos os espectros).

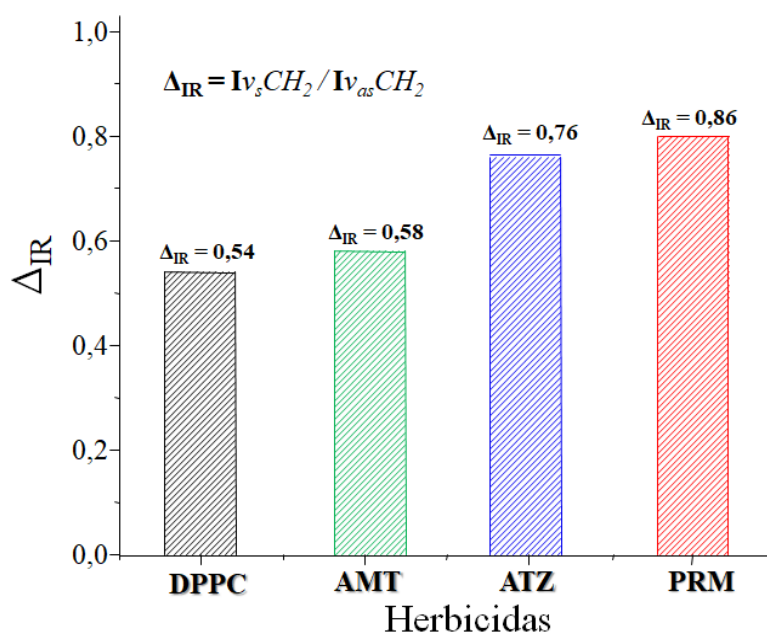


Figura 27: intensidade relativa do estiramento CH_2 simétrico em relação ao estiramento CH_2 antissimétrico ($v_sCH_2/v_{as}CH_2$). O gráfico de coluna mostra os valores obtidos dos espectros PM-IRRAS para monocamadas de DPPC na ausência e presença de AMT, ATZ e PRM (10^{-5} mol/L) em 30 mN/m na subfase.

A monocamada de DPPC mostra uma variação de intensidade relativa $\Delta_{IR} = 0,54$, valor este que está de acordo com os encontrados na literatura^{79,100,101}. Goto *et al.*¹⁰¹ mostram a interação do cloridato de mefloquina (droga eficaz contra a malária) por meio de espectros de PM-IRRAS em monocamadas de filmes de Langmuir de DPPC, DODAB e DPPG. No trabalho de Goto *et al.*¹⁰¹ o valor de Δ_{IR} na região da cauda do DPPC aumentou de 0,56 para 0,87 quando adicionada a droga na subfase, mostrando uma grande desorganização nas caudas dos fosfolipídios com a adição da droga. O valor de Δ_{IR} no trabalho de Aoki *et al.*⁷⁹ para espectros de PM-IRRAS de DPPC na presença de eritrosina (corante utilizado como fotossensibilizador em tratamento de fotomedicina) aumenta de 0,54 para 0,96, ocasionando em uma maior desordem na cauda do DPPC. De modo geral, o trabalho de Stunges *et al.*¹⁰² mostra que subtraindo a Δ_{IR} do fosfolipídio DODAB na ausência e na presença do EE2 na subfase o valor da Δ_{IR} é de 0,2, o que se relaciona a uma maior desordem na cauda do DODAB. Stunges *et al.*¹⁰² relatam que esse valor de Δ_{IR} corrobora com os resultados de isoterma π -A, pois o

DODAB na presença de EE2 na subfase mostra expansão da isoterma π -A para maiores valores de área (mesmo na fase condensada do filme). Concluiu-se assim que o EE2 pode ser incorporado na região hidrofóbica da monocamada de DODAB, mesmo em altas pressões. Em nosso trabalho, ao subtrair o valor da $\Delta_{IR} = 0,54$ do DPPC com o valor de DPPC na presença da ATZ ($\Delta_{IR} = 0,76$) obtém-se o valor de $\Delta_{IR} = 0,22$, próximo do relatado por Stunges *et al.*¹⁰² e Goto *et al.*¹⁰¹ que mostram a Δ_{IR} de 0,56 para o DPPC aumentando para 0,70, 0,77 e 0,87 na presença de quinina, dependendo da proporção do analito (1%, 3% e 5%,). Por fim, Goto *et al.*¹⁰¹ também concluíram que esses valores são suficientes para inferir que a quinina causa desordem na cadeia hidrofóbica do DPPC. Portanto, a monocamada de DPPC na presença de PRM apresenta um valor de $\Delta_{IR} = 0,86$, maior que as Δ_{IR} da ATZ ($\Delta_{IR} = 0,76$) e AMT ($\Delta_{IR} = 0,58$). Deste modo, a PRM na subfase aquosa de monocamadas de DPPC causa uma desordem nas cadeias hidrofóbicas do fosfolípido. O DPPC na presença da ATZ também mostra aumento na Δ_{IR} de 0,54 para 0,76 indicando que este herbicida também causa perturbações na cadeia hidrofóbica do DPPC, ainda que menor que a causada pelo PRM. Por outro lado, a AMT na subfase sugere nenhum efeito significativo na ordem da cadeia alquila do DPPC, pois houve uma Δ_{IR} de 0,54 para 0,58. Por fim, os valores das Δ_{IR} mostram que a ATZ ($\Delta_{IR} = 0,22$) e PRM ($\Delta_{IR} = 0,32$) na subfase causam desordem na cauda do DPPC.

A Figura 28 mostra o espectro de PM-IRRAS do DPPC na região de 920 a 1800 cm^{-1} ; os grupos constituintes do fosfolípido são representados por pontilhados e cores distintas, sendo estes: grupo colina, grupo fosfato, grupo CH_2 do início da cauda e o grupo éster.

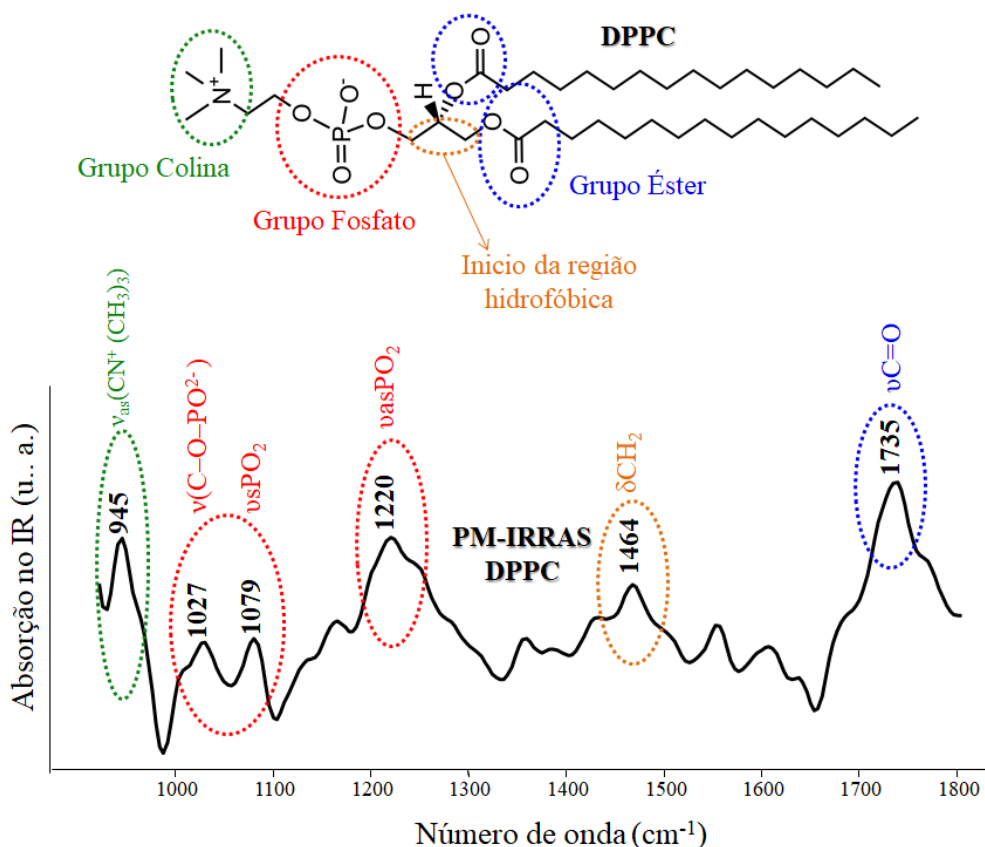


Figura 28: espectro de PM-IRRAS de DPPC com os grupos que constituem o fosfolipídio, em pontilhado é observado na estrutura molecular do mesmo os respectivos números de onda do espectro. Os grupos presentes são: colina (verde), fosfato (vermelho), região do CH₂ do início da cauda (marrom) e os grupos ésteres (azul).

O espectro de PM-IRRAS do DPPC da Figura 28 mostra as regiões onde ocorrem as vibrações dos grupos constituintes do fosfolipídio. A região de 945 cm⁻¹ é atribuída a vibração assimétrica do grupo colina $\nu_{as}(\text{CN}^+(\text{CH}_3)_3)$ ^{79,103}. As bandas em 1027, 1079 e 1220 cm⁻¹ são referentes ao grupo fosfato $\nu(\text{C-O-PO}_2^-)$ e νsPO_2 ^{98,104}. No início da cauda há uma banda em 1464 cm⁻¹ atribuída ao *bending* do grupo CH₂^{79,101}. Na cauda há a vibração dos grupos ésteres C=O em 1735 cm⁻¹. Após saber quais são as regiões de vibração do DPPC no espectro de PM-IRRAS, o próximo passo foi realizar o espectro do fosfolipídio na presença da AMT, ATZ e PRM. Deste modo, foi possível observar o efeito dos herbicidas em monocamadas de DPPC na região de 920 a 1800 cm⁻¹. Além disto, pode-se relacionar a desordem discutida na cauda do fosfolipídio (Figuras 26 e 27) por meio das interações da região hidrofílica do DPPC.

As Figuras 29, 30 e 31 mostram medidas de PM-IRRAS para a região dos grupos hidrofílicos do DPPC em filmes de Langmuir a 30 mN/m na ausência e na presença dos herbicidas AMT (Figura 29), ATZ (Figura 30) e PRM (Figura 31) em 10^{-5} mol/L na subfase de água ultrapura. A Tabela V mostra as atribuições referentes aos espectros de PM-IRRAS para as bandas na região de 920 à 1800 cm^{-1} do DPPC na ausência e na presença dos herbicidas na subfase.

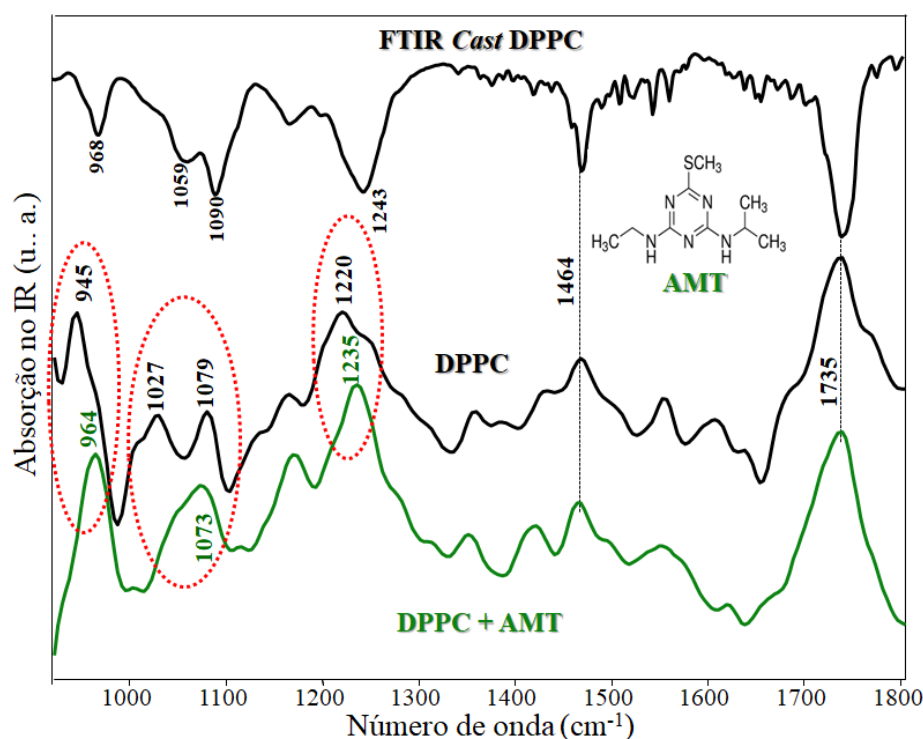


Figura 29: espectros de PM-IRRAS na região de 920 à 1800 cm^{-1} (referente a cabeça do DPPC) para monocamadas de DPPC à 30 mN/m na ausência e na presença de AMT (10^{-5} mol/L). Espectro FTIR de DPPC em filme *cast* sobre substrato de ZnSe. As alterações causadas por meio do herbicida na subfase são mostradas em pontilhados.

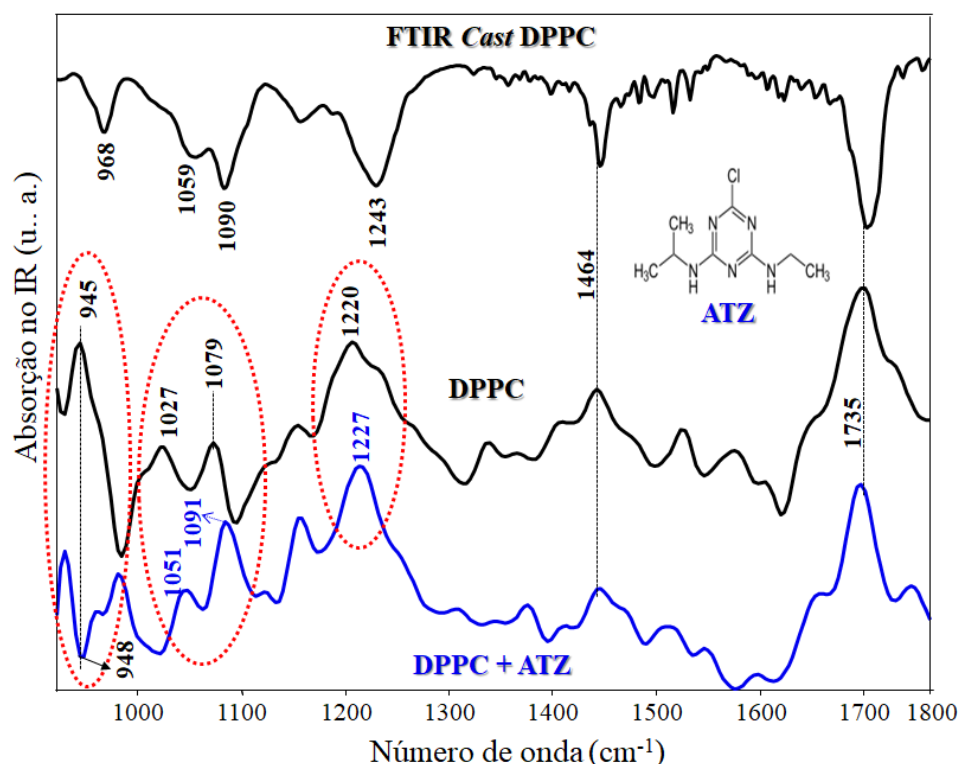


Figura 30: espectros de PM-IRRAS na região de 920 à 1800 cm^{-1} (referente a região hidrofílica do DPPC) para monocamadas de DPPC (30 mN/m) na ausência e na presença de ATZ (10^{-5} mol/L). Espectro de FTIR de DPPC em filme *cast* sobre substrato de ZnSe. As alterações causadas por meio do herbicida na subfase aquosa em monocamada de DPPC são mostradas em pontilhados.

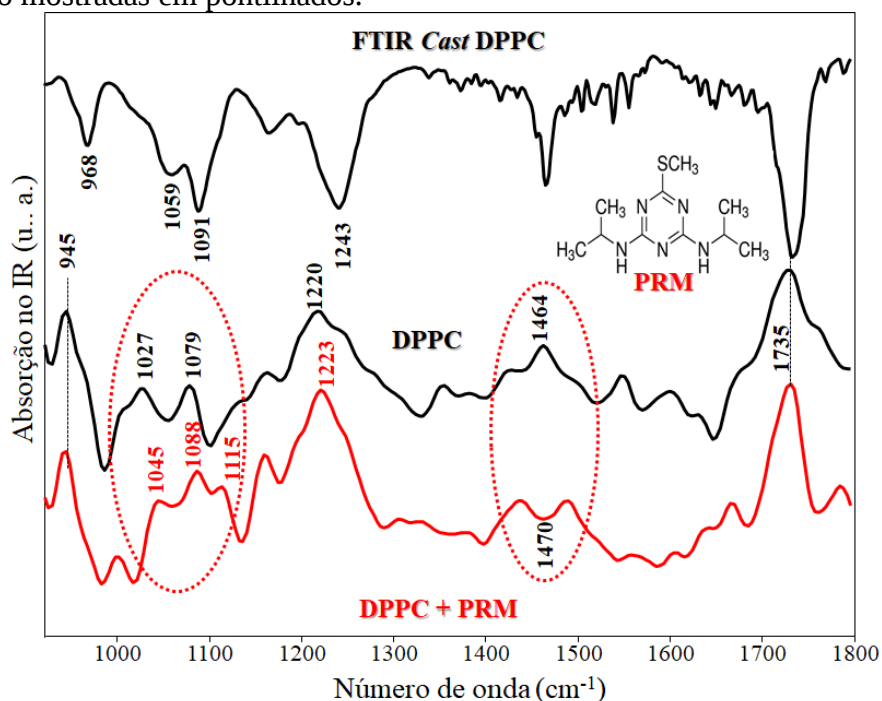


Figura 31: espectros de PM-IRRAS na região de 920 à 1800 cm^{-1} (referente a região hidrofílica do DPPC) para monocamadas de DPPC (30 mN/m) na ausência e na presença de PRM (10^{-5} mol/L). Espectro de FTIR de DPPC em filme *cast* sobre substrato de ZnSe. As alterações causadas por meio do herbicida na subfase aquosa em monocamada de DPPC são mostradas em pontilhados.

Tabela V: atribuições referentes aos espectros de PM-IRRAS de DPPC na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM para a região da cabeça (920 a 1800 cm^{-1}) do fosfolípido. Filmes de Langmuir formados a 30 mN/m.

DPPC (cm^{-1})	DPPC + AMT (cm^{-1})	DPPC + ATZ (cm^{-1})	DPPC + PRM (cm^{-1})	Atribuições
944	964	948	945	$\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+ (\text{CH}_3)_3)$
1027	-----	1051	1045	$\nu\text{C-O-PO}_2$
1079	1073	1092	1088	$\nu\text{SPO}_2 ; (\nu\text{C-O-PO}_2)$
1220	1235	1227	1223	νasPO_2
1464	1464	1464	-----	δCH_2
1735	1735	1735	1735	$\nu\text{C=O}$

Os espectros de PM-IRRAS de DPPC na presença da AMT (Figura 29), ATZ (Figura 30) e PRM (Figura 31) mostram modificações, as quais estão destacadas com círculos pontilhados (vermelho). O espectro de PM-IRRAS de DPPC na presença de AMT (Figura 30) mostra um deslocamento da vibração $\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+ (\text{CH}_3)_3)$ do grupo colina do DPPC em 944 cm^{-1} para 964 cm^{-1} ^{79,105}. Porém, no trabalho de Aoki *et al.* ⁷⁹ é observado o deslocamento de número de onda do grupo colina por meio de espectros de PM-IRRAS na presença da eritrosina. Ao adicionar a droga existe o deslocamento de 954 cm^{-1} para 968 cm^{-1} , sendo este por causa do grupo mais negativo da eritrosina que interage eletrostaticamente com o grupo colina (positivo) ⁷⁹. Outra mudança observada no espectro de PM-IRRAS de DPPC na presença de AMT é na região do grupo fosfato do fosfolípido. As bandas do DPPC em 1027 e 1079 cm^{-1} coalescem, dando origem a uma banda em 1073 cm^{-1} com um ombro em 1048 cm^{-1} , e a banda em 1220 cm^{-1} atribuída a $\nu_{\text{as}}\text{PO}_2$ é deslocada para 1235 cm^{-1} ^{105,106}. O espectro de PM-IRRAS de DPPC na presença da AMT (Figura 29) não mostrou alteração significativa no grupo CH_2 (1464 cm^{-1}) do início da cauda. Este resultado mostra que as interações da AMT com os grupos colina e fosfato do DPPC não causaram desordem na região da cauda do fosfolípido.

O espectro PM-IRRAS de DPPC na presença da ATZ na subfase (Figura 30) mostra que a banda referente ao grupo colina do DPPC em 944 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{CN}^+ (\text{CH}_3)_3)$),

sofre uma inversão e desloca para 948 cm^{-1} na presença da ATZ. As bandas com picos positivos indicam uma orientação do momento de dipolo preferencialmente paralelo ao plano da superfície, por outro lado, bandas com picos negativos mostram uma orientação preferencial do momento de dipolo perpendicular ao plano da superfície¹⁰⁷. Provavelmente, a ATZ está interagindo com o grupo colina (positivo) mudando a orientação do dipolo inicial nesta região do fosfolípido, pois além de deslocar ocorre a inversão da banda. A ATZ na subfase também provoca o deslocamento das bandas atribuídas a região do grupo fosfato do DPPC de $1027, 1071\text{ cm}^{-1}$ para 1051 e 1092 cm^{-1} , respectivamente, e de 1220 para 1227 cm^{-1} . O espectro de PM-IRRAS de DPPC na presença da ATZ não mostrou alteração significativa no grupo CH_2 (1464 cm^{-1}) do início da cauda. Portanto, provavelmente a desordem causada na cauda do DPPC por meio da ATZ na subfase é devido as interações observadas no grupo colina e fosfato do DPPC.

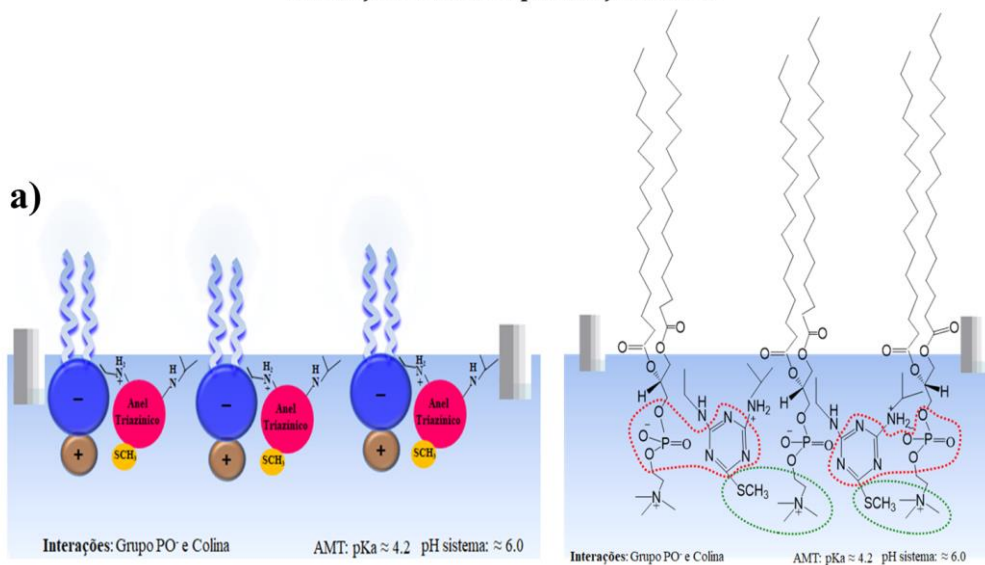
Os espectros de PRM-IRRAS de PRM em subfase não apresenta alteração significativa para a região do grupo colina (944 cm^{-1}) do DPPC. Por outro lado, o espectro de PM-IRRAS de DPPC na presença da PRM (Figura 31) mostra alterações atribuídas ao grupo fosfato (C-O-PO_2), pois desloca de $1027, 1071\text{ cm}^{-1}$, para as regiões de 1045 e 1088 cm^{-1} , respectivamente. Outra mudança ocasionada por meio da PRM na subfase foi o aparecimento da banda em 1115 cm^{-1} . Além dessas modificações mencionadas, houve a inversão da banda em 1464 cm^{-1} (atribuída ao *bending* do grupo CH_2 do início da cauda). A alteração (inversão da banda) observada ao grupo CH_2 provavelmente está relacionada com as regras de seleção de superfície do experimento PM-IRRAS em interface ar-água, como foi relatado acima para a inversão da banda na região da colina do DPPC com a ATZ na subfase. Foi realizada uma busca na literatura para investigar essa inversão de banda nos espectros PM-IRRAS, no entanto, todos os trabalhos relatam o seguinte. Bandas com picos positivos, indicam uma orientação do

momento de dipolo preferencialmente paralelo ao plano da superfície, por outro lado, bandas com picos negativos revelam uma orientação preferencial do momento de dipolo perpendicular ao plano da superfície^{98,108-110}. A exemplo, o autor Nakahara *et al.*¹⁰⁸ mostram em seu trabalho a banda negativa na região em 1682 cm⁻¹ atribuída ao grupo amida I da mistura de DPPC com ácido palmítico, relata que essa banda negativa é devido a regra de seleção PM-IRRAS. No entanto, acreditamos que existem duas hipóteses que podem ser a causa da inversão da banda: 1) Ocorre por meio de interações em grupos vizinhos que afetam a região, alterando assim sua orientação (invertendo), porém neste caso não pode ocorrer deslocamento da banda que está invertendo, ou 2) ocorre de fato a interação na própria região que inverte ou não a banda, neste caso deve haver o deslocamento. A hipótese (1) ocorre em nosso trabalho para a ATZ na subfase, pois inverte o grupo colina do DPPC na presença do herbicida sem deslocar a banda. A hipótese (2) ocorre no espectro de PM-IRRAS com a AMT na subfase, pois a interação da AMT na região do grupo colina do DPPC não inverte a banda, mas ocorre um deslocamento considerável.

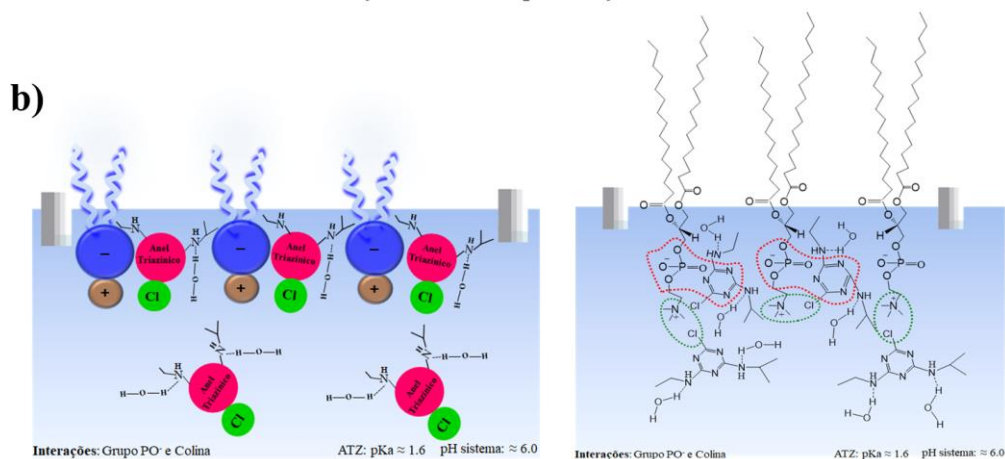
3.7. Interações do DPPC com a AMT, ATZ e PRM: resumo

Em virtude da análise realizada por meio dos espectros de PRM-IRRAS de DPPC na ausência e na presença da AMT, ATZ e PRM é possível propor (tentativa) como estes herbicidas afetam a monocamada do DPPC. A Figura 32 traz uma ilustração para simplificar/melhorar a visualização das possíveis interações DPPC/herbicidas que foram observadas por meio dos espectros de PM-IRRAS.

Interações DPPC na presença de AMT



Interações DPPC na presença de ATZ



Interações DPPC na presença de PRM

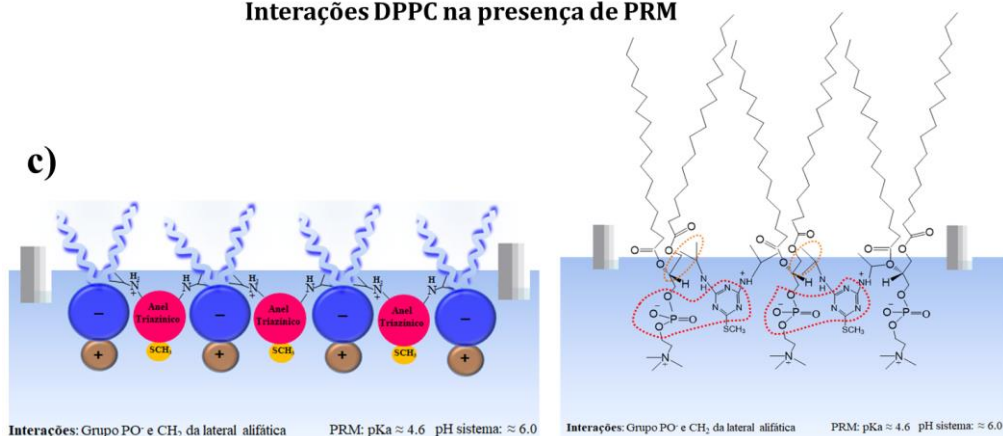


Figura 32: representação das possíveis interações de monocamadas de DPPC na presença de a) AMT, b) ATZ, e c) PRM na interface ar/água à 30 mN/m: O tamanho das barreiras em relação às moléculas não foram levadas em consideração, este *cartoon* é uma ilustração para simplificar/melhorar a visualização das possíveis interações (DPPC/herbicidas) por meio dos espectros de PM-IRRAS.

Como foi relatado mais acima, as moléculas dos herbicidas s-triazínicos têm caráter anfifílico. Os elétrons de pares solitários no anel, os N-átomos, formam ligações de hidrogênio com moléculas de água, daí seu anel triazínico ser hidrofílico. Portanto, como é observado nas Figuras 32a, 32b e 32c todos os herbicidas (AMT, ATZ e PRM) em subfase interagem com o grupo fosfato do DPPC por meio do anel triazínico. O fosfolipídio por apresentar também funções hidrofílica e hidrofóbica como os herbicidas, favorece um bom ambiente para sorção da AMT, ATZ e PRM¹⁷.

A AMT (Figura 32a) têm $pK_a \approx 4,2$, o herbicida na subfase da monocamadas de DPPC está com $pH \approx 6$, dessa forma o herbicida está praticamente alcalino, apenas com uma amina protonada¹⁷. A amina desprotonada se torna susceptível a competitividade de interação da AMT entre o DPPC e/ou as moléculas de água por meio de ligação de hidrogênio. Como a Figura 32a ilustra, o anel triazínico e o substituinte R1 ($-\text{SCH}_3$) da AMT estão mais próximos do grupo fosfato do DPPC. A cadeia isopropil e etil da AMT (hidrofóbica) busca interagir com os grupos hidrofóbicos do DPPC. No entanto, os espectros de PM-IRRAS mostram mudanças nas bandas no grupo fosfato e deslocamento no grupo colina do DPPC, revelando que prevalece a interação do herbicida com a cabeça do fosfolipídio. Sendo assim, a AMT permanece embebida entre as cabeças polares do DPPC com as cadeias alifáticas do herbicida buscando a interface ar/água.

A Figura 32b ilustra a interação da ATZ em subfase de monocamada de DPPC por meio de PM-IRRAS. Os espectros de PM-IRRAS mostram que o herbicida interage com o grupo fosfato (hidrofílico) do fosfolipídio. A ATZ têm um $pK_a \approx 1,7$, e nesse sistema com $pH \approx 6$ a ATZ na subfase está com ambas as aminas desprotonada¹⁷. O herbicida neste caso enfrenta dificuldade para interagir com o fosfolipídio, pois fica susceptível a interação de hidrogênio com moléculas de água. As cadeias alifáticas da

ATZ são semelhantes ao da AMT, no entanto, o pKa da ATZ é muito baixo, permitindo que a ATZ esteja totalmente desprotonada, e com isto as cadeias laterais alifáticas não buscam uma interação com os grupos hidrofóbicos do DPPC. No entanto, mesmo com essa dificuldade para interagir com o DPPC, a ATZ consegue aproximar seu anel triazínico (hidrofílico) aos grupos fosfato e colina do DPPC. Diferente da AMT, a ATZ possui um Cl na posição R1 e isto gera uma interação eletrostática com o grupo colina do fosfolipídio, fortalecendo a interação ATZ/DPPC nesta região. As interações do grupo fosfato do DPPC com o anel triazínico da ATZ e do Cl da ATZ com o grupo colina do DPPC possivelmente geram desordem na cauda do fosfolipídio, como mostra a ilustração da Figura 32b.

A PRM possui um pKa $\approx 4,6$, valor este muito próximo da AMT. O sistema da subfase aquosa com PRM em monocamadas de DPPC apresenta pH ≈ 6 (Figura 32c). Em virtude do pH estar mais próximo do pKa se comparado a ATZ, a PRM apresenta o mesmo estado de protonação da AMT. Neste caso o herbicida está com apenas uma amina protonada, não sofrendo tanta influência da água como a ATZ na competitividade de interagir com o DPPC por meio das duas alquiloaminas. A PRM dentre os herbicidas estudados (AMT, ATZ) é o único que apresenta duas laterais alifáticas isopropil. Além disso foi o herbicida que causou maior desordem na cauda do DPPC observado por meio dos espectros de PM-IRRAS. Este fato possivelmente ocorre devido a PRM possuir um alto caráter hidrofílico em relação aos outros herbicidas (AMT e ATZ). O anel triazínico e o substituinte R1 (SCH₃) interagem com o grupo fosfato do DPPC, resultado semelhante a AMT. No entanto, no caso da PRM por apresentar dois grupos isopropílico, busca com maior vigor a interface ar/água e a interação com os grupos CH₂ do início da cauda (região hidrofóbica) do DPPC. Essas evidências ficam claras quando comparam-se os valores de Δ_{IR} dos espectros de PM-IRRAS na relação $\nu_{s}CH_2/\nu_{as}CH_2$

da AMT, ATZ e PRM. A PRM foi o único herbicida que mostra alteração na banda em 1466 cm^{-1} (δCH_2) observada no espectro de PM-IRRAS. Outro fator que pode estar corroborando para a PRM estar mais próxima da interface ar/água e do grupo CH_2 da cauda do DPPC, ao invés de estar entre os grupos fosfato e colina do DPPC, é o impedimento estérico. De acordo com Lebaron *et al.*¹⁷ fosfolipídio em solução aquosa possui um ânion e fornece um bom ambiente para interagir. Em vista disso, a molécula de PRM apresenta a maior quantidade de grupos CH_3 ao compará-la aos herbicidas AMT e ATZ, devido as duas laterais isopropil (positiva) que permitem realizar ligação iônica com a região fosfato do DPPC. Por outro lado, a PRM por apresentar dois grupos laterais isopropil com terminação CH_3 apresenta um maior impedimento estérico que os herbicidas AMT e ATZ. O trabalho de Vieira *et al.*¹¹¹ utilizando os herbicidas ATZ e diuron (herbicida sistêmico) mostra que a ATZ, por apresentar maior quantidade de grupos CH_3 , causa impedimento estérico e inibe a formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas do herbicida com o material, o que diminui a interação¹¹¹. Já Grillo *et al.*¹¹² estudam a estabilidade dos herbicidas ATZ, AMT e simazina (SIM) em interação com polímeros e observaram que há diferentes graus de interações entre as moléculas de herbicidas com o polímero. As estruturas químicas da ATZ e AMT contêm uma maior quantidade de grupos CH_3 em relação a SIM, o que causa maior impedimento estérico e inibe a formação de ligações de hidrogênio entre o herbicida e o material¹¹². Portanto, possivelmente o impedimento estérico é também um outro fator para a PRM não interagir com o grupo colina do DPPC (944 cm^{-1}) e preferir a região próxima a interface ar/água.

A AMT foi o herbicida que apresentou o maior deslocamento das isotermas π -A para maiores áreas em relação a ATZ e PRM, bem como o único a causar ruptura na monocamada (13 mN/m) de DPPC observada por meio das imagens de BAM. Isto,

possivelmente, se deve ao fato do anel triazínico da AMT interagir com o grupo fosfato e colina do DPPC. Sendo assim o herbicida está embebido entre as cabeças polares de DPPC, causando um afastamento das moléculas do fosfolipídio, acarretando em um maior deslocamento das isotermas de DPPC na presença da AMT. O que provavelmente, causa a ruptura notada por meio das imagens de BAM.

No caso da ATZ, o herbicida também causa deslocamento das isotermas π -A (menor que a AMT e maior que a PRM) de DPPC para maiores valores de áreas. Os espectros de PM-IRRAS mostraram que a ATZ interage com o grupo polar do DPPC, igual aos demais herbicidas. No entanto, este herbicida diferente da AMT e PRM, possui pKa muito baixo, o que gera competitividade entre a interação DPPC/ATZ e ATZ/água, pois no pH do sistema experimental a ATZ também interage com as moléculas de água. Ainda assim, há moléculas de ATZ que conseguem interagir com o DPPC, mais especificadamente com os grupos fosfato e colina. A ATZ, apresenta uma certa afinidade pelo grupo colina, pois apresenta um Cl em sua estrutura molecular. Devido ao grupo colina do DPPC estar mais abaixo em relação a interface ar/água, as moléculas de ATZ não estão embebidas na monocamada de DPPC como a AMT, deslocando menos a isoterma π -A. Possivelmente, são estas interações que causam a destruturação dos domínios do DPPC observados por meio das imagens de BAM.

A PRM, é o único herbicida que mostrou interagir (espectros de PM-IRRAS) com o grupo CH₂ do início da cauda hidrofóbica do DPPC, sendo este o único herbicida entre os estudados (AMT e ATZ) que apresenta duas cadeias laterais alifáticas isopropil (hidrofóbicas). Este fator faz com que este herbicida busque as cadeias hidrofóbicas do DPPC com maior força em comparação a AMT e ATZ. Provavelmente, em virtude desta interação mencionada, a PRM foi o herbicida que causou a maior desordem da cadeia hidrofóbica do DPPC (Δ_{IR} de 0,54 p/ 0,86). As imagens de BAM também mostram que

a interação DPPC/PRM causa a destruturação dos domínios do DPPC, supostamente em virtude das interações mencionadas. A PRM foi o herbicida que menor causou deslocamento da isoterma π -A para maior valor de área o que corrobora com os resultados de PM-IRRAS, pois o herbicida está buscando a interface ar/água em direção às cadeias hidrofóbicas do DPPC, não estando muito embebido entre as moléculas do fosfolípido, mais especificamente, entre as cabeças polares, como os outros herbicidas AMT e ATZ.

3.8.GUVs de DPPC na ausência e presença dos herbicidas: microscopia de contraste de fase

A Figura 33 mostra imagens obtidas na microscopia de contraste de fase para as GUVs de DPPC em temperatura ambiente (23 °C), na ausência (Figura 33a) e presença (Figura 33b) dos herbicidas AMT, ATZ e PRM na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L.

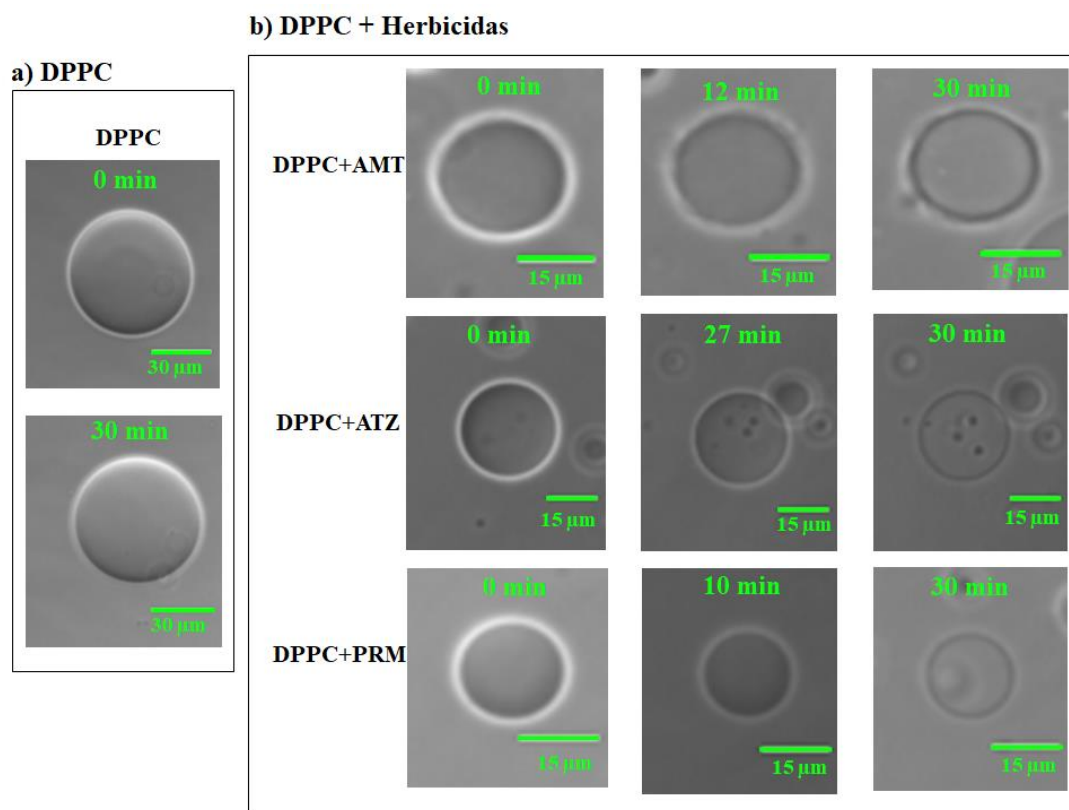


Figura 33: imagens de microscopia de contraste de fase das GUVs de DPPC na ausência e na presença dos herbicidas AMT, ATZ e PRM na concentração $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L, no intervalo de tempo até 30 min.

A maior parte das GUVs de DPPC apresenta o formato esférico, porém algumas, devido à transição de fase do DPPC ser próxima de 41 °C e o experimento ocorrer em temperaturas próximas de 23±1°C, a morfologia apresentada é característica de membrana rígida (ou fase gel)¹¹³. As GUVs de DPPC foram obtidas pelo método de eletroformação e estão de acordo com as GUVs relatadas na literatura em relação à alta quantidade de GUVs e poucas defeituosas^{75,114}. Outra característica das GUVs de DPPC que mostra a Figura 33a é a estabilidade da mesma para o intervalo de 30 minutos. Também não foi observada mudança no formato das GUVs de DPPC na ausência dos herbicidas durante o intervalo de 30 min. Por outro lado, as exposições das GUVs de DPPC aos herbicidas (Figura 33b) causam a perda do contraste das GUVs para concentração (1,0 x 10⁻⁵ mol/L) de herbicida. As GUVs permanecem estáveis até certo período de tempo, porém, quando inicia a troca entre o conteúdo dos meios interno e externo das vesículas, há a perda do contraste de fase. A perda de contraste indica que a presença do herbicida causa poros na bicamada lipídica¹¹⁵ e possivelmente os herbicidas estão entre os fosfolipídios causando essa abertura (poros). No entanto, estes poros não ocasionam rompimento da bicamada, visto que as GUVs permanecem intactas até o fim da análise (30 minutos). Lee *et al.*¹¹⁵ mostram a perda de contraste das GUVs de DOPC/DOPG na presença do peptídeo melitina mesmo na faixa de concentração de nanomolar. Neste caso¹¹⁵ a melitina causa poros na membrana lipídica ocasionando a perda do contraste, sem causar rupturas da membrana. Para melhor elucidar este efeito da perda de contraste de fase e saber qual herbicida afeta mais as GUVs de DPPC, foi realizada uma análise quantitativa. A Tabela VI mostra uma análise quantitativa das GUVs de DPPC na presença da AMT, ATZ e PRM para a concentração de 1,0 x10⁻⁵ mol/L após 30 minutos, relacionando o tamanho das vesículas com a quantidade das mesmas que foram afetadas.

Tabela VI: análise quantitativa para as GUVs de DPPC na presença de $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L dos herbicidas AMT, ATZ e PRM após o intervalo de 30 min.

DPPC+AMT	Tamanho (μm)	Quantidade (N°)	GUVs (perda de contraste)	Porcentagem (%)
	< 10 μm	824	697	85
	10 e 30 μm	284	241	85
	> 30 μm	29	23	79
	Total	1137	961	85
DPPC+ATZ	Tamanho (μm)	Quantidade (N°)	GUVs (perda de contraste)	Porcentagem (%)
	< 10 μm	393	82	21
	10 e 30 μm	403	222	55
	> 30 μm	40	16	40
	Total	836	320	38
DPPC+PRM	Tamanho (μm)	Quantidade (N°)	GUVs (perda de contraste)	Porcentagem (%)
	< 10 μm	364	59	16
	10 e 30 μm	314	143	45
	> 30 μm	37	10	27
	Total	715	212	30

Pode-se notar que a AMT nas GUVs de DPPC causa um efeito de perda de contraste de fase maior que a ATZ e a PRM. Observa-se que das 284 GUVs entre 10 e 30 μm, 85 % perderam o contraste de fase após 30 minutos. As GUVs maiores de 30 μm, 79% perderam o contraste, e para menores que 30 μm, cerca de 85 % foram afetadas. Isto mostra que, independentemente das dimensões das GUVs de DPPC, houve um efeito considerável causado pela AMT na bicamada lipídica, apresentando um total de perda de contraste por volta de 85 %. Por outro lado, as GUVs de DPPC na presença da ATZ e PRM apresentam um efeito menor de perda de contraste, porém também significativo. As GUVs de DPPC na presença da ATZ mostraram um efeito de perda de contraste por volta de um total de 38%. Já a PRM mostrou um efeito ainda menor de perda de contraste, apenas 30% do total das GUVs.

As medidas de contraste de fase (bicamadas) e de isothermas π -A (monocamadas) mostram uma correlação direta, pois a AMT produz o maior efeito nas bicamadas (GUVs), seguida pela ATZ e depois PRM. Nas monocamadas têm-se as mesmas relações, pois as isothermas π -A deslocam-se para maiores valores de área com AMT, seguida pela ATZ e depois PRM na subfase de DPPC.

Capítulo 4

4. Detecção dos herbicidas triazínicos via SERS

4.1. Caracterização do coloide de Ag na ausência e na presença dos herbicidas

4.1.1. TEM, Potencial zeta e Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e o histograma do diâmetro das AgNP (Figura 34) mostram uma forma esférica predominante de (26 ± 2) nm, consistente com os trabalhos de Leopold e Lendl¹¹⁶ e Cañamares *et al.*¹¹⁷.

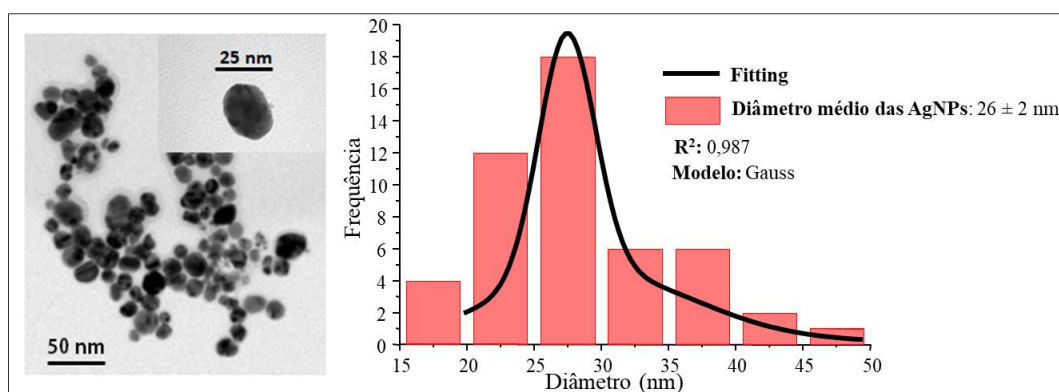


Figura 34: imagem de TEM e histograma de distribuição de diâmetros do coloide de Ag.

A seguir a Tabela VII mostra os valores dos potenciais zeta das AgNP na ausência e na presença dos herbicidas.

Tabela VII: valores de potenciais zeta das AgNP na ausência e na presença dos herbicidas.

Coloide	AgNPs+ Herbicidas		
AgNP	AMT	ATZ	PRM
$\zeta = -30,23 \pm 0,50$	$\zeta = -24,03 \pm 1,42$	$\zeta = -29,05 \pm 1,86$	$\zeta = -28,03 \pm 1,06$

Considerando que o potencial zeta reflete a repulsão eletrostática entre partículas, foi possível analisar diretamente a estabilidade do coloide de Ag na ausência e na presença dos herbicidas. Pois, saber a estabilidade do coloide é fundamental para uma

futura aplicação da técnica SERS (um dos objetivos desta tese). Além do mais, é importante entender se é necessário a utilização de sal (a ponto que não ocorra a precipitação das AgNP) para agregar o coloide, pois isto aumenta os sítios ativos presentes no coloide. Consequentemente ajuda na amplificação do sinal SERS das moléculas adsorvidas na superfície das AgNP. O que por fim, contribui para detectar moléculas em baixíssimas concentrações^{5,84,85,117}. O valor do potencial zeta do coloide de Ag na ausência dos herbicidas (Tabela IX) está na região denominada estável ($\zeta \leq -30\text{mV}$ ou $\zeta \geq 30\text{mV}$) de acordo com a literatura¹¹⁸⁻¹²⁰. A Tabela VII mostra mudanças insignificativas no valor do potencial zeta do coloide de Ag na presença dos herbicidas PRM e ATZ. Porém, há uma maior variação do valor do potencial zeta na presença da AMT, de -30mV do coloide de Ag para -24mV na presença do herbicida. Devido este valor não chegar próximo de zero, não ocorre a precipitação das AgNP, mas essa pequena variação, possivelmente é um fator positivo. Esta variação pode facilitar/ajudar a aplicação desse sistema na detecção do herbicida por meio da técnica SERS. Já que a agregação/aproximação das AgNP permite obter regiões denominadas como “hot spots”, possibilitando assim detectar a AMT em baixíssimas concentrações. O trabalho de Furini *et al.*⁶¹ mostra a detecção do fungicida carbendazim (CBZ) por meio de AgNP. Tal efeito SERS foi possível, pois o CBZ apresenta afinidade pela superfície das AgNP, fazendo com que as nanopartículas se agreguem, diminuindo o valor do potencial zeta e criando sítios ativos para que facilite a detecção do fungicida.

Além de analisar a carga do coloide de Ag na ausência e na presença dos herbicidas, medidas de DLS foram realizadas para analisar a distribuição dos diâmetros das AgNP na ausência (Figura 35a) e na presença da AMT, ATZ e PRM (Figuras 35b, 35c e 35d).

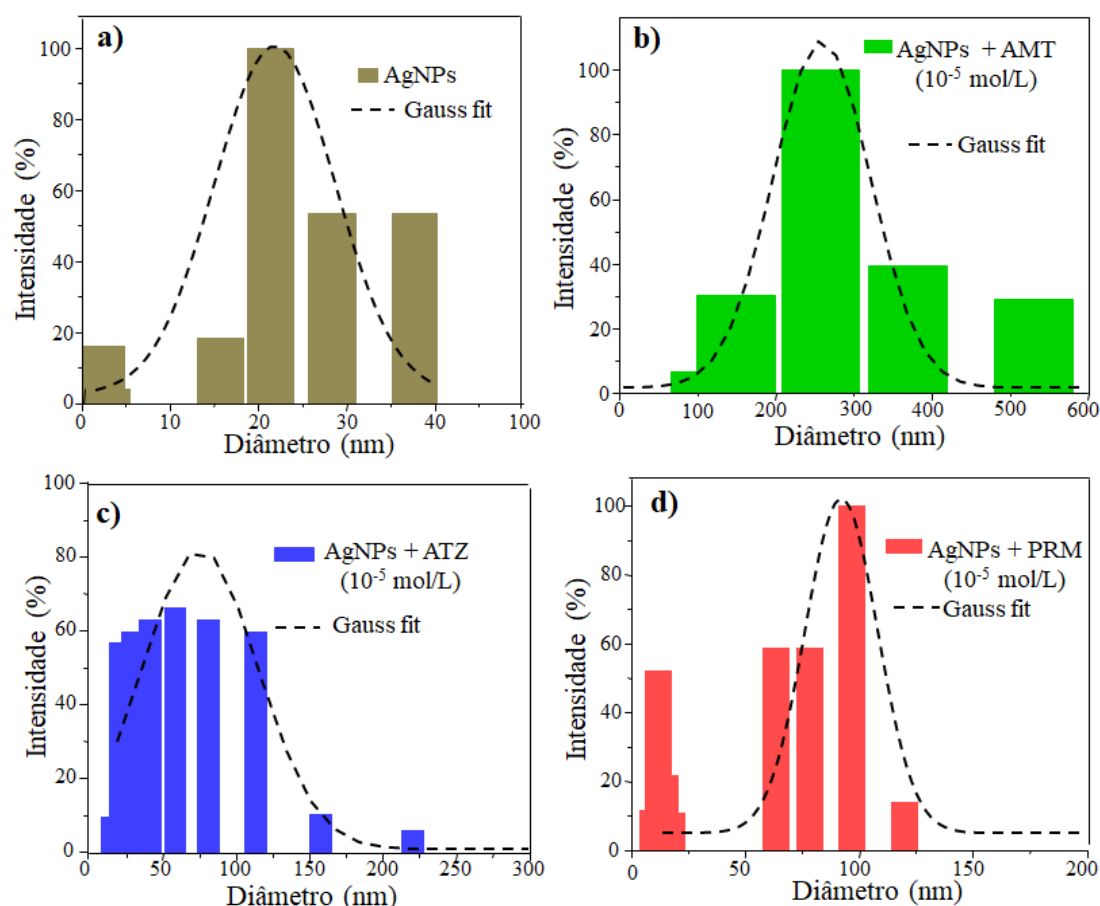


Figura 35: a) DLS do coloide de Ag na ausência e na presença da b) AMT, c) ATZ e d) PRM na concentração de 10^{-5} mol/L. Nas abscissas estão o diâmetro das AgNP em função da intensidade, presente nas ordenadas.

O histograma das AgNP na ausência dos herbicidas (Figura 35a) mostra que o coloide de Ag, apresenta uma maior população de nanopartículas com diâmetro médio em torno de 20-25 nm. Valor este próximo do observados nas imagens de TEM e do histograma (26 ± 2) da Figura 34. Além do mais, esses valores estão de acordo com os reportados na literatura para AgNP sintetizadas com o agente redutor cloridrato de hidroxilamina¹¹⁸. Por outro lado, os histogramas das Figuras 35b, 35c e 35d mostram que houve aumento do diâmetro das AgNP na presença da AMT, ATZ e PRM. Possivelmente, devido a adsorção dos herbicidas na superfície das AgNP, mostrando que as AgNP não estão mais isoladas como mostra a Figura 35a. Além do mais, os valores de diâmetros das AgNP na presença da AMT chamam a atenção, pois houve um grande aumento do diâmetro (de ~25nm para ~300 nm). A ATZ na presença das AgNP

foi a que apresentou a menor variação de diâmetro (de $\sim 25\text{nm}$ para $\sim 75\text{nm}$). Já as medidas de DLS das AgNP na presença da PRM mostram que existem duas populações de tamanhos, sendo uma população na faixa de 100 nm e outra população menor, de 25 nm. Possivelmente, a PRM não consegue agregar por completo o coloide de Ag, havendo nanopartículas menores. O trabalho de Berte *et al.*¹²¹ mostram a relação dos espectros de extinção das AgNP na ausência e presença de peptídeos com medidas de DLS. Em relação aos espectros de extinção houve uma diminuição da intensidade e um aparecimento de uma cauda (banda larga) em valores de altos comprimentos de ondas das AgNP na presença dos peptídeos. As mesmas amostras apresentam aumento do diâmetro médio por meio do DLS¹²¹. Este resultado é semelhante ao desta tese de doutorado, principalmente ao coloide de Ag na presença da AMT, pois foi observado uma cauda (banda larga) na região do infravermelho próximo nos espectros de extinção das AgNP (seção a seguir). Além da medida de DLS apresentar elevado aumento no diâmetro. Portanto, os resultados obtidos para o DLS foram semelhantes aos encontrados na literatura, porém com analitos distintos. Além disso, os resultados corroboram com as medidas de extinção que serão discutidos a seguir.

4.1.2. Espectro de extinção

A Figura 36 mostra os espectros de extinção do coloide de Ag na ausência e na presença da AMT, PRM e ATZ na concentração de 10^{-4} mol/L. O espectro do coloide de Ag apresenta máximo em 407 nm, valor este semelhante ao relatado na literatura para a síntese de AgNP com o agente redutor cloridrato de hidroxilamina^{55,116,122,123}.

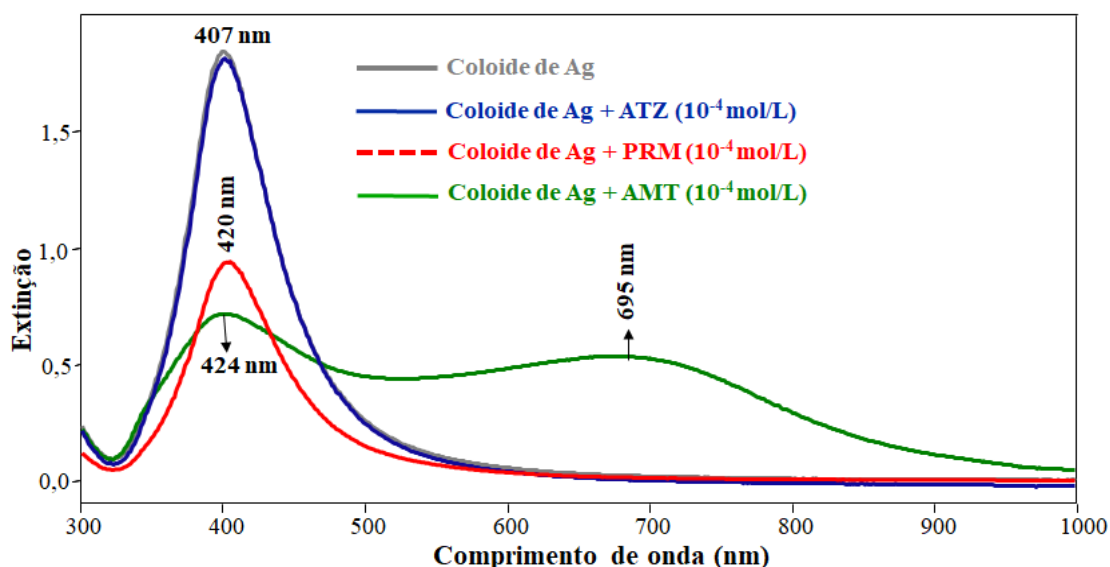


Figura 36: espectros de extinção no UV-Vis do coloide de Ag na ausência e na presença da AMT, PRM e ATZ na concentração de 10^{-4} mol/L. pH 6.

O espectro de extinção do coloide de Ag na presença da ATZ não apresenta alterações significativas. Isso, possivelmente mostra que a ATZ apresenta dificuldade para interagir com as AgNP. Já a adição da PRM na suspensão de AgNP induz ligeiras mudanças no espectro UV-vis. A intensidade da ressonância plasmônica máxima diminuiu cerca de 69% e desloca para um comprimento de onda mais alto (de 407 para 420 nm). Além disso, a área integrada diminuiu 63%. Essas alterações podem estar relacionadas à adsorção da PRM na superfície das AgNP, induzindo a agregação das nanopartículas. Outros compostos com grupos semelhantes, como a lucigenina, diquat e paraquat, também apresentam alta afinidade com a superfície da Ag e induzem o mesmo efeito de agregação que o herbicida PRM¹²⁴. Mudanças mais significativas ocorrem na presença da AMT. Além do deslocamento do *plasmon* de 407nm para 424 nm e diminuição na intensidade há

o surgimento de uma banda larga na região do infravermelho próximo (500-800 nm), característica de formação de aglomerados^{5,51,55}. O surgimento dessa nova banda é acompanhado por uma alteração na coloração do coloide, percebida visualmente. Embora esse comportamento indique a formação de agregados, não foi observado a formação de precipitados. As mudanças observadas com a adição da AMT no coloide mostram a alta afinidade que o herbicida possui pela superfície da Ag e que será discutida mais adiante.

4.2. Medidas Raman e SERS: PRM e AMT em coloide de Ag

O espectro Raman da PRM em pó (purificado seguindo o método descrito na seção experimental) e o espectro SERS da PRM 10^{-4} mol/L são mostrados na Figura 37a e 37b para as regiões de baixo e alto número de onda, respectivamente. A Figura 38 mostra os espectros Raman (pó) e SERS da AMT na concentração de 10^{-4} mol/L. Também é mostrado o espectro Raman do coloide de Ag como referência nas Figuras 37 e 38.

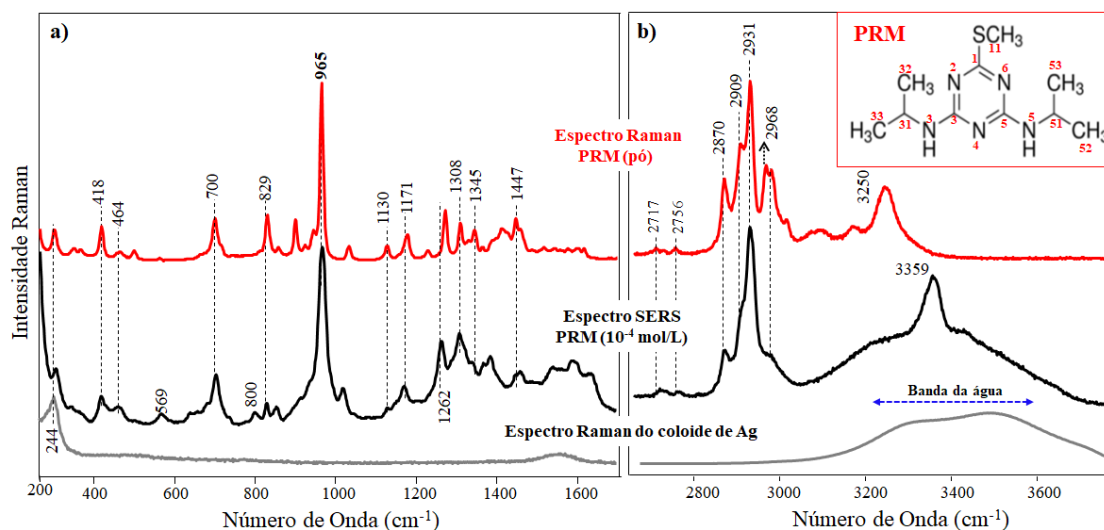


Figura 37: espectro Raman da PRM em pó (purificado). Espectro SERS de PRM a 10^{-4} mol/L em coloide de Ag (pH 6). O espectro Raman do coloide de Ag é dado como referência (controle). a) Frequências mais baixas e b) frequências mais altas (os espectros são normalizados separadamente em a) e b)). Linha de laser a 532 nm. A inserção mostra a estrutura neutra na molécula de PRM.

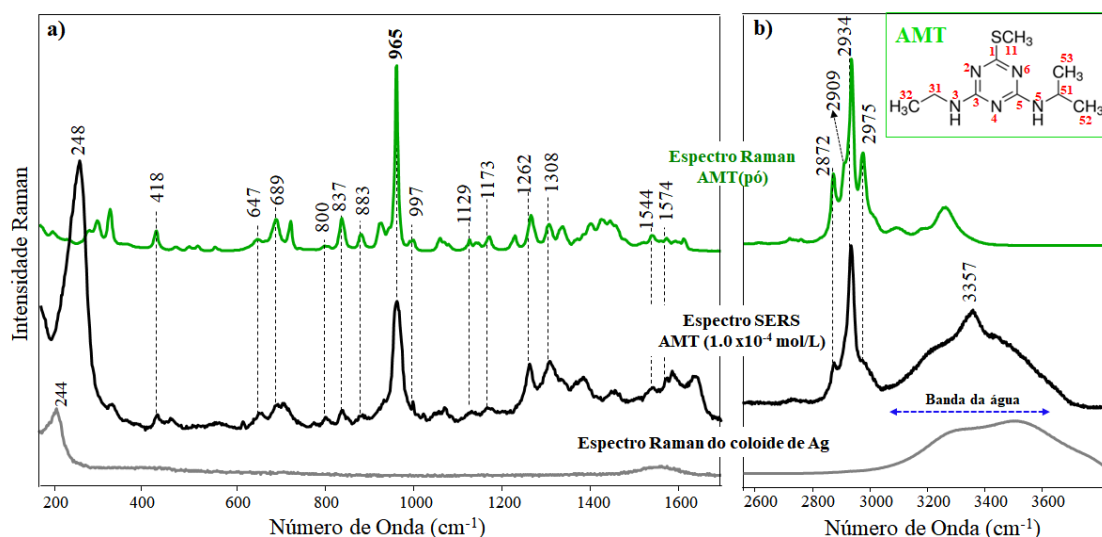


Figura 38: espectro Raman da AMT em pó. Espectro SERS de AMT a 10^{-4} mol/L em coloide de Ag (pH 6). O espectro Raman do coloide de Ag é dado como referência (controle). a) Frequências mais baixas e b) frequências mais altas (os espectros são normalizados separadamente em a) e b)). Linha de laser a 532 nm. A inserção mostra a molécula de AMT em seu estado neutra.

O coloide de Ag apresenta apenas as bandas em 244 cm^{-1} (alongamento Ag-Cl) e 3400 cm^{-1} atribuída a banda da água⁷⁸ que são comuns para essas nanopartículas¹¹⁷. Nosso grupo reportou⁴ a tendência dos pesticidas triazínicos, mais especificadamente da PRM e ATZ a sofrerem degradação sob algumas condições (temperaturas, pH, água e/ou microrganismos presentes no solo, como substâncias húmicas)⁴. No presente trabalho, purificamos a PRM comercial e, portanto, a ausência de outras bandas indica baixo nível de impurezas devido à degradação da PRM. As principais bandas do espectro SERS da PRM e AMT são destacadas por linhas pontilhadas e as atribuições são apresentadas na Tabela VIII. A AMT não apresenta processos de degradação não sendo necessário realizar o procedimento de purificação.

Tabela VIII: atribuições vibracionais da PRM, AMT em pó (Raman) e na presença do coloide de Ag (SERS).

Prometrina pó (cm ⁻¹)	Prometrina SERS (cm ⁻¹)	Ametrina Pó (cm ⁻¹)	Ametrina SERS (cm ⁻¹)	Atribuições
418	418	418	418	(deformação no plano dos grupos CNC + CSC) ^{70,125}
464	464	-----	-----	(deformação assimétrica do anel) ⁷⁰
-----	569	-----	-----	(deformação assimétrica C5-N4-C3) ⁷⁰
-----	612	-----	-----	(deformação C-S) + (deformação do anel fora do plano) ¹²⁶
-----	-----	647-689	647-689	(estiramento S-CH ₃)
700	700	-----	-----	(estiramento C1-S) ⁷⁰
-----	739	-----	-----	(estiramento Fenil) ¹²⁵
-----	800	800	800	(deformação angular no plano C-N-H) ¹²⁵
829	829	-----	-----	(respiração do anel) ⁷⁰
-----	-----	837	837	(deformação do anel no plano)
-----	-----	883	883	(estiramento do grupo C-N do anel e S-CH ₃)
-----	913	-----	-----	(estiramento no anel do grupo N-C + estiramento C1-S) ⁷⁰
965	965	965	965	(respiração do anel) ¹²⁷
-----	-----	997	997	(estiramento CH ₃ + C-N do anel)
1130	1130	1129	1129	(estiramento S-CH ₃) ⁷⁰
1171	1171	1173	1173	(deformação C-C-H); (deformação do grupo isopropil) ¹²⁵
1269	1262	1262	1262	(deformação do anel no plano do grupo N-C-H) ¹²⁵
1308	1308	1308	1308	(estiramento S-CH ₃); (deformação no plano do anel); (deformação no plano do anel do grupo N-C-H) ¹²⁵
1345	1345	-----	-----	(deformação simétrica S-CH ₃ + C-C-H) ¹²⁸
-----	1385	-----	-----	(estiramento simétrico C=C,C=N) ¹²⁹
1447	1447	-----	-----	(deformação CH ₃) ¹²⁵
-----	-----	1544	1544	(estiramento grupo C-N do anel + deformação N-H)
-----	1586	1574	1574	(estiramento C5-N6); (estiramento C3-N2) ⁷⁰
-----	1621	-----	-----	(deformação no plano do anel e deformação do grupo C3-N3-H) ^{125,127}
2717	2723	-----	-----	(estiramento C-H do grupo CH ₃ do isopropil) ⁷⁰
2756	2762	-----	-----	(deformação H-C-C) ⁷⁰
2870	2870	2872	2872	(estiramento simétrico C-H do grupo CH ₃) ⁷⁰
2909	2909	2909	-----	(estiramento antissimétrico C51-H + C52-H + C53-H) ⁷⁰
2931	2931	2934	2934	(estiramento simétrico C31-H + C32-H + C33-H) ⁷⁰
2968	-----	2975	2975	(estiramento antissimétrico C31-C32-H) ⁷⁰
3250	3356	3250	3357	(estiramento simétrico N-H) ⁷⁰

O espectro Raman do pó da PRM é semelhante ao obtido por Bonora *et al.* usando cálculos teóricos. O espectro é dominado pela banda a 965 cm⁻¹, atribuída à respiração do anel, típica dos pesticidas da família das s-triazina¹²⁸. Outras bandas menos intensas são

observadas em 418, 700, 829, 1262, 1540 e 1588 cm^{-1} , correspondentes ao anel s-triazina acoplado à cadeia lateral S-CH_3 ^{78,128,130}. Além disso, as bandas em 1345 e 1447 cm^{-1} atribuídas aos grupos CH_3 do S-CH_3 e isopropil podem ser distinguidas, bem como as bandas 2870, 2909, 2931 e 2968 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C-H dos grupos laterais alifáticos, estando também presente em herbicidas como ATZ, simazina e AMT (Figura 38)^{69,70,128}. Como também foi observado para o pó da PRM (purificada) e AMT, os espectros SERS da PRM e AMT mostram duas bandas principais em 965 e 2931 cm^{-1} atribuídas ao anel da triazina e ao estiramento C-H da cadeia alifática, respectivamente. Também são observadas as bandas em 1130, 1171, 1308, 2723, 2870, 2909 e 2931 cm^{-1} atribuídas às cadeias alifáticas laterais para a PRM. A presença dessas bandas é uma evidência que estamos obtendo os espectros SERS da PRM e AMT não degradadas^{4,71,72}. Devido à semelhança na estrutura química, o espectro Raman da AMT é semelhante ao da PRM. Pode-se destacar a ausência da banda em 2723 cm^{-1} referente ao estiramento C-H dos grupos CH_3 da lateral alifática nos espectros Raman e SERS da AMT. Isso condiz com o fato de que a AMT apresenta um grupo metil (CH_3) a menos que a PRM.

4.3. Espectros SERS da PRM, AMT e ATZ em diferentes pH

A detecção da PRM purificada em solução aquosa foi estudada em diferentes pHs a fim de otimizar as melhores condições de análise. Os espectros SERS da PRM em diferentes pHs são mostrados na Figura 39.

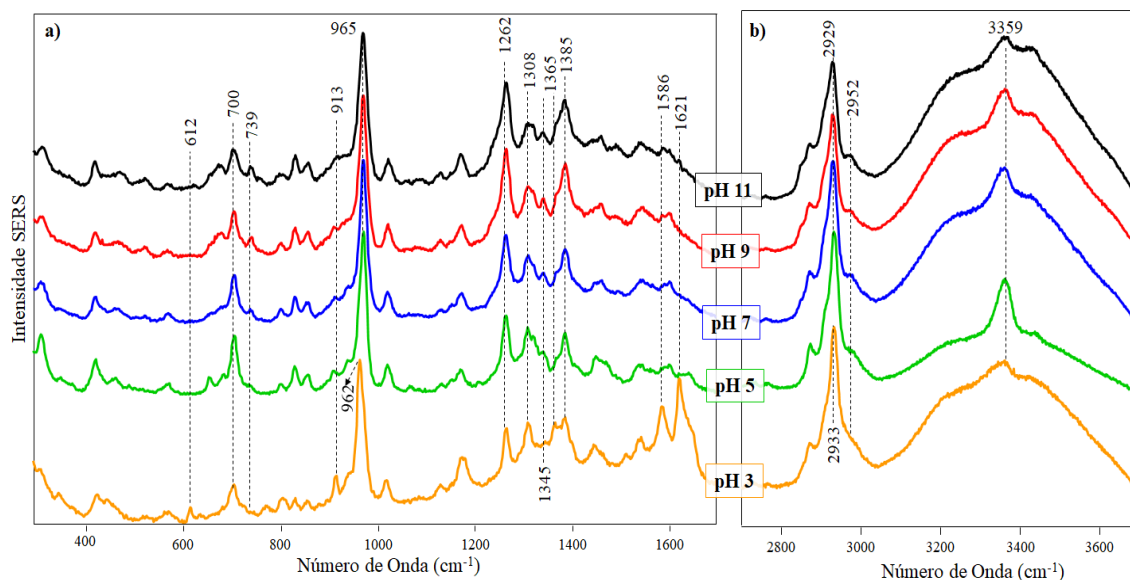


Figura 39: espectros SERS da PRM purificada (10^{-4} mol / L) obtidos em diferentes pHs. a) Frequências mais baixas e b) frequências mais altas (os espectros são normalizados separadamente em a) e b)). Linha de laser a 532 nm.

De forma geral, os perfis de todos os espectros são semelhantes para $\text{pH} \geq 5$, para a PRM. Por outro lado, diferenças notáveis são observadas em um pH mais baixo, tal como, em pH 3. As bandas que aparecem em pH 3 em 612, 913, 1586 e 1621 cm^{-1} desaparecem praticamente à medida que o pH aumenta. Além disso, as bandas respiração do anel e estiramento C-H se deslocam de 965 e 2929 cm^{-1} , em pH acima de 4, para 962 e 2933 cm^{-1} em pH ácido, respectivamente. O espectro SERS da PRM em pH 3, mostra que a intensidade relativa da banda em 1262 cm^{-1} é aumentada, enquanto para a banda em 1308 cm^{-1} é diminuída e a banda em 1345 cm^{-1} (deformação simétrica S-CH₃ + deformação C-C-H) está ausente em pH 3. Outra mudança observada com o pH é que a banda em 1365 cm^{-1} da PRM se torna um ombro para pH acima de 5. Além disso, a banda em 700 cm^{-1} atribuída principalmente ao estiramento C-S é enfraquecida, enquanto em pH alto, um

ombro em 739 cm^{-1} aumenta. Em números de onda mais altos a banda/ombro em 2952 cm^{-1} praticamente desaparece em pH 3, enquanto que a banda em 3359 cm^{-1} (estiramento N-H) diminui nos pHs extremos (3 e 11). As diferenças dos espectros SERS que ocorrem no pH ácido (pH 3) em relação ao pH neutro podem ser atribuídas à hidroxilação da PRM a pH baixo, com a formação da hidroxil-atrazina (HA) após a hidroxilação da PRM a pH ácido (Figura 40). Esse efeito é eficaz apenas em pHs inferiores a 4, como relatado no trabalho de Rubira *et al.*⁴. A Figura 40 mostra o diagrama da protonação e desprotonação da PRM em diferentes pHs. Essa alteração estrutural (hidroxilação ou hidroxil-atrazina - HA) é corroborada pelo surgimento das bandas da fração carbonila em 1586 e 1632 cm^{-1} que são atribuídas ao estiramento C=N e C=O^{4,128} do anel s-triazina em ambientes ácidos. O aparecimento dessas bandas é uma evidência do tautomerismo do grupo -OH na HA resultante da hidroxilação da PRM.

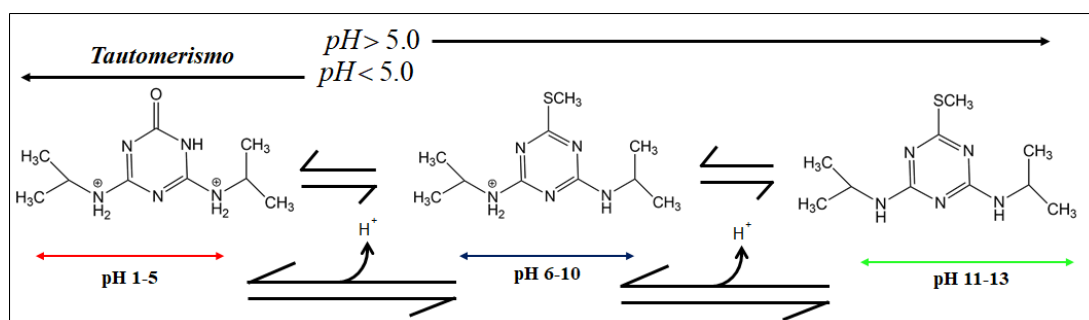


Figura 40: diagrama que ilustra a protonação e desprotonação da PRM em diferentes pH.

A Figura 41a mostra os valores médios da área integrada para a banda de respiração do anel em 965 cm^{-1} em diferentes pH (faixa de 1 a 12), normalizado em relação a banda da água (área da banda em 3400 cm^{-1}). Como pode ser visto, a mudança de pH é determinada por meio de duas regiões com um ponto crítico em pH 5. Esse ponto é determinado pela hidroxilação da PRM, pois abaixo desse pH existe uma clara intensificação das bandas em 1586 e 1621 cm^{-1} , que se tornam muito intensas em pH 3. Este resultado indica a hidroxilação/tautomerização na PRM (*inset* da Figura 41b), levando à PRM hidroxilada (HOPRM), conforme observado nas Figuras 41a. A Figura 41b mostra

a área integrada da banda no intervalo de 1540 a 1680 cm^{-1} responsável pela vibração da carbonila em relação à área da banda do anel triazínico em 965 cm^{-1} . O crescimento dessa região à medida que o pH diminui ($\text{pH} < 5$) torna evidente a hidroxilação da PRM.

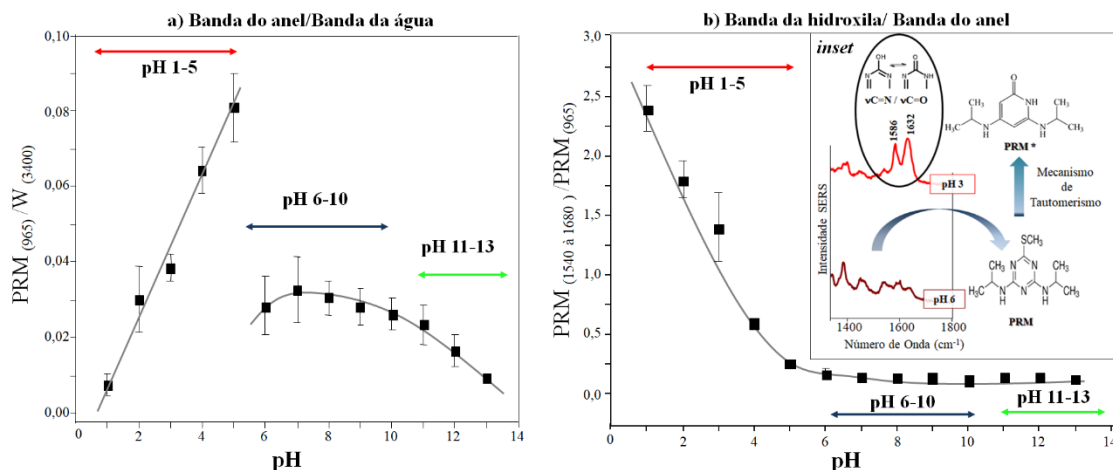


Figura 41: a) variação da área integrada da banda do anel da PRM (purificada) em relação à banda da água (965 cm^{-1} / 3400 cm^{-1}) a diferentes pH. b) Variação das áreas integradas da banda hidroxila em relação à banda do anel (1540 a 1680 cm^{-1} / 965 cm^{-1}) para o sinal SERS da PRM (10⁻⁴ mol/L), a diferentes pH (1 to 13). O *Inset* mostra os espectros SERS da PRM a pH 6 e pH 3, ao lado a estrutura molecular da PRM com a formação de hidroxila, acarretando no tautomerismo.

Do mesmo modo como feito para a PRM, espectros SERS da AMT em diferentes pHs são apresentados na Figura 42. Assim como observado para a PRM, ocorrem alterações nos espectros dependendo do pH do meio. As bandas em 1584 e 1624 cm^{-1} presentes nos pHs 3 e 5 estão ausentes a pH mais alcalinos (conforme indicado pelas setas na Figura 42). Em contrapartida, a banda em 1574 cm^{-1} atribuída ao estiramento C5-N6 e C3-N2 está presente apenas nos espectros SERS em pHs 7, 9 e 11. Também se destacam as bandas 1173 e 1385 cm^{-1} atribuídas à deformação C-C-H e estiramento simétrico C=N que estão presentes apenas nos pHs básicos. A banda em 3357 cm^{-1} atribuída ao estiramento N-H está presente apenas nos pHs 3 e 5. Outros modos vibracionais sofreram deslocamentos sob diferentes pHs do meio, como é o caso do estiramento simétrico do anel que desloca de 965 cm^{-1} em pHs acima de 5 para 962 cm^{-1} em pHs ácidos e o estiramento C-H (alifático) que desloca de 2928 cm^{-1} , em pHs básicos, para 2934 cm^{-1} em pHs ácidos.

Essas alterações indicam que, assim como a PRM, a AMT sofre o processo de hidroxilação em pHs ácidos¹³¹, como apresentado no *inset* da Figura 43b.

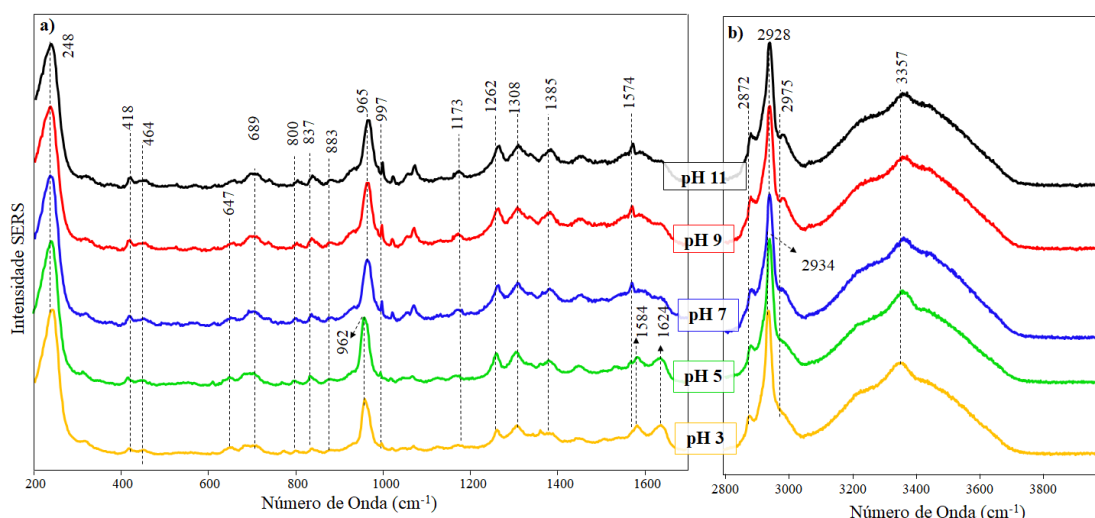


Figura 42: espectros SERS da AMT (10^{-4} mol / L) em diferentes pHs. a) Frequências mais baixas e b) frequências mais altas (os espectros são normalizados separadamente em a) e b)). Linha de laser a 532 nm.

A Figura 43a mostra a área integrada da banda 965 cm^{-1} em relação à banda da água 3400 cm^{-1} . Já a Figura 43b mostra a área integrada da hidroxila em relação à banda do anel (965 cm^{-1}). Como observado para a PRM, o mesmo efeito pode ser visto para a AMT, ou seja, em pHs ácidos (< 5) há a formação de hidroxila, ocorrendo o efeito de tautomerismo (*inset* Figura 43b).

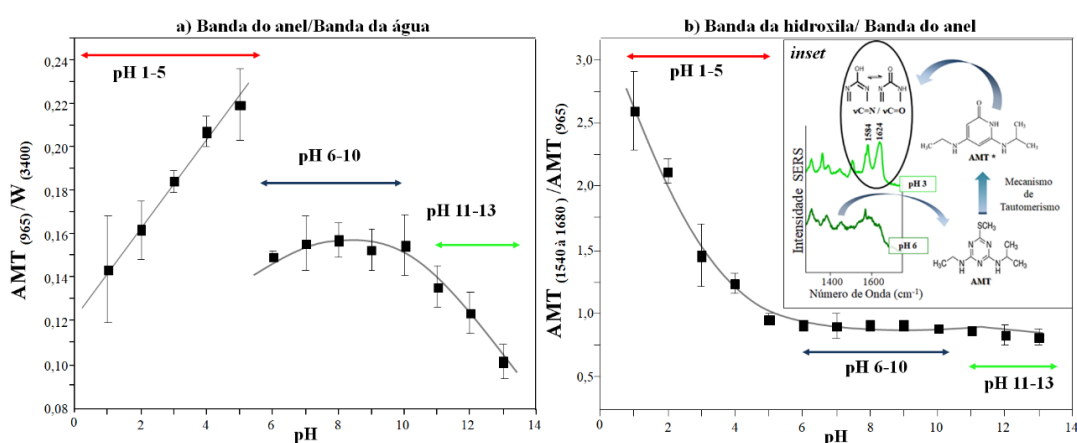


Figura 43: a) variação da área integrada da banda do anel da AMT em relação a banda da água ($965\text{ cm}^{-1}/3400\text{ cm}^{-1}$) a diferentes pHs. b) Variação das áreas integradas da banda hidroxila em relação à banda do anel ($1540\text{ a }1680\text{ cm}^{-1}/965\text{ cm}^{-1}$) para o sinal SERS da AMT (10^{-4} mol/L), a diferentes pHs (1 to 13). *Inset* mostra os espectros SERS da AMT em pH 6 e pH 3 com formação da hidroxila, ocorrendo o efeito de tautomerismo na estrutura molecular da AMT.

No caso da ATZ é interessante notar a completa ausência de sinal SERS em pH acima do seu pKa 1,7 (Figura 44). A mesma dificuldade foi relatada no trabalho de Wei *et al.*¹³² em que utilizam uma plataforma sólida de nanocompósito de nanopartículas de ouro (AuNPs) com celulose bacteriana (BC) para a detecção de poluentes, como carbamazepina (CBZ) e atrazina (ATZ). Eles mostram que ao baixar o sistema para pH < pKa das moléculas, ocorre a precipitação do coloide, não possibilitando a detecção. Em uma análise na literatura sobre a detecção de atrazina em sistemas coloidais, não foram encontrados trabalhos que mostram os espectros SERS da ATZ. Como relatado por Rubira *et al.*⁴ em sistemas com pH > pKa a ATZ não adsorve na superfície da Ag e assim não pode ser detectada diretamente por SERS, possivelmente em virtude do Cl presente em sua estrutura molecular dificultar a adsorção na superfície metálica. O espectro SERS da ATZ obtido na Figura 44 foi possível apenas com o pH abaixo do pKa, porém, nestas condições não há a estabilização do sistema coloidal, então as AgNP se agregam e precipitam, impossibilitando qualquer experimento analítico a pH < pKa para a ATZ. Portanto, a continuidade dos experimentos se deu com a PRM e AMT.

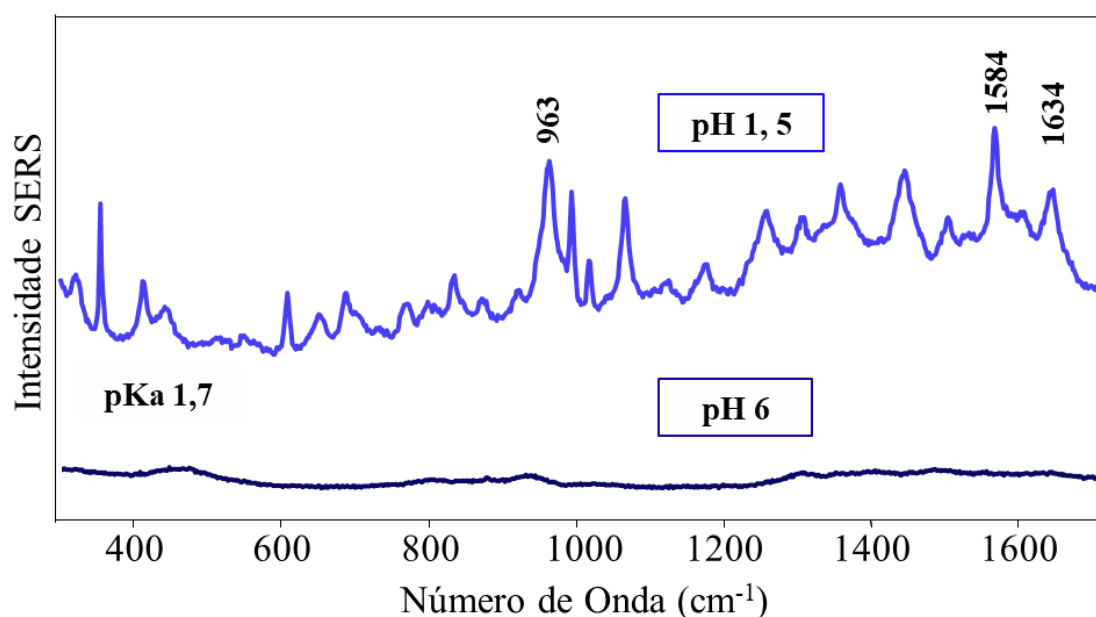


Figura 44: espectros SERS da ATZ purificada em coloide de Ag nos pHs 1,5 e 6. Laser 532 nm.

4.4. Mecanismo de interação

Como discutido na seção anterior, diferentes espécies químicas (HOPRM ou PRM) podem estar presentes dependendo do pH do meio. Observa-se que a intensidade do sinal SERS cai abruptamente acima de pH 5. Provavelmente devido a um efeito associado à diferente afinidade das duas espécies do herbicida (HOPRM e PRM) em relação à superfície do metal e ao mecanismo de interação, ambos diretamente associados à intensidade do sinal SERS. De fato, assumindo que a espécie hidroxilada se torna a configuração ceto, uma interação do grupo C=O com o metal pode ser proposta para as espécies HOPRM (Figura 45a). Esse tipo de interação também foi deduzido para outros analitos similares adsorvidos em Ag^{133,134}. Ao contrário, em pH acima de 5, a interação da PRM com o metal ocorre através da formação de um par iônico entre o N protonado do grupo amino e os íons Cl⁻ adsorvidos na superfície. Os dois mecanismos de interação também podem ser deduzidos a partir da análise da banda correspondente ao estiramento Ag-Cl⁻ (Figuras 45c). A banda em 245 cm⁻¹ aparece em pH abaixo de 5, enquanto acima desse pH essa faixa passa para 220 cm⁻¹, um valor que também é visto em espécies que adsorvem no metal pela formação de um par iônico e pelo estabelecimento de uma interação eletroquímica pelo grupo -NH₂⁺¹³⁵. Embora as espécies keto apresentem uma maior afinidade pela superfície, como indicado pela maior intensidade do sinal SERS, a baixa estabilidade da suspensão a pH abaixo de 5 prejudica a detecção da PRM a pH baixo. Portanto, realizamos essa detecção quantitativa para pH acima de 5.

Além do exposto, o mecanismo de interação pode ser estudado de acordo com as “regras de seleção do fenômeno SERS”^{5,55,136}. A predominância das bandas em 965 e 1262 cm⁻¹ (Figura 39) indica que a PRM adsorve com o anel triazina preferencialmente perpendicularmente à superfície das AgNP, independente do pH. Os modelos são mostrados nas Figuras 45a e 45b. Esse resultado é consistente com o comportamento das

bandas em 965 e 1262 cm^{-1} relacionadas aos modos de estiramento do anel triazina no plano, que não sofrem alterações significativas de intensidade nos distintos pHs. Além disso, no caso da PRM à amplificação das bandas em 569 cm^{-1} (deformação C-N-C), 800/850 cm^{-1} (deformação no plano C-N-H), 1262 cm^{-1} (deformação N-C-H no plano do anel) e 3356 cm^{-1} (estiramento N-H) indica que esses grupos estão próximos da superfície do metal, principalmente em pH acima de 5, além de mostrar a orientação perpendicular da PRM na superfície do metal. Importante observar que anteriormente relatamos o espectro SERS da PRM⁸⁴ cuja orientação do anel triazina era preferencialmente paralela à superfície metálica. Nesse caso, a PRM não foi submetida ao processo de purificação, de maneira que obtemos o sinal SERS do degradado e não degradado em colóide de Ag (meio aquoso). Isto sugere que a forma degradada da PRM (sem cadeia alifática) adsorve preferencialmente paralela à superfície, ao contrário da PRM não degradada^{65,137}.

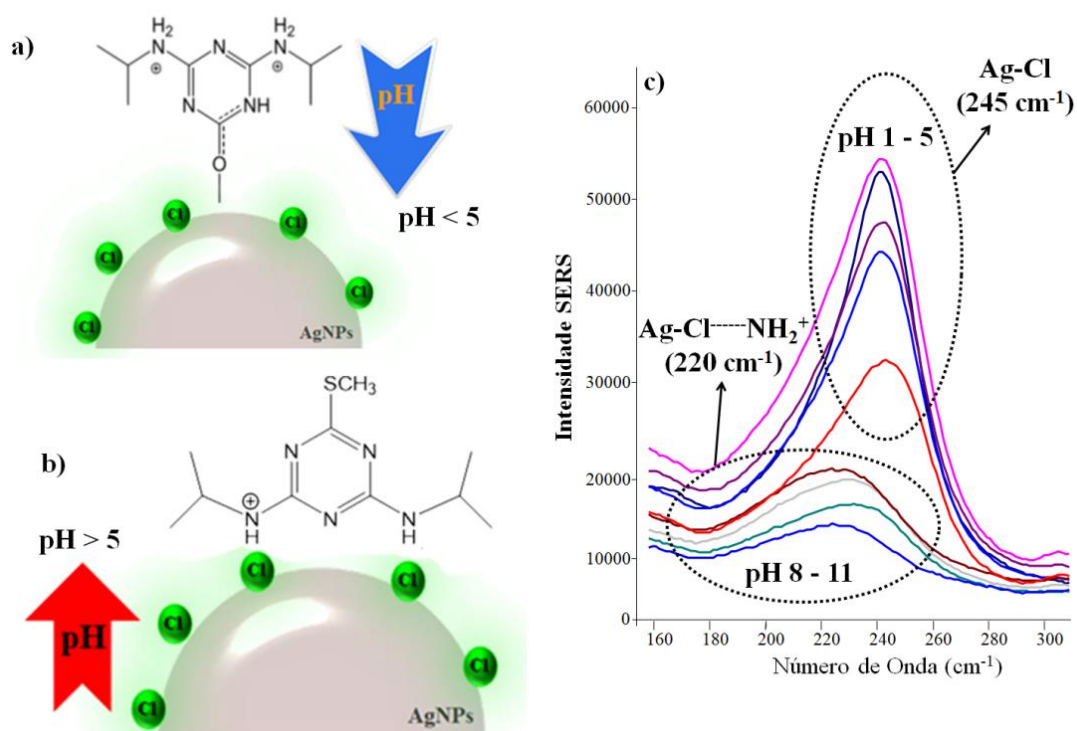


Figura 45: a) e b) mecanismo de interação proposto para análise das bandas correspondentes em 220 e 245 cm^{-1} . c) Espectros SERS da PRM (10^{-4} mol/L) a baixo comprimentos de onda em diferentes pHs.

A Figura 46 apresenta os espectros SERS de AMT em baixas frequências. Essa região pode ser utilizada como um indicativo do tipo de interação entre a AMT e a superfície metálica. Entre $1 < \text{pH} < 5$ há predominância da vibração Ag-Cl^+ em 245 cm^{-1} . À medida que o pH sobe a banda desloca-se para 230 e 220 cm^{-1} , como observado para a PRM. Assim, propomos que o mesmo tipo de interação que ocorre para a PRM, ocorre para a AMT. Desse modo, em pH básico ocorre interação através do um par iônico Cl^- entre $-\text{NH}_2^+$ e em pH ácido, a HOAMT interage através do C=O .

Espectros SERS da PRM (10^{-4} mol/L) a baixo comprimento de onda em distintos pHs

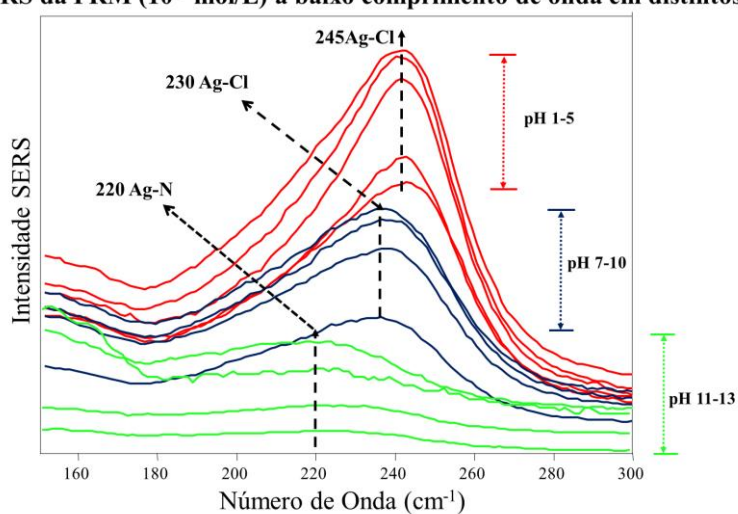


Figura 46: espectros SERS da PRM (10^{-4} mol/L) em distintos pHs (1 a 13) em baixos números de onda. Laser 532 nm.

4.5. Análise quantitativa

4.5.1. PRM

A análise quantitativa foi realizada para dois pHs no caso da PRM a fim de verificar qual condição nos permite obter o LOD mais baixo, garantindo a máxima sensibilidade da análise. Como mencionado anteriormente, em pH menor que 5, o coloide de Ag começa a agregar, levando à precipitação da Ag, dificultando a detecção do herbicida. O mesmo foi observado por Wei *et al.*¹³² ao tentarem detectar atrazina a pH baixo, isto é, uma agregação descontrolada de coloide de Au, que impede a detecção. Em virtude disto, a análise quantitativa da PRM foi realizada em pH mais alto. Os espectros SERS da PRM em pH 11

para uma faixa de concentração de $8,0 \times 10^{-4}$ a $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L são mostrados na Figura 47 e em pH 7 (de $8,0 \times 10^{-4}$ a $4,0 \times 10^{-6}$ mol/L) são apresentados na Figura 48.

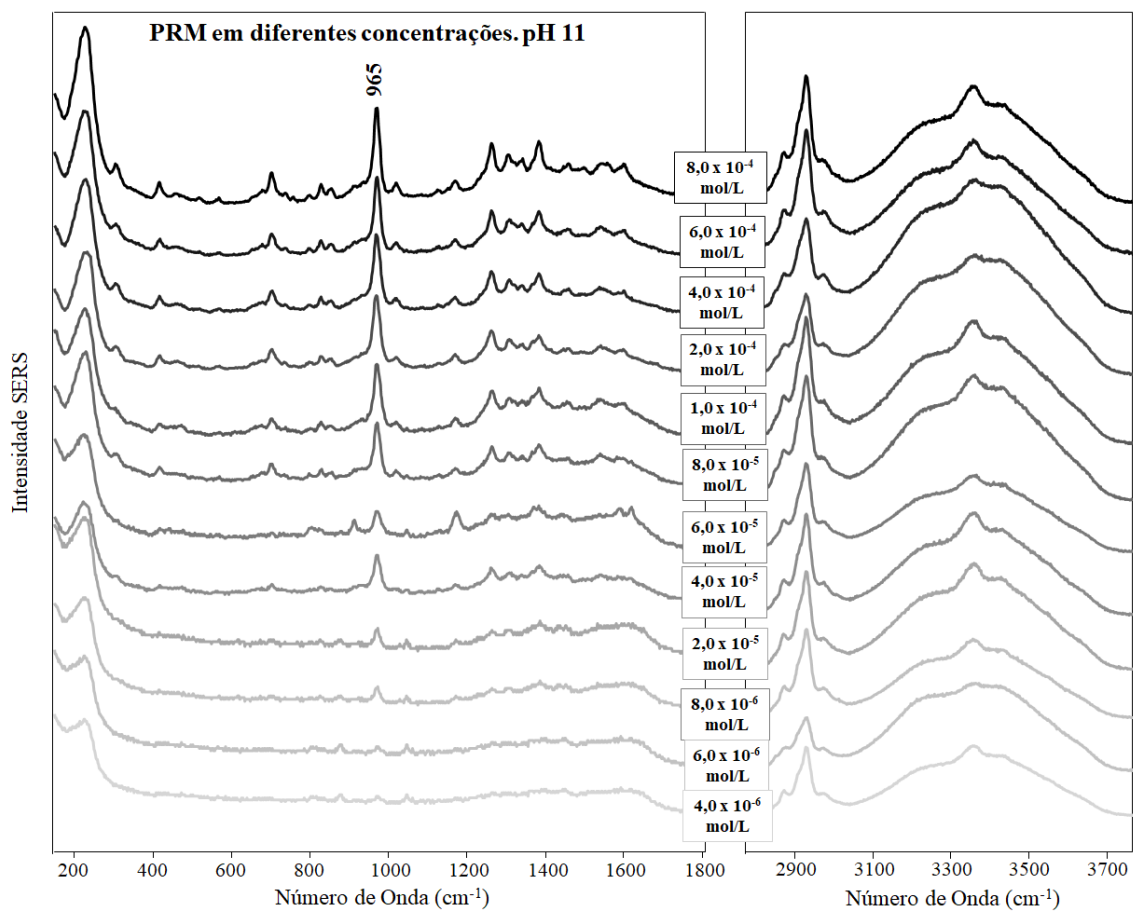


Figura 47: espectros SERS de PRM purificada em diferentes concentrações em pH 11. Linha de laser: 532 nm.

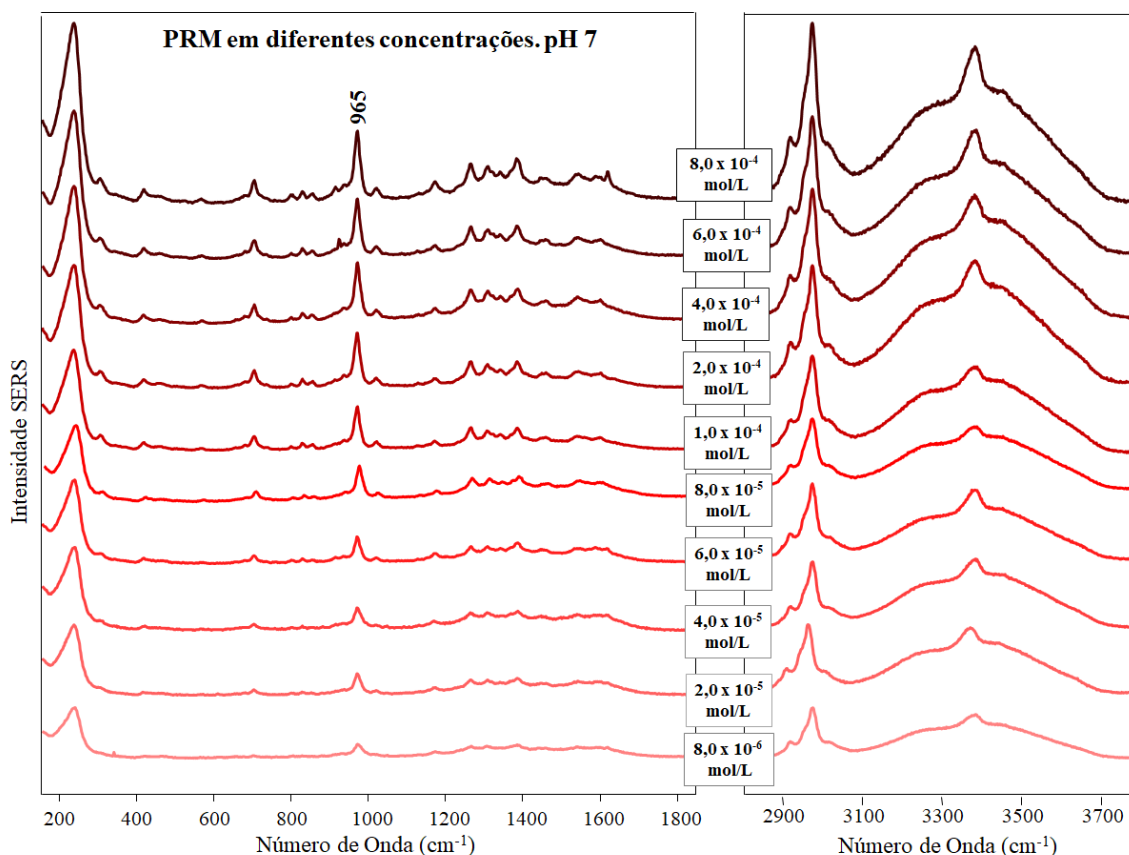


Figura 48: espectros SERS da PRM purificada em diferentes concentrações em pH 7. Linha de laser: 532 nm.

Em geral, houve uma diminuição na intensidade ao diminuir as concentrações para ambos os valores de pHs (11 e 7), enquanto os perfis dos espectros permaneceram inalterados. Com base nos espectros SERS mostrados nas Figuras 47 e 48, as curvas analíticas da PRM foram construídas, permitindo calcular a sensibilidade e o LOD para o PRM. A adsorção de PRM nas nanopartículas metálicas segue um modelo do tipo Langmuir (Figura 49 - lado esquerdo). Isso significa que, em baixas concentrações, a relação entre a intensidade SERS e a concentração da PRM segue um regime linear (Figura 49 - lado direito)¹³⁸. Os resultados mostram que a saturação do sinal SERS ocorre para concentrações acima de $8,0 \times 10^{-4}$ mol/L para pH 11 e $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L para pH 7. Este efeito é atribuído ao fato de que nessas concentrações as moléculas de PRM cobrem toda a superfície das AgNP disponíveis. As regiões de linearidade observadas para a intensidade

SERS foram na faixa de $8,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-5}$ mol/L em pH 7 e $6,0 \times 10^{-5}$ - $8,0 \times 10^{-6}$ a pH 11 (Figura 49 -lado direito).

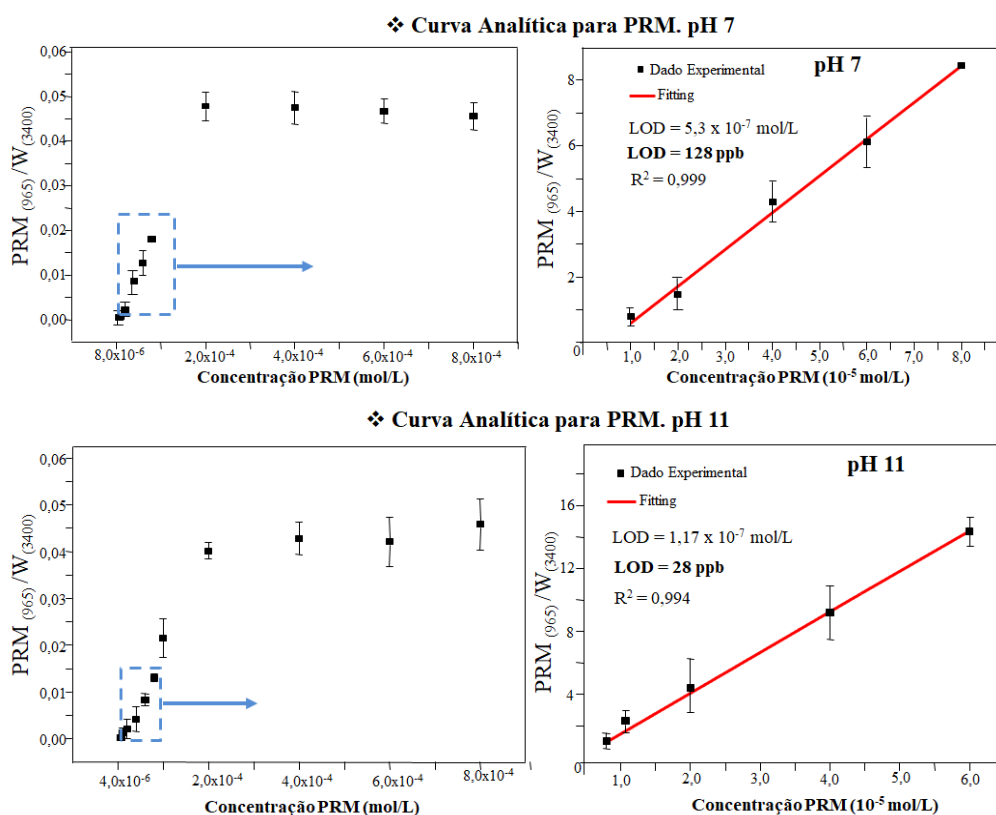


Figura 49: isoterma de adsorção com regime linear traçado para a obtenção das curvas analíticas de PRM com base na intensidade SERS das bandas em 965/3400. pHs 7 e 11.

O *fitting* mostra alta linearidade (o coeficiente linear em pH 7 é $R^2 = 0,999$ e em pH 11 é $R^2 = 0,994$). O desvio padrão é de $4,43 \times 10^{-6}$ em pH 11 e $5,33 \times 10^{-5}$ em pH 7. O LOD depende das alterações no pH (Figura 11), resultando em uma maior sensibilidade a pH 11 (alcalino). O LOD é de 28 ppb em pH 11 e 128 ppb em pH 7. Os LOD nos distintos pHs foram obtidos de acordo com a equação:

$$\text{*PRM pH 7: } LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{b} = \frac{3 \cdot (4,4283 \times 10^{-6})}{25} \approx 5,2 \times 10^{-7} \text{ mol/L, ou } LOD \approx 128 \text{ ppb.}$$

$$\text{*PRM pH 11: } LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{b} = \frac{3 \cdot (4,4283 \times 10^{-6})}{114} \approx 1,2 \times 10^{-7} \text{ mol/L, ou } LOD \approx 28 \text{ ppb.}$$

Observe que o σ é igual para ambos os pHs, isto se dá em virtude dos experimentos serem realizados utilizando-se o mesmo lote de coloide.

Também foram construídas curvas analíticas sem considerar como referência a banda da água (3400 cm^{-1}). Neste caso foi considerada apenas a área da banda 965 cm^{-1} , atribuída ao anel triazínico, como mostra a Figura 50. Um regime linear também foi obtido levando a um LOD de $5,5 \times 10^{-7}\text{ mol/L}$ (134 ppb) em pH 7 e $3,8 \times 10^{-8}\text{ mol/L}$ (9,2 ppb) para pH 11.

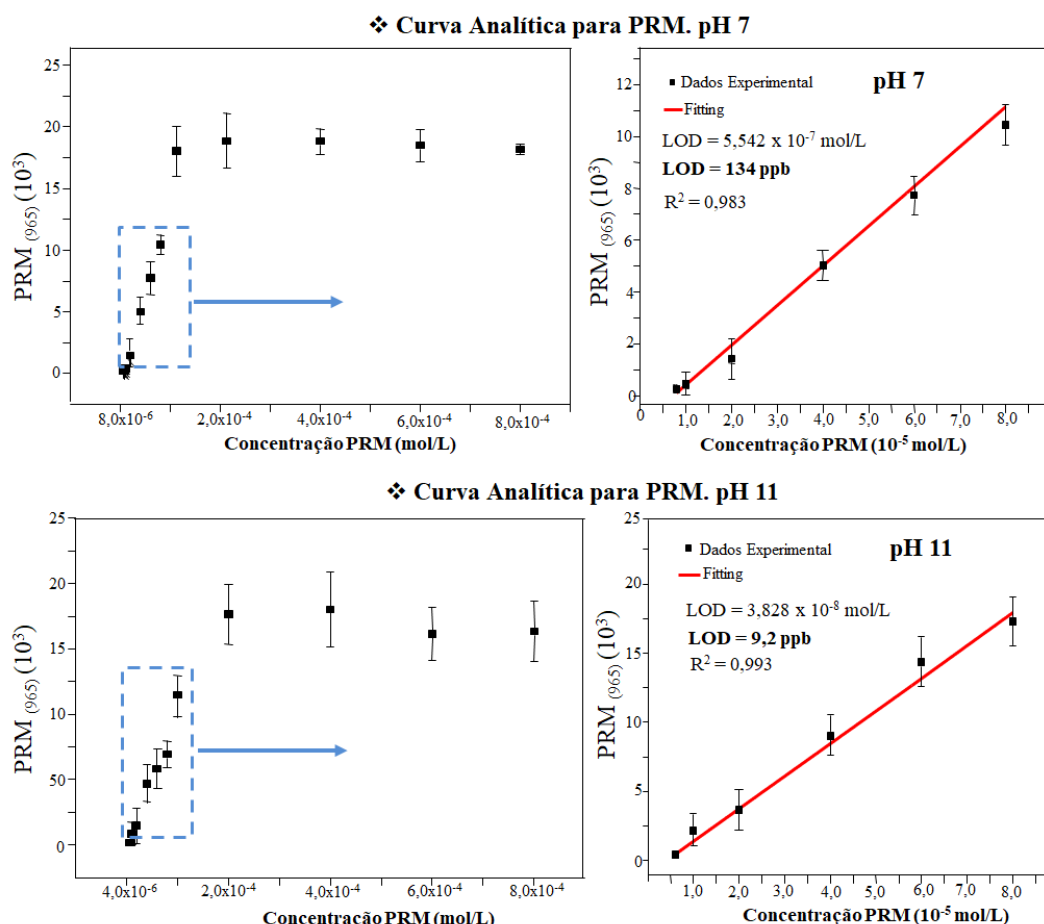


Figura 50: isoterma de adsorção com regime linear traçado para a obtenção das curvas analíticas da PRM com base na intensidade SERS para a área da banda em 965 cm^{-1} . pHs 7 e 11.

Esses resultados corroboram a nossa discussão anterior: quanto maior o pH, mais forte é a doação de elétrons pela PRM ao metal, aumentando sua afinidade com a superfície da Ag. O limite máximo de resíduo (LMR) na água potável para PRM, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), é de 24 ppb, valor próximo do LOD alcançado para nós em pH alcalino¹³⁹.

4.5.2. AMT

A análise quantitativa também foi realizada para a AMT. A análise quantitativa da AMT foi realizada em pH 7, pois, os solos em sua grande maioria apresentam pHs em torno de 6,5 à 7,0¹⁷ (nesse valor é maximizada a disponibilidade de nutrientes). Portanto, espectros SERS da AMT em pH 7 são mostrados para uma faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ a $4,0 \times 10^{-7}$ mol/L na Figura 51.

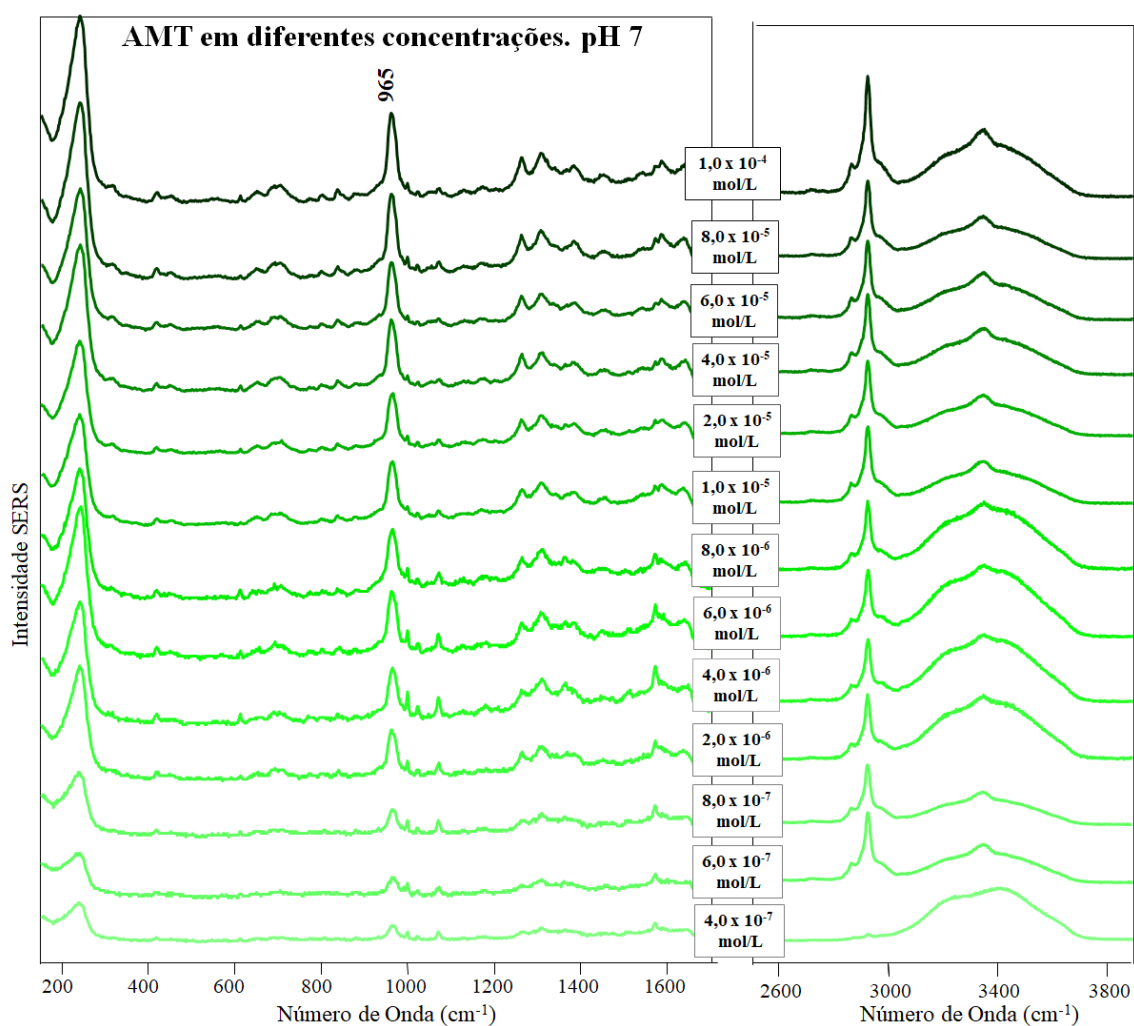


Figura 51: espectros SERS da AMT em coloide de Ag na faixa de concentrações de $1,0 \times 10^{-4}$ a $4,0 \times 10^{-7}$ mol/L em pH 7. Linha de laser: 532 nm.

A Figura 51 mostra que houve uma diminuição na intensidade das bandas dos espectros SERS à medida que diminui a concentração de AMT. Contudo, os perfis dos espectros permanecem inalterados. Com base nos espectros SERS, a curva analítica da AMT foi construída, permitindo estabelecer o LOD e a sensibilidade para o AMT. A curva

de adsorção da AMT nas nanopartículas metálicas segue o modelo do tipo sigmoidal (Figura 52 - lado esquerdo). Contudo, em baixas concentrações a relação entre a intensidade SERS e a concentração da AMT segue um regime linear como mostra a Figura 52 - lado direito.

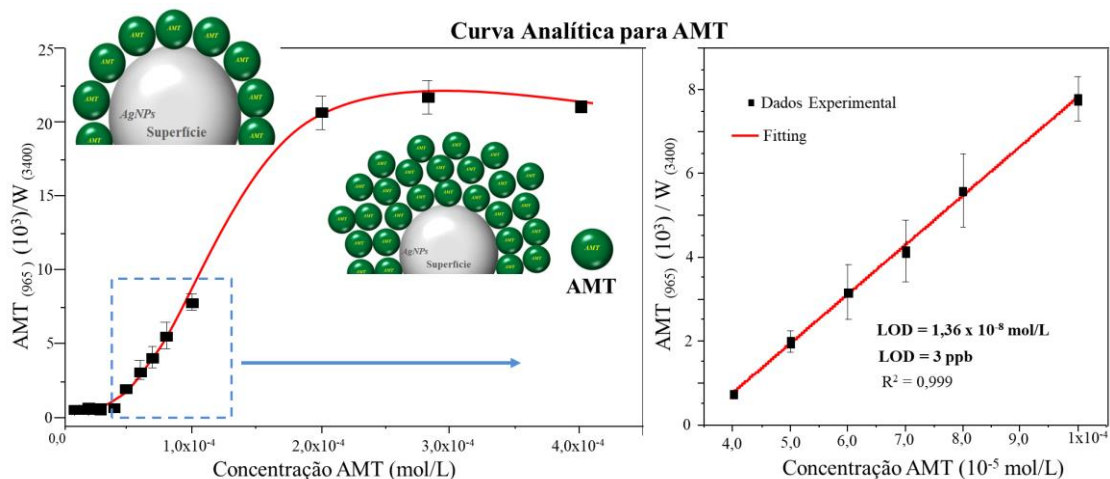


Figure 52: isoterma de adsorção com regime linear traçado para a obtenção da curva analítica da AMT com base na intensidade SERS das bandas em 965/3400. pH 7.

A isoterma de adsorção da Figura 52 para a intensidade SERS (área integrada) vs concentração de AMT, correspondendo ao modelo de adsorção “tipo 5” da classificação “B.D.D.T”⁶. A classificação é chamada de B.D.D.T. em virtude dos autores do artigo citado: Brunauer, Deming, Deming e Teller. Neste modelo, além da interação entre moléculas e superfície, dada pela constante de adsorção K_{ad} , existem interações intermoleculares dadas pela constante K_2 . Dependendo da relação entre K_{ad} e K_2 , diferentes tipos de isoterma de adsorção são encontradas. No trabalho de Brunauer *et al.*⁶ cinco tipos de isotermas de adsorção podem ser encontrados, conforme mostra a Figura 53.

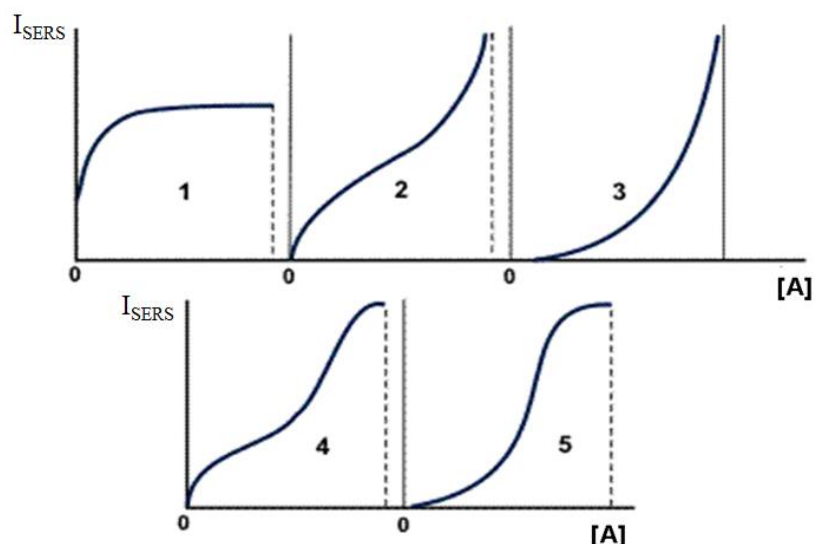


Figura 53: “modelo B.D.D.T”: classificação das isothermas de adsorção considerando a interação adsorbato/superfície (K_{ad}), além das interações intermoleculares adsorbato/adsorbato (K_2). Imagem adaptada de Brunauer *et al.*⁶.

Abaixo estão presentes as possibilidades das isothermas segundo a classificação B.D.D.T, com as respectivas relações de K_{ad} e K_2 .

Tipo 1: apenas K_{ad} : isoterma de Langmuir

Tipo 2: $K_{ad} \gg K_2$: B.E.T. saturação de monocamada e subsequente formação de multicamadas.

Tipo 3: $K_{ad} \ll K_2$: as camadas posteriores começam a se formar antes da formação de uma monocamada.

Tipo 4: tipo 2 com saturação (multicamadas infinitas não são geradas).

Tipo 5: $K_{ad} \cong K_2$

Em nosso caso o “tipo 5” indica que a adsorção da AMT na superfície de Ag apresenta duas constantes de interação com saturação, envolvendo dois processos distintos: o primeiro K_{ad} , corresponde à formação da primeira camada (K_{ad}), que depende da interação da molécula (AMT) com a superfície (Ag); o segundo K_2 depende da interação das moléculas da AMT (adsorbato) entre si, responsável pela formação das camadas subsequentes.

Portanto, a curva de adsorção da AMT em Ag apresentou um perfil sigmoidal tipo 5, e formação de multicamadas de AMT adsorvidas na superfície das AgNP. É interessante notar que esse efeito pode ser associados à existência de dois sítios reativos separados espacialmente na estrutura da AMT. Neste caso, além da interação analito/AgNP, é necessário levar em consideração as interações intermoleculares analito/analito. Neste último caso, em baixas concentrações de AMT ($< 2,0 \times 10^{-4}$ mol/L), uma monocamada do herbicida é adsorvida ao redor das AgNP, enquanto que em concentrações mais altas os agregados moleculares de AMT são adsorvidos, como ilustrado na Figura 36.

O relatório anual da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) mostra a avaliação de toxicidade de diversos poluentes emergentes. O limite máximo de resíduo (LMR) de AMT permitido na água para consumo humano é de aproximadamente 63 ppb¹⁴⁰. No caso da PRM, o cálculo do LOD foi realizado de duas formas: uma normalizando a banda de interesse em relação à banda da água (padrão interno) por meio da maior intensidade da banda da água (área integrada) em relação à área da banda do anel triazínico (965 cm^{-1}). A outra através da intensidade absoluta da banda de interesse. Não houve diferença de ordem de grandeza entre esses dois métodos no LOD. No caso da AMT o LOD foi calculado considerando banda de interesse (965 cm^{-1}) em relação à banda da água (padrão interno). O LOD obtido para a AMT é de 3 ppb, abaixo do limite máximo permitido pela agência reguladora. O LOD da AMT em pH 7 é obtido de acordo com o cálculo:

$$LOD = \frac{3\sigma}{b} = \frac{3(3,19569 \times 10^{-6})}{740} \approx 1,3 \times 10^{-8} \text{ mol/L}, \text{ ou } LOD \approx 3 \text{ ppb}.$$

Na literatura foram encontrados dois trabalhos relacionando estudos de AMT por meio de SERS. O trabalho de Chen *et al.*¹⁴¹ mostra a detecção da AMT por meio de nanopartículas de ouro (AuNPs) e funcionalizadas com grupos tióis, obtendo LOD de

20 ppb. Já Costa *et al.*¹²⁵ mostram estudos da AMT adsorvendo em nanobastões de Au e nanocubos de Ag, porém não apresentam a detecção do herbicida por meio de curvas analíticas. Além do mais, o perfil do espectro SERS destes autores é semelhante ao produto de degradação dos herbicidas triazínicos relatado por Rubira *et al.*⁴.

Capítulo 5

5. Conclusões

5.1. Vertente biológica

De modo geral, os herbicidas AMT, ATZ e PRM em concentrações 10^{-5} e 10^{-6} mol/L na subfase aquosa mostraram deslocamento das isotermas π -A de DPPC para maiores valores de áreas. Por outro lado, as isotermas π -A de DPPC na presença dos herbicidas na subfase em concentração de 10^{-7} mol/L não apresentaram deslocamento significativo. Entretanto, apesar da sobreposição das isotermas π -A em 10^{-7} mol/L, a projeção multidimensional diferenciou os *clusters* do DPPC na presença da AMT, ATZ e PRM (10^{-7} mol/L) do *cluster* de DPPC na ausência dos herbicidas. Isto mostra que mesmo os herbicidas em 10^{-7} mol/L na subfase interferem na monocamada do DPPC. Além disso, os herbicidas AMT, ATZ e PRM, mesmo em elevadas pressões de superfície (30 - 40 mN/m), permanecem embebidos entre as moléculas de DPPC.

A AMT em relação aos outros herbicidas (ATZ e PRM) foi o que causou o maior deslocamento das isotermas π -A para maiores valores de áreas, bem como foi o único herbicida a causar ruptura nas monocamadas de DPPC em 13 mN/m (BAM). Além do mais, as imagens de BAM também mostraram que a AMT gerou a desestruturação dos domínios do fosfolipídio, apresentando pontos brancos/agregados em 30 mN/m. A ATZ e a PRM também causaram a desestruturação dos domínios do DPPC, porém sem rompimento da monocamada ou surgimento dos pontos brancos/agregados na superfície.

Os espectros de PM-IRRAS mostraram que a AMT em subfase aquosa interage com o DPPC por meio do anel triazínico e pelo substituinte R1 (SCH₃), estando estes

grupos químicos da AMT próximos dos grupos fosfato e colina do DPPC. A AMT não induz desorientação das cadeias apolares do DPPC (Δ_{IR} de 0,54 p/ 0,58) e permanecendo embebida entre as cabeças polares do DPPC com as cadeias alifáticas do herbicida buscando a interface ar/água.

Os espectros de PM-IRRAS da ATZ com DPPC revelaram a interação com o grupo fosfato (hidrofílico) do fosfolípido. O herbicida na subfase possuiu as aminas desprotonadas, o que dificulta a interação com o fosfolípido, pois fica susceptível às interações de hidrogênio com moléculas de água. Além do mais, as cadeias laterais alifáticas da ATZ não interagem com os grupos hidrofóbicos do DPPC. No entanto, mesmo com essa dificuldade para interagir com o DPPC, seu anel triazínico (hidrofílico) se aproxima dos grupos fosfato e colina do DPPC. Diferentemente da AMT, a ATZ possui um Cl na posição R1 e isto gera uma interação eletrostática com o grupo colina do fosfolípido, fortalecendo a interação ATZ/DPPC nesta região, o que proporciona também uma desorientação na cauda (Δ_{IR} de 0,54 p/ 0,76) do fosfolípido.

A PRM dentre os herbicidas estudados foi o que causou maior desorientação na cauda (Δ_{IR} de 0,54 p/ 0,86) do DPPC observado por meio dos espectros de PM-IRRAS. Este fato possivelmente ocorre porque a PRM possui alto caráter hidrofílico em relação aos outros herbicidas (AMT e ATZ). O anel triazínico e o substituinte R1 (SCH₃) interagem com o grupo fosfato do DPPC, resultado semelhante à AMT. A PRM busca com maior vigor a interface ar/água (em virtude dos dois grupos isopropílico) e a interação com os grupos CH₂ do início da cauda (região hidrofóbica) do DPPC. Os espectros de PM-IRRAS revelaram a interação da PRM com as cadeias alquílicas do DPPC, o que possivelmente contribuiu para a PRM estar mais próxima da interface ar/água e do grupo CH₂ do início da cauda do DPPC, ao invés de estar entre os grupos fosfato e colina do DPPC.

Em relação às conclusões das bicamadas lipídicas por meio das GUVs, a AMT afetou em maior quantidade as GUVs em relação aos herbicidas ATZ e PRM. A AMT demonstrou maior afinidade pelas bicamadas lipídicas em relação aos outros herbicidas, pois afetou as GUVs fazendo com que 85% das vesículas perdessem o contraste de fase, enquanto a ATZ afetou a perda de contraste de fase das GUVs de DPPC em 38% e a PRM em 30%. Esses resultados são consistentes com os obtidos via filmes de Langmuir, pois a AMT foi o herbicida que mais afetou as monocamadas de DPPC, seguida da ATZ e da PRM.

5.2. Vertente ambiental

A detecção dos herbicidas por meio de SERS revelou que a PRM e a AMT podem ser encontradas em duas espécies químicas diferentes, dependendo do pH: PRM e PRM hidroxilada ou AMT e AMT hidroxilada. Tanto a PRM como a AMT são submetidas a uma hidroxilação ao diminuir o pH, sendo o ponto crítico em pH 5. Além disso, a forma hidroxilada sofre uma tautomerização levando aos derivados ceto da PRM e AMT. Esta espécie ceto mostra alta afinidade com a superfície das AgNP, mas a estabilidade da suspensão de Ag a pH abaixo de 5 torna pouco viável a detecção de PRM e AMT a pH baixo. A interação da PRM e AMT com a superfície da Ag ocorre sob dois mecanismos diferentes, dependendo do pH. Enquanto em pH abaixo de 5 a interação é governada principalmente pela interação do grupo ceto com átomos de Ag, em pH acima de 5 essa interação é estabelecida através da formação de pares iônicos de grupos amino protonados com os íons Cl^- ligados à superfície. Em ambos os casos, a orientação molecular na superfície da Ag mostrou-se independente do pH, com o anel triazina preferencialmente perpendicular à superfície.

A análise quantitativa da PRM mostrou uma maior sensibilidade ao meio alcalino (pH 11) e LOD de 28 ppb, enquanto no pH 7 o LOD é de 128 ppb. Em ambos os casos,

as curvas analíticas mostraram reprodutibilidade e linearidade (o coeficiente linear da PRM em pH 7 é $R^2 = 0,999$ e em pH 11 é $R^2 = 0,994$). Usando apenas a banda da PRM integrada para realizar a análise quantitativa foi obtido um LOD de $3,8 \times 10^{-8}$ mol/L (9,2 ppb) em pH 11 e $5,5 \times 10^{-7}$ mol/L (134 ppb) para pH 7. Já no caso da AMT foi obtido um LOD de 3 ppb com coeficiente linear de $R^2 = 0,999$. Portanto, para ambos os herbicidas o LOD obtido é menor que o LMR para água potável, o que reforça a possibilidade de aplicar a técnica SERS como ferramenta analítica (neste caso, para herbicida) em baixas concentrações quando procedimentos controlados são estabelecidos. Em pH abaixo do pKa de 1,7 não há a estabilização do sistema coloidal, as AgNP se agregaram, precipitando e impossibilitando qualquer experimento analítico. Vale ressaltar que ocorre a agregação do coloide de Ag tanto na ausência como na presença da ATZ em pH 1,7.

Capítulo 6

Considerações finais

Esta tese mostra resultados a partir das atividades realizadas no período de setembro/2016 a outubro/2020 referente ao projeto de doutorado financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo nº 2016/09634-0. Este projeto foi desenvolvido em 49 meses para a defesa e aborda tanto os efeitos dos herbicidas em modelos de biomembrana como a detecção dos mesmos em nanopartículas de Ag via SERS. Porém, vale ressaltar que desde março de 2020 o candidato não frequenta periodicamente o laboratório da UNESP, pois a mesma apresenta um plano de contingência que limita as atividades no campus, em virtude da pandemia (Covid-19). Os resultados deste trabalho proporcionaram submeter um artigo, o qual está em análise para publicação na revista “*Applied Surface Science*” e intitulado “*Sensitive detection of prometryn herbicide based on its optimized adsorption on Ag plasmonic nanoparticles*”. Foi realizado um estágio de doutorado sanduíche na Espanha com o pesquisador Dr. Santiago Sanchez-Cortez (carta em anexo) que proporcionou a publicação do trabalho intitulado “*Abiotic degradation of s-triazine pesticides analyzed by surface-enhanced Raman scattering*” na revista “*Journal Raman Spectroscopy*” que proporcionou ao melhor entendimento dos herbicidas da família s-triazínicos em condições adversas, tais como: água, temperatura, pH e microrganismos presentes no solo. Durante a realização desta tese foi possível estabelecer parcerias com outros pesquisadores que colaboraram de forma com que os objetivos deste trabalho fossem alcançados. Os pesquisadores são o *Prof. Dr. Leonardo Negri Furini* da Universidade Federal do Ceará (UFC) do departamento de Física, o *Dr. Osvaldo N. Oliveira Jr* do

Instituto de Física de São Carlos (IFS) da USP/São Carlos e o *Dr. Santiago Sanchez-Cortez* do Instituto de Estrutura da Matéria (IEM) de Madri/Espanha. Abaixo é apresentada a produção científica durante o período da tese.

Como perspectivas futuras para aprofundar (complementar) esta tese, como o DPPC mimetiza aspectos da composição química da membrana celular, mas não seu estado fluido, interessante será aplicar fosfolipídios insaturados, como POPC ou DOPC, para agregar essa característica ao sistema mimético. Já em relação a detecção via SERS dos herbicidas, o próximo passo será conseguir detectá-los em amostras reais, como água de torneira e água de rio. Lembrando que nestes casos será preciso antes caracterizar a água em si (torneira ou rio), e não apenas utilizá-las como solventes, igual ao realizado pela água ultrapura nesta tese. Além do mais, pretende-se publicar em revistas internacionais o restante dos resultados obtidos nesta tese. Um será referente aos efeitos causados pelos herbicidas nas mono e bicamadas do fosfolipídio DPPC. O outro será referente à detecção da AMT em AgNP.

Artigos:

1) **R. J. G. Rubira**; C. J. L. Constantino; J. C. Otero; S. Sanchez-Cortes. *Abiotic degradation of s-triazine pesticides analyzed by surface-enhanced Raman scattering*. Journal of Raman Spectroscopy. (Fator de impacto: 2.809). **2020. DOI: 10.1002/jrs.5776.**

Contribuições no trabalho: Este trabalho foi realizado no período do BEPE (Madri-Espanha) do mestrado, onde realizei toda a parte experimental. A discussão foi realizada em colaboração com o pesquisador Dr. Santiago Sanchez Cortes da Espanha.

2) **R. J. G. Rubira**; L. N. Furini; C. J. L. Constantino; S. Sanchez-Cortes. *Sensitive detection of prometryn herbicide based on its optimized adsorption on Ag plasmonic nanoparticles*. Applied Surface Science. (Fator de impacto: 6.182). **2020. (Submetido).**

Contribuições no trabalho: Este trabalho foi realizado no período desta tese, referente ao quarto relatório FAPESP (setembro/2019 à setembro/2020) e em virtude do estágio no exterior no período do doutorado (BEPE-Fapesp). Toda a parte experimental e a análise foi desenvolvido com auxílio de parcerias.

3) **R. J. G. Rubira**; S. A. Camacho; C. J. L. Constantino; S. Sanchez-Cortes. *Increasing the sensitivity of SERS detection for s-triazine pesticides by taking advantage of*

interactions with soil humic substances. Applied Spectroscopy. (Fator de impacto: 2.014). **2020. (Submetido)**.

Contribuições no trabalho: Este trabalho é fruto dos resultados obtidos durante o período do BEPE (Madri-Espanha) do doutorado. Neste trabalho foi aplicado o conhecimento adquirido em funcionalizar nanopartículas metálicas. O trabalho trata-se da detecção dos herbicidas estudados no doutorado por meio de nanopartícula de Ag funcionalizada com substância húmica. O bolsista realizou toda a parte experimental e da discussão.

4) R. J. G. Rubira; S. A. Camacho; C. S. Martin; J.R. Mejía-Salazar; F. R. Gómez; R. R. da Silva; O. N. Oliveira Jr; P. Alessio; C. J. L. Constantino. *Designing Silver Nanoparticles for Detecting Levodopa (3,4-Dihydroxyphenylalanine, L-Dopa) using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)*. Sensors. (Fator de impacto: 3.031). **2019. DOI:** 10.3390/s20010015.

Contribuições no trabalho: Este trabalho foi fruto do aprendizado realizado durante o BEPE-FAPESP no período do mestrado, onde foi possível sintetizar nanopartículas de distintas morfologias. A contribuição foi sintetizar todas as nanopartículas, realizar a aplicação das mesmas no analito L-Dopa, e posterior a isso analisar por meio dos espectros Raman e SERS.

5) R. J. G. Rubira; Aoki, P.H.B.; Constantino, C. J. L.; Aléssio, P. *Supramolecular architectures of iron phthalocyanine Langmuir-Blodgett films: The role played by the solution solvents*. Applied Surface Science. **2017. DOI:**10.1016/j.apsusc.2017.04.155.

Contribuições no trabalho: Este trabalho foi desenvolvido com resultados obtidos do período da Iniciação científica. A contribuição foi na realização de toda a parte experimental e elaborações das figuras, além de auxiliar nas discussões referentes os filmes de Langmuir, Langmuir-Blodgett (LB) e na caracterização através dos espectros de UV-Vis, Raman e FTIR.

6) M. J. S. Oliveira; R. J. G. Rubira; L. N. Furini; A. B. Neto; C. J. L. Constantino. *Detection of thiabendazole fungicide/parasiticide by SERS: quantitative analysis and adsorption mechanism*. Applied Surface Science. (Fator de impacto: 6.182). **2020. DOI:** <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2020.145786>.

Contribuições no trabalho: Este trabalho foi desenvolvido auxiliando o aluno de iniciação científica Marcelo J. S. Oliveira. Foi possível colaborar com toda a parte experimental, e em partes na discussão.

7) L. N. Furini; C. M.; S. Camacho; R. J. G. Rubira; J. D. Fernandes; E. Silva; T. Gomes; G. Stunges; C. J. L. Constantino; P. Alessio. *Electrochemical properties of nickel phthalocyanine: the effect of thin film morphology tuned by deposition techniques*. Thin Solid Films. (Fator de impacto: 1.939). **2020. DOI:** 10.1016/j.tsf.2020.137897.

Contribuições no trabalho: Este trabalho foi desenvolvido com resultados obtidos de uma disciplina da Pós-Graduação. A colaboração foi referente a parte experimental e nas discussões dos filmes de Langmuir-Blodgett (LB) e na caracterização através dos espectros de UV-Vis e FTIR.

8) M. L. B. Figueiredo; C. S. Martin; L. N. Furini; R. J. G. Rubira; A. B. Neto; P. Alessio; C. J. L. Constantino. *Surface-enhanced Raman scattering for dopamine in Ag colloid: adsorption mechanism and detection in the presence of interfering species*.

Applied Surface Science. (Fator de impacto: 6.182). 2020. DOI: 10.1016/j.apsusc.2020.146466.

Contribuições no trabalho: Este trabalho foi desenvolvido auxiliando a aluna da iniciação científica Maria L. B. Figueiredo. Auxiliando em toda a parte experimental, e em partes na discussão.

9) W. M. Pazin; L. N. Furini; V. Solovyeva; T. Lemma; **R. J. G. Rubira**; B. Jørgensen; C. J. L. Constantino; J. R. Brewer. *Vibrational Spectroscopic Characterization and CARS Imaging of Artepillin C*. Applied Spectroscopy. (Fator de impacto: 2.064). 2020. DOI: <https://doi.org/10.1177/0003702820904456>.

Contribuições no Trabalho: Neste trabalho foi possível realizar as medidas de Raman e FTIR dos materiais utilizados. Este trabalho é fruto da colaboração com o Pós-Doutorando Wallance M. Pazin do mesmo grupo de pesquisa do bolsista.

10) L. F. de Lima; C. C. Maciel; A. L. Ferreira; J. C. de Almeida; **R. J. G. Rubira**; C. J. L. Constantino; M. Ferreira. *An investigation of the synergistic effect between magnetite nanoparticles and polypyrrole in nanostructured layer-by-layer films*. Journal of Applied Polymer Science. (Fator de impacto: 2.18) 2020. DOI: 10.1002/app.49750S.

Contribuições no Trabalho: Neste trabalho foi possível colaborar com a Profa. Dra. Marystela Ferreira da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de Sorocaba-SP. No trabalho pude colaborar nas análises Raman, por meio da técnica SERS.

11) C. M. Miyazakia; A. M. Adriano; **R. J. G. Rubira**; C. J. L. Constantino; M. Ferreira. *Combining electrochemically reduced graphene oxide and Layer-by-Layer films of magnetite nanoparticles for carbofuran detection*. Journal of Environmental Chemical Engineering. (Fator de impacto: 4.3). 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.104294>.

Contribuições no Trabalho: Este trabalho é em colaboração com a Profa. Dra. Marystela Ferreira da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de Sorocaba-SP. No trabalho foi realizado toda a parte experimental e análise dos dados obtidos por meio da técnica SERS. Além do mais, conseguimos realizar o mapeamento de área de filmes LbL utilizando o acessório *streamline* do espectrômetro Raman para a detecção do pesticida Carbofurano.

12) A. Hassan; L. Macedo; I. A. Mattioli; **R. J. G. Rubira**; C. J. L. Constantino; R. G. Amorim; F. Lima; F. Crespilho. *A Three Component-Based Van Der Waals Surface Vertically Designed for Biomolecular Recognition Enhancement*. Nature Nanotechnology. (Fator de impacto: 31.538). 2020. (Submetido).

Contribuições no Trabalho: Neste trabalho foi possível colaborar com o Prof. Dr. Frank Crespilho da Universidade de São Paulo (USP), campus de São Carlos-SP. No trabalho o bolsista realizou a parte experimental e a análise referente a caracterização Raman.

13) I. Giometti; G. Ozaki; T. Garcia; J. Pereira; **R. J. G. Rubira**; C.J.L. Constantino; M. J. Q. Louzada; W. Belangero; J. C. C. Filho. *Analysis of Mineralization, rigidity, and crystallinity of the bone of rats submitted to resistance training and application of growth hormone*. Brazilian Journal of Physical Therapy. (Fator de impacto: 2.1). 2020. (Submetido).

Contribuições no Trabalho: Neste trabalho foi possível colaborar com o grupo de Fisioterapia da Unesp de Pres. Prudente. No presente trabalho conseguimos realizar toda a parte experimental e análise referente ao estudo Raman de ossos de ratos submetidos a aplicação de hormônio de crescimento.

14) A. C. Picot; M. Puiatti; S. B. Diaz; **R. J. G. Rubira**; S. Sanchez-Cortes; A. B. Altabef; M. E. Tuttolomondo. *Raman, SERS and UV - circular dichroism of n-acetyl-lcysteine in aqueous solutions*. New Journal of Chemistry. (Fator de impacto: 3.069). **2019. DOI:** 10.1039/C9NJ02427A.

Contribuições no trabalho: Neste trabalho foi possível contribuir com toda a parte experimental referente a síntese do coloide de Ag e às medidas de Raman/SERS. O trabalho foi realizado em colaboração com a Prof. Dra. Maria E. Tuttolomondo da Universidade Nacional de Tucuman, Argentina. Tive a oportunidade de conhecê-la no estágio no exterior da BEPE-Fapesp no período do mestrado.

15) G. Rodrigues; C. M. Miyazaki; **R. J. G. Rubira**; C. J. L. Constantino; M. Ferreira. *Layer-By-Layer Films of Graphene Nanoplatelets and Gold Nanoparticles for Methyl Parathion Sensing*. ACS Appl. Nano Mater. (Fator de impacto: 2.596). **2019. DOI:** 10.1021/acsanm.9b00007.

Contribuições no Trabalho: Neste trabalho a colaboração se deu com a Profa. Dra. Marystela Ferreira da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de Sorocaba-SP. No trabalho contribuimos com a análise Raman, por meio da técnica SERS. Foi realizado o mapeamento de área de filmes LbL utilizando o acessório *streamline* do espectrômetro Raman para a detecção do pesticida Paration.

16) M. S. Klem; R. M. Morais; **R. J. G. Rubira**; N. Alves. *Paper-based super capacitor with screen-printed poly (3, 4-ethylene dioxythiophene)-poly (styrene sulfonate)/multiwall carbon nanotube films actuating both as electrodes and current collectors*. Thin Solid Films. (Fator de impacto: 1.939). **2019. DOI:** 10.1016/j.tsf.2018.10.029.

Contribuições no Trabalho: Este trabalho foi em parceria com o Prof. Dr. Neri Alves do mesmo departamento em que realizo o doutorado (UNESP, campus de Pres. Prudente - SP). Foi realizada toda a parte experimental e análise Raman. Neste trabalho foi utilizado o acessório *streamline* do espectrômetro Raman.

17) Faustino R. Gomez; **R. J. G. Rubira**; Sabrina A. Camacho.; Cibely S. Martin.; Robson R. da Silva.; Carlos J. L. Constantino.; Priscila Alessio.; Osvaldo N. Oliveira, Jr.; Ricardo Mejía-Salazar. *Surface Plasmon Resonances in Silver Nanostars*. Sensors. **2018. DOI:** 0.3390/s18113821.

Contribuições no Trabalho: Neste trabalho a contribuição foi nas sínteses das nanopartículas para diferentes morfologias (nanoestrelas, nanoesferas e nanoprismas). O trabalho é referente à uma colaboração com o Professor Osvaldo Novais de Oliveira Jr da USP de São Carlos (IFSC).

18) Rajesh Kumar, **R. J. G. Rubira**, Wagner D.M. Junior, Andrei V. Alaferdov, Alfredo R. Vaz, Rajesh K. Singh, Silvio R. Teixeira, Carlos J.L. Constantino, and Stanislav A. Moshkalev. *Simple and Fast Approach for Synthesis of Reduced Graphene Oxide-MoS₂ Hybrids for Room Temperature Gas Detection*. IEEE Transactions on electron devices. **2018. DOI:** 10.1109/TED.2018.2851955.

Contribuições no Trabalho: Neste trabalho a colaboração foi nas medidas de Raman dos materiais utilizados. Este trabalho é fruto dos resultados obtidos em colaboração com o Pós Doutorando Rajesh Kumar, que na época era do mesmo grupo de pesquisa do doutorando.

Durante a colaboração com o pesquisador Santiago Sanchez-Cortez que se deu a partir de um convite para dar continuidade no trabalho desenvolvido durante o mestrado sanduiche realizado em seu grupo de pesquisa, no período de 11 de Março a 10 de Setembro de 2015. O estágio no exterior no período do doutorado proporcionou o aperfeiçoamento no estudo de detecção dos pesticidas através da técnica SERS. Além de melhorar o entendimento da parte analítica das moléculas em coloide de Ag, foi neste período que compreendemos o funcionamento desta classe de herbicida (s-triazínicos) em distintas ocasiões que o degradam. Além do mais, neste período foi realizada uma coorientação de mestrado da aluna Giulia Zanasi, cujo trabalho era intitulado como *“Detection of deethylhydroxytriazine (DEHA) by Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and its interactions with humic acids (Has)”* pelo Programa de Pós-Graduação *“International horticultural Science”* da Universidade de Bologna Itália. Orientada pela Profa. Dra. Ornella Francioso.



MINISTERIO
DE ECONOMÍA, INDUSTRIA
Y COMPETITIVIDAD



Sr Rafael Jesus Gonçalves Rubira
UNESP
Presidente Prudente
Brazil

Madrid, February 12th 2018

Dear Rafael Jesus Gonçalves Rubira

It is a pleasure for me to invite you to stay in the Instituto de Estructura de la Materia of CSIC in Madrid from September 12th of 2018 to September 12th of 2019. During your stay at our institute you will carry out a working project dealing with the development of sensors based on Surface-enhanced Raman Spectroscopy (SERS) of Pollutants with high interest in the Environment.

I also declare that I can evaluate as ad-hoc assessor any propose submitted to FAPESP within my expertise.

I look forwards to seeing you very soon.

Sincerely yours,

Dr. Santiago Sanchez-Cortes
Scientific Research
Instituto de Estructura de la Materia
Consejo Superior de Investigaciones Cientificas

SERRANO 113b, 121 y 123
28006 MADRID, ESPAÑA
TEL: (34) 91 561 68 00
FAX: (34) 91 564 55 57

Referências

1. IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. (2020). Available at: <https://www.mma.gov.br/>. (Accessed: 13th February 2020)
2. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2019). Available at: <http://www.agricultura.gov.br/>. (Accessed: 27th February 2020)
3. <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAfqO8AI/membrana-plasmatica#>.
4. Rubira, R.J.G; Constantino, C.J.L; Otero, J.C; Sanchez-Cortes, S. Abiotic degradation of s-triazine pesticides analyzed by surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.* (2019). doi:10.1002/jrs.5776
5. Aroca, R. *Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2006). doi:10.1002/9780470035641
6. Brunauer, S., Deming, L. S., Deming, W. E. & Teller, E. On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases. *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 1723–1732 (1940).
7. IBGE. <http://www.brasildefato.com.br/node/27795>. (2015).
8. Larissa Mies Bombardi. Brasil e União Europeia – a agricultura mundializada e a dialética do uso de agrotóxicos: Diferenças, restrições e impactos das commodities brasileiras no mercado

- européu -Agrotóxico na Berlinda. *Revista Fapesp* (2018).
9. Saath, K. C. de O. & Fachinello, A. L. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. *Rev. Econ. e Sociol. Rural* **56**, 195–212 (2018).
 10. Lisandra Paraguassu. Ministério da Agricultura dá licença a agrotóxicos não analisados em 60 dias. (2020). Available at: <https://economia.uol.com.br/noticias/>. (Accessed: 3rd March 2020)
 11. Gilbert, N. Case studies: A hard look at GM crops. *Nature* **497**, 24–26 (2013).
 12. Viero, C. M., Camponogara, S., Cezar-Vaz, M. R., Costa, V. Z. da & Beck, C. L. C. Risk society: the use of pesticides and implications for the health of rural workers. *Esc. Anna Nery - Rev. Enferm.* **20**, 99–105 (2016).
 13. 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).
 14. SINITOX. Óbitos de Intoxicação por Agrotóxico de uso Agrícola por Unidade Federada, Segundo Circunstância. (2008). Available at: http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media%3E,.
 15. Instituto Nacional de Câncer - INCA- <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/comunicacaoinformacao>

- /site/home/namidia/brasile-_O pais que mais consome agrotóxicos no mundo. (2016).
16. Alloway, B. J. & Ayres, D. C. *Chemical Principles of Environmental Pollution*. (Blackie Academic Professional, 1997).
 17. Farland, M. & Burnside, O. *The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture*. (Elsevier, San Diego, USA, 2007).
 18. Compre Rural. Brasil, maior produtor de cana de açúcar do mundo seguido pela Índia. (2018). Available at: <https://www.comprerural.com>. (Accessed: 27th February 2020)
 19. Paulo, E. de S. cidades paulistas. *Cidadespaulista.com.br* (2020).
 20. Jamet, S. *et al.* In Vitro Mutational Analysis of the β 2 Adrenergic Receptor, an In Vivo Surrogate Odorant Receptor. *PLoS One* **10**, e0141696 (2015).
 21. Garbetta, A. *et al.* Dose-dependent lipid peroxidation induction on ex vivo intestine tracts exposed to chyme samples from fumonisins contaminated corn samples. *Toxicol. Vitro*. **29**, 1140–1145 (2015).
 22. Ayee, M. A. A., Roth, C. W. & Akpa, B. S. Structural perturbation of a dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayer by warfarin and its bolaamphiphilic analogue: A molecular dynamics study. *J. Colloid Interface Sci.* **468**, 227–237 (2016).
 23. Jing, B., Lan, N., Qiu, J. & Zhu, Y. Interaction of Ionic Liquids with a Lipid Bilayer: A Biophysical Study of Ionic Liquid Cytotoxicity. *J.*

- Phys. Chem. B* **120**, 2781–2789 (2016).
24. Hassan, S., Yasin, T., Imran, Z. & Batool, S. S. Silane Based Novel Crosslinked Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Membrane: Structure, Characteristic and Adsorption Behaviour. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **26**, 208–218 (2016).
 25. Collier, C. P. Bilayer membrane interactions with nanofabricated scaffolds. *Chem. Phys. Lipids* **192**, 75–86 (2015).
 26. Zhu, C. *et al.* Point-to-Plane Nonhomogeneous Electric-Field-Induced Simultaneous Formation of Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) and Lipid Tubes. *Chem. - A Eur. J.* **22**, 2906–2909 (2016).
 27. He, X., Lin, M., Guo, J., Qu, Z. & Xu, F. Experimental and simulation studies of polyarginines across the membrane of giant unilamellar vesicles. *RSC Adv.* **6**, 30454–30459 (2016).
 28. Drucker, P., Pejic, M., Galla, H.-J. & Gerke, V. Lipid Segregation and Membrane Budding Induced by the Peripheral Membrane Binding Protein Annexin A2. *J. Biol. Chem.* **288**, 24764–24776 (2013).
 29. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-.).* **175**, 720–731 (1972).
 30. Simons, K. & Van Meer, G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197–6202 (1988).
 31. CellandMolecular. Lipid Rafts For Sale- Keep Your Brain Afloat! by Kelsey Theriot. *Biol. 441 J. Club* **441**, (2016).

32. Vance, J. E. Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells. *Traffic* **16**, 1–18 (2015).
33. Lingwood, D., Ries, J., Schwille, P. & Simons, K. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 10005–10010 (2008).
34. Harayama, T. & Riezman, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 281–296 (2018).
35. 2014 ASCB/IFCB Meeting abstracts. *Mol. Biol. Cell* **25**, 3987–3987 (2014).
36. Miñones, J., Pais, S., Miñones, J., Conde, O. & Dynarowicz-Łątka, P. Interactions between membrane sterols and phospholipids in model mammalian and fungi cellular membranes — A Langmuir monolayer study. *Biophys. Chem.* **140**, 69–77 (2009).
37. McConlogue, C. W. & Vanderlick, T. K. A Close Look at Domain Formation in DPPC Monolayers. *Langmuir* **13**, 7158–7164 (1997).
38. Matyszevska, D. & Bilewicz, R. DPPC monolayers as simple models of biological membranes for studies of interactions with perfluorinated compounds. *Ann. UMCS, Chem.* **63**, (2008).
39. Lage, E. V., Magalhães, J., Pinheiro, M. & Reis, S. Effect of the alkyl group in the piperazine N -substitution on the therapeutic action of rifamycins: A drug-membrane interaction study. *Chem. Biol. Interact.*

- 289**, 75–80 (2018).
40. Bertoluzza, A., Bonora, S., Fini, G., Francioso, O. & Morelli, M. A. Interaction of bipyridilium herbicides with model membranes. *Chem. Phys. Lipids* **75**, 137–143 (1995).
 41. Bertoluzza, A., Bonora, S., Fini, G. & Morelli, M. A. Effects of the herbicide prometryn on the physicochemical properties of artificial model membranes. **153**, 147–153 (1999).
 42. Bäumner, A. J., Kummer, T. & Schmid, R. D. Liposome-Based Immunosensors. 1. Influence of Hapten Spacer Length on Liposome Binding Efficiency. *Anal. Lett.* **29**, 2601–2613 (1996).
 43. Batista, G. T. Editorial of the twenty second edition of Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science. *Ambient. e Agua - An Interdiscip. J. Appl. Sci.* **8**, (2013).
 44. 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).
 45. Coutinho, C., Tanimoto, S. & Galli, a. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas* 65–72 (2005).
doi:<http://dx.doi.org/10.5380/pes.v15i0.4469>
 46. Dean, J. R., Wade, G. & Barnabas, I. J. Determination of triazine herbicides in environmental samples. *J. Chromatogr. A* **733**, 295–335

- (1996).
47. 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).
 48. Preparo e caracterização de nanopartículas lipídicas sólidas como sistema carreador conjunto para os herbicidas atrazina e simazina visando futuras aplicações em agricultura. *Ciências Ambientais* (Universidade Estadual Paulista , 2015).
 49. 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. *Instituto de Química* (Universidade de São Paulo, 2003).
 50. 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).
 51. Le Ru, E. C. & Etchegoin, P. G. *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy (and related plasmonic effects)*. (Elsevier, 2009).
 52. Fleischmann, M., Hendra, P. J. & McQuillan, A. J. Raman-spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem. Phys. Lett.* **26**, 163–166 (1974).

53. Creighton, J. A., Blatchford, C. G. & Albrecht, M. G. Plasma Resonance Enhancement of Raman-Scattering by pyrideni absorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Trans. II* **75**, 790–798 (1979).
54. Van, D. R. P. Laser excitation of Raman scattering from adsorbed molecules on electrode surfaces. *Chem. Biochem. Appl. Lasers* **4**, 101–185 (1979).
55. R.F Aroca; M. Campos Vallete; J.V. Garcia Ramos; S, S. C. J. A. S. G. e P. S. *Amplificación plasmónica de espectros Raman y de Fluorescencia-SERS y SEF sobre nanoestructuras metálicas*. (2014).
56. Kneipp, K. Surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Today* **60**, 40–47 (2007).
57. Nie, S. M. & Emery, S. R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science* (80-.). **275**, 1102–1106 (1997).
58. 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).
59. Aoki, P. H. B. *et al.* SERS Mapping in Langmuir-Blodgett Films and Single-Molecule Detection. *Appl. Spectrosc.* **67**, 563–569 (2013).
60. 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).
61. Furini, L. N. *et al.* Detection and quantitative analysis of carbendazim herbicide on Ag nanoparticles via surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.* **46**, 1095–1101 (2015).
 62. Oliveira, M. J. S., Rubira, R. J. G., Furini, L. N., Batagin-Neto, A. & Constantino, C. J. L. Detection of thiabendazole fungicide/parasiticide by SERS: Quantitative analysis and adsorption mechanism. *Appl. Surf. Sci.* **517**, 145786 (2020).
 63. Zhou, Q., Xiao, J. & Ding, Y. Sensitive determination of fungicides and prometryn in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes solid-phase extraction cartridge. *Anal. Chim. Acta* **602**, 223–228 (2007).
 64. Rubira, R. J. G. *et al.* Probing trace levels of prometryn solutions: from test samples in the lab toward real samples with tap water. *J. Mater. Sci.* **51**, (2016).
 65. Izquierdo-Lorenzo, I., Alda, I., Sanchez-Cortes, S. & Garcia-Ramos, J. V. Adsorption and Detection of Sport Doping Drugs on Metallic Plasmonic Nanoparticles of Different Morphology. *Langmuir* **28**, 8891–8901 (2012).
 66. Izquierdo-Lorenzo, I., García-Ramos, J. V. & Sanchez-Cortes, S. Vibrational characterization and surface-enhanced Raman scattering

- detection of probenecid doping drug. *J. Raman Spectrosc.* **44**, 1422–1427 (2013).
67. 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).
68. Rubira, R. J. G. *et al.* Detection of trace levels of atrazine using surface-enhanced Raman scattering and information visualization. *Colloid Polym. Sci.* **292**, (2014).
69. 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).
70. Bonora, S. *et al.* Raman and SERS study on atrazine, prometryn and simetryn triazine herbicides. *J. Mol. Struct.* **1040**, 139–148 (2013).
71. 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).
72. Marcacci, S. A phytoremediation approach to remove pesticides (atrazine and lindane) from contaminated environment. *Faculté*

environment naturel, architectural et construit (2004).

73. 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
74. Minghim, R., Paulovich, F. V. & Andrade Lopes, A. de. Content-based text mapping using multi-dimensional projections for exploration of document collections. in *Visualization and Data Analysis 2006* (eds. Erbacher, R. F., Roberts, J. C., Grohn, M. T. & Borner, K.) **6060**, (2006).
75. M. AngelovaD. S. Dimitrov. A mechanism of liposome electroformation. in *Trends in Colloid and Interface Science II* 59–67 (2007).
76. 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).
77. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). 2016 (2017). Available at: <https://iupac.org/greeniupac2016/>. (Accessed: 1st December 2017)
78. Lopez-Tobar, E. *et al.* Adsorption and Detection of Amyloid Marker Thioflavin T on Ag Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman

- Scattering. *J. Phys. Chem. C* **117**, 3996–4005 (2013).
79. Aoki, P. H. B. *et al.* Molecular-Level Modifications Induced by Photo-Oxidation of Lipid Monolayers Interacting with Erythrosin. *Langmuir* **32**, 3766–3773 (2016).
 80. da Rocha Junior, C. & Caseli, L. Adsorption and enzyme activity of asparaginase at lipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films. *Mater. Sci. Eng. C* **73**, 579–584 (2017).
 81. Takeshita, N., Okuno, M. & Ishibashi, T. Molecular conformation of DPPC phospholipid Langmuir and Langmuir–Blodgett monolayers studied by heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 2060–2066 (2017).
 82. Volpati, D. *et al.* Toward the Optimization of an e-Tongue System Using Information Visualization: A Case Study with Perylene Tetracarboxylic Derivative Films in the Sensing Units. *Langmuir* **28**, 1029–1040 (2012).
 83. Fernandes, J. D. *et al.* Supramolecular Architecture and Electrical Properties of a Perylene Derivative in Physical Vapor Deposited Films. *Mater. Res.* **18**, 127–137 (2015).
 84. Rubira, R. J. G. *et al.* Probing trace levels of prometryn solutions: from test samples in the lab toward real samples with tap water. *J. Mater. Sci.* **51**, 3182–3190 (2016).
 85. 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).
86. Nakahara, H., Hirano, C., Fujita, I. & Shibata, O. Interfacial Properties in Langmuir Monolayers and LB Films of DPPC with Partially Fluorinated Alcohol (F8H7OH). *J. Oleo Sci.* **62**, 1017–1027 (2013).
 87. Patterson, M., Vogel, H. J. & Prenner, E. J. Biophysical characterization of monofilm model systems composed of selected tear film phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1858**, 403–414 (2016).
 88. Ciumac, D. *et al.* Implications of lipid monolayer charge characteristics on their selective interactions with a short antimicrobial peptide. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **150**, 308–316 (2017).
 89. Mariani, M. E., Sánchez-Borzone, M. E. & García, D. A. Effects of bioactive monoterpenic ketones on membrane organization. A langmuir film study. *Chem. Phys. Lipids* **198**, 39–45 (2016).
 90. Chachaj-Brekiesz, A., Wnętrzak, A., Lipiec, E. & Dynarowicz-Latka, P. Surface interactions determined by stereostructure on the example of 7-hydroxycholesterol epimers – The Langmuir monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1861**, 1275–1283 (2019).
 91. Xu, L. & Zuo, Y. Y. Reversible Phase Transitions in the Phospholipid

- Monolayer. *Langmuir* **34**, 8694–8700 (2018).
92. Pavinatto, F. J. Interação entre quitosana e modelos de membrana celular: filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB). (Universidade de São Paulo, 2010).
 93. Qiao, L., Ge, A., Osawa, M. & Ye, S. Structure and stability studies of mixed monolayers of saturated and unsaturated phospholipids under low-level ozone. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 17775 (2013).
 94. Zhao, L. & Feng, S.-S. Effects of lipid chain length on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within model biomembranes. *J. Colloid Interface Sci.* **274**, 55–68 (2004).
 95. Hąc-Wydro, K., Dynarowicz-Łątka, P., Grzybowska, J. & Borowski, E. How does the N-acylation and esterification of amphotericin B molecule affect its interactions with cellular membrane components—the Langmuir monolayer study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **46**, 7–19 (2005).
 96. Wang, Z. & Yang, S. Effects of Fullerenes on Phospholipid Membranes: A Langmuir Monolayer Study. *ChemPhysChem* **10**, 2284–2289 (2009).
 97. Jurak, M. & Miñones Conde, J. Characterization of the binary mixed monolayers of α -tocopherol with phospholipids at the air-water interface. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 2410–2418 (2013).

98. Caseli, L. *et al.* An intraocular dye solution based on lutein and zeaxanthin in a surrogate internal limiting membrane model: A Langmuir monolayer study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **107**, 124–129 (2013).
99. Pavinatto, A. *et al.* Experimental evidence for the mode of action based on electrostatic and hydrophobic forces to explain interaction between chitosans and phospholipid Langmuir monolayers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **145**, 201–207 (2016).
100. Levin, I. W., Thompson, T. E., Barenholz, Y. & Huang, C. Two types of hydrocarbon chain interdigitation in sphingomyelin bilayers. *Biochemistry* **24**, 6282–6286 (1985).
101. Goto, T. E. & Caseli, L. The interaction of mefloquine hydrochloride with cell membrane models at the air–water interface is modulated by the monolayer lipid composition. *J. Colloid Interface Sci.* **431**, 24–30 (2014).
102. Stunges, G. M. *et al.* Interaction between 17 α -ethynylestradiol hormone with Langmuir monolayers: The role of charged headgroups. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **158**, 627–633 (2017).
103. Batistela, V. R. *et al.* pKa determinations of xanthene derivatives in aqueous solutions by multivariate analysis applied to UV–Vis spectrophotometric data. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **79**, 889–897 (2011).

104. Matar, G. & Besson, F. Influence of the lipid composition of biomimetic monolayers on the structure and orientation of the gp41 tryptophan-rich peptide from HIV-1. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 2534–2543 (2011).
105. Arrondo, J. L. R., Goñi, F. M. & Macarulla, J. . Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension a study of the phosphate group vibrations. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **794**, 165–168 (1984).
106. Geraldo, V. P. N., Pavinatto, F. J., Nobre, T. M., Caseli, L. & Oliveira, O. N. Langmuir films containing ibuprofen and phospholipids. *Chem. Phys. Lett.* **559**, 99–106 (2013).
107. Blaudez, D. *et al.* Polarization-Modulated FT-IR Spectroscopy of a Spread Monolayer at the Air/Water Interface. *Appl. Spectrosc.* **47**, 869–874 (1993).
108. Nakahara, H., Lee, S. & Shibata, O. Surface pressure induced structural transitions of an amphiphilic peptide in pulmonary surfactant systems by an in situ PM-IRRAS study. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 1205–1213 (2013).
109. Pavinatto, A. *et al.* Interaction of O-acylated chitosans with biomembrane models: Probing the effects from hydrophobic interactions and hydrogen bonding. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **114**, 53–59 (2014).

110. Lopez, R. F. *et al.* Effect of carrageenans of different chemical structures in biointerfaces: A Langmuir film study. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **111**, 530–535 (2013).
111. Vieira, E. F. S., Cestari, A. R., Chagas, R. A. & Cortes, G. K. da R. Development and characterization of a matrix suitable for extended release systems - release studies with the herbicides atrazine and diuron. *Quim. Nova* **37**, (2014).
112. Grillo, R. *et al.* Poly(ϵ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *J. Hazard. Mater.* **231–232**, 1–9 (2012).
113. Franke, T., Leirer, C., Wixforth, A. & Schneider, M. F. Phase Transition Induced Adhesion of Giant Unilamellar Vesicles. *ChemPhysChem* **10**, 2858–2861 (2009).
114. Bagatolli, L. ., Parasassi, T. & Gratton, E. Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods. *Chem. Phys. Lipids* **105**, 135–147 (2000).
115. Lee, M.-T., Sun, T.-L., Hung, W.-C. & Huang, H. W. Process of inducing pores in membranes by melittin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 14243–14248 (2013).
116. Leopold, N. & Lendl, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver

Colloids at Room ... (2003). doi:10.1021/jp027460u

117. Cañamares, M. V., Garcia-Ramos, J. V., Gómez-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).
118. 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).
119. Saade, J. & de Araujo, C. B. Synthesis of silver nanoprisms: A photochemical approach using light emission diodes. *Mater. Chem. Phys.* **148**, 1184–1193 (2014).
120. Neto, E. A. B. Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas. *Instituto de Física de São Carlos* (Universidade de São Paulo, 2010).
121. Berté, R. Síntese e caracterização de nanopartículas de prata conjugadas com peptídeos antimicrobianos. (de São Paulo, 2013).
122. Schenk, J. *et al.* Simultaneous UV/Vis spectroscopy and surface enhanced Raman scattering of nanoparticle formation and aggregation in levitated droplets. *Anal. Methods* **4**, 1252–1258 (2012).

123. 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).
124. Guerrini, L., Garcia-Ramos, J. V., Domingo, C. & Sanchez-Cortes, S. Nanosensors Based on Viologen Functionalized Silver Nanoparticles: Few Molecules Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Interparticle Hot Spots. *Anal. Chem.* **81**, 1418–1425 (2009).
125. Santos Costa, J. C. *et al.* High performance gold nanorods and silver nanocubes in surface-enhanced Raman spectroscopy of pesticides. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 7491 (2009).
126. Muniz-Miranda, M., Pagliai, M., Muniz-Miranda, F. & Schettino, V. Raman and computational study of solvation and chemisorption of thiazole in silver hydrosol. *Chem. Commun.* **47**, 3138 (2011).
127. 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).
128. 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).

129. Cardini, G. & Schettino, V. Molecular dynamics simulation of the vibrational properties of a disordered N₂O crystal. II. The symmetric stretching mode. *J. Chem. Phys.* **94**, 2502–2508 (1991).
130. 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).
131. Comber, S. Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. *Pestic. Sci.* **55**, 696–702 (1999).
132. Wei, H. & Vikesland, P. J. pH-Triggered Molecular Alignment for Reproducible SERS Detection via an AuNP/Nanocellulose Platform. *Sci. Rep.* **5**, 18131 (2015).
133. Sánchez-Cortés, S. & García-Ramos, J. V. Surface-enhanced Raman spectroscopy of 1,5-dimethylcytosine on silver and copper sols. *J. Raman Spectrosc.* **21**, 679–682 (1990).
134. Sánchez-Cortés, S. & Garcia-Ramos, J. V. SERS of cytosine and its methylated derivatives on metal colloids. *J. Raman Spectrosc.* **23**, 61–66 (1992).
135. Seol, Y. & Lee, L. S. Coupled Effects of Treated Effluent Irrigation and Wetting–Drying Cycles on Transport of Triazines through

- Unsaturated Soil Columns. *J. Environ. Qual.* **30**, 1644 (2001).
136. Moskovits, M. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783–826 (1985).
137. Rivas, L., Murza, A., Sánchez-Cortés, S. & García-Ramos, J. V. Adsorption of acridine drugs on silver: surface-enhanced resonance Raman evidence of the existence of different adsorption sites. *Vib. Spectrosc.* **25**, 19–28 (2001).
138. Foo, K. Y. & Hameed, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal* **156**, 2–10 (2010).
139. United States Environmental Protection Agency (USEPA). **2014**, Pesticides EPA 738-R-95-033
140. CETESB. *Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB. Projeto identificação de compostos prioritários e avaliação de toxicidade.* (2010).
141. Chen, Y., Chen, Z.-P., Jin, J.-W. & Yu, R.-Q. Quantitative determination of ametryn in river water using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with an advanced chemometric model. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **142**, 166–171 (2015).

PRM pH 11

Tabela I: valores absolutos das áreas integrada das bandas em 965 e 3400 cm^{-1} , obtidos em triplicatas para diferentes concentrações de PRM em coloide de Ag. pH 11.

Concentração mol/L	Medidas (1)		Medidas (2)		Medidas (3)	
[PRM]	965 cm^{-1}	3400 cm^{-1}	965 cm^{-1}	3400 cm^{-1}	965 cm^{-1}	3400 cm^{-1}
$6,0 \times 10^{-6}$	1417,274	$8,15388 \times 10^6$	2068,643	$7,83413 \times 10^6$	1843,48	$7,89320 \times 10^6$
$8,0 \times 10^{-6}$	1466,390	$7,39881 \times 10^6$	1368,847	$8,04247 \times 10^6$	2020,388	$8,31069 \times 10^6$
$1,0 \times 10^{-5}$	28280,79	$7,58576 \times 10^6$	2338,750	$7,70742 \times 10^6$	5545,324	$7,01274 \times 10^6$
$2,0 \times 10^{-5}$	30349,95	$6,67032 \times 10^6$	7892,158	$7,1054 \times 10^6$	5601,528	$7,62050 \times 10^6$
$4,0 \times 10^{-5}$	25617,95	$7,99760 \times 10^6$	48804,59	$6,75848 \times 10^6$	65898,64	$7,42614 \times 10^6$
$6,0 \times 10^{-5}$	47250,90	$5,87892 \times 10^6$	59310,05	$6,60377 \times 10^6$	38865,85	$6,91517 \times 10^6$
$8,0 \times 10^{-5}$	80927,71	$5,94775 \times 10^6$	61082,62	$4,55906 \times 10^6$	65666,91	$5,42184 \times 10^6$
$1,0 \times 10^{-4}$	101875,6	$5,16656 \times 10^6$	142083,6	$5,40442 \times 10^6$	100772,1	$5,40017 \times 10^6$
$2,0 \times 10^{-4}$	151156,0	$3,94501 \times 10^6$	182409,1	$4,52624 \times 10^6$	196211,0	$4,69149 \times 10^6$
$4,0 \times 10^{-4}$	147493,2	$4,47079 \times 10^6$	192723,8	$4,29636 \times 10^6$	147493,2	$3,79595 \times 10^6$
$6,0 \times 10^{-4}$	150309,9	$3,38634 \times 10^6$	184790,6	$4,03817 \times 10^6$	149200,6	$4,13539 \times 10^6$
$8,0 \times 10^{-4}$	141562,1	$2,93009 \times 10^6$	160744,9	$4,06286 \times 10^6$	187904,1	$3,79549 \times 10^6$

Tabela II: valores médios e erros referentes à razão entre a área integrada das bandas em 965 e 3400 cm^{-1} , obtidos em triplicatas para diferentes concentrações de PRM em coloide de Ag. pH 11.

Concentração [PRM] mol/L	Medidas (1) Razão (965)/(3400)	Medidas (2) Razão (965)/(3400)	Medidas (3) Razão (965)/(3400)	Médias	Erros ($y \pm$)
$6,0 \times 10^{-6}$	$1,73816 \times 10^{-4}$	$2,64055 \times 10^{-4}$	$2,33553 \times 10^{-4}$	$2,23808 \times 10^{-4}$	$4,59022 \times 10^{-5}$
$8,0 \times 10^{-6}$	$1,98194 \times 10^{-4}$	$1,70202 \times 10^{-4}$	$2,43107 \times 10^{-4}$	$2,03835 \times 10^{-4}$	$3,67782 \times 10^{-5}$
$1,0 \times 10^{-5}$	0,00126	$3,03442 \times 10^{-4}$	$7,9075 \times 10^{-4}$	0,00117	0,0011
$2,0 \times 10^{-5}$	0,0017	0,00111	$7,35061 \times 10^{-4}$	0,00212	0,00207
$4,0 \times 10^{-5}$	0,0032	0,00722	0,00228	0,00423	0,00263
$6,0 \times 10^{-5}$	0,00804	0,00595	0,00562	0,00654	0,00131
$8,0 \times 10^{-5}$	0,01361	0,0134	0,02211	0,01604	0,00497
$1,0 \times 10^{-4}$	0,01972	0,02629	0,01866	0,02156	0,00413
$2,0 \times 10^{-4}$	0,03832	0,0403	0,04182	0,04015	0,00176
$4,0 \times 10^{-4}$	0,04487	0,04486	0,03886	0,04286	0,00347
$6,0 \times 10^{-4}$	0,04439	0,04576	0,03608	0,04208	0,00524
$8,0 \times 10^{-4}$	0,04831	0,03956	0,04951	0,04579	0,00543

Tabela III: valores da área integrada entre 950 a 990 cm^{-1} ("banda de 965 cm^{-1} ") e de 3050 a 3750 cm^{-1} ("banda de 3400 cm^{-1} ") do espectro Raman do coloide de Ag registrado em triplicata. Esses dados foram utilizados nos cálculos dos LOD para PRM em ambos os pHs 7 e 11.

Medidas	Intensidade do sinal (Área da banda integrada) 950 - 990 cm^{-1} ("965 cm^{-1} ")	Intensidade do sinal (Área da banda integrada) 3050 - 3750 cm^{-1} ("3400 cm^{-1} ")	Razão (965)/(3400)
(1)	36,94998	$8,15222 \times 10^6$	$4,5325 \times 10^{-5}$
(2)	36,32552	$7,84213 \times 10^6$	$4,6321 \times 10^{-5}$
(3)	42,49122	$7,95055 \times 10^6$	$5,34444 \times 10^{-5}$

PRM pH 7

Tabela IV: valores absolutos das áreas integrada das bandas em 965 e 3400 cm^{-1} , obtidos em triplicatas para diferentes concentrações de PRM em coloide de Ag. pH 7.

Concentração mol/L	Medidas (1)		Medidas (2)		Medidas (3)	
[PRM]	965 cm^{-1}	3400 cm^{-1}	965 cm^{-1}	3400 cm^{-1}	965 cm^{-1}	3400 cm^{-1}
$6,0 \times 10^{-6}$	3257,228	$7,48941 \times 10^6$	2300,108	$5,86588 \times 10^6$	2769,853	$5,61927 \times 10^6$
$8,0 \times 10^{-6}$	998,093	$6,44009 \times 10^6$	3243,246	$5,2357 \times 10^6$	3832,881	$5,59509 \times 10^6$
$1,0 \times 10^{-5}$	3566,489	$5,64777 \times 10^6$	3554,84	$6,00347 \times 10^6$	6189,799	$5,78841 \times 10^6$
$2,0 \times 10^{-5}$	16352,63	$6,32486 \times 10^6$	13386,63	$6,30868 \times 10^6$	13187,47	$6,21928 \times 10^6$
$4,0 \times 10^{-5}$	50670,41	$6,37495 \times 10^6$	49990,18	$5,36997 \times 10^6$	49965	$5,74895 \times 10^6$
$6,0 \times 10^{-5}$	61842,2	$6,45392 \times 10^6$	85506,09	$5,7046 \times 10^6$	84626,91	$6,18805 \times 10^6$
$8,0 \times 10^{-5}$	113146	$6,25221 \times 10^6$	101835,9	$5,63421 \times 10^6$	98190,59	$5,49697 \times 10^6$
$1,0 \times 10^{-4}$	210184,1	$4,19734 \times 10^6$	185540,1	$4,39681 \times 10^6$	169685,8	$4,51316 \times 10^6$
$2,0 \times 10^{-4}$	192512,2	$4,11247 \times 10^6$	176778,1	$3,90606 \times 10^6$	220845,9	$4,29876 \times 10^6$
$4,0 \times 10^{-4}$	157934,4	$3,21143 \times 10^6$	160504,9	$3,21752 \times 10^6$	141608,6	$3,27385 \times 10^6$
$6,0 \times 10^{-4}$	139506,1	$2,8552 \times 10^6$	160254,6	$3,66813 \times 10^6$	135215,4	$2,84312 \times 10^6$
$8,0 \times 10^{-4}$	137139,3	$2,87972 \times 10^6$	143644,7	$3,21405 \times 10^6$	144811,7	$3,08447 \times 10^6$

Tabela V: valores médios e erros referentes à razão entre a área integrada das bandas em 965 e 3400 cm^{-1} , obtidos em triplicatas para diferentes concentrações de PRM em coloide de Ag. pH 7.

Concentração [PRM] mol/L	Medidas (1) Razão (965)/(3400)	Medidas (2) Razão (965)/(3400)	Medidas (3) Razão (965)/(3400)	Médias	Erros (yEr±)
6,0 x 10 ⁻⁶	4,9292 x 10 ⁻⁴	3,92117 x 10 ⁻⁴	4,34911 x 10 ⁻⁴	4,39983 x 10 ⁻⁴	5,05925 x 10 ⁻⁵
8,0 x 10 ⁻⁶	6,85044 x 10 ⁻⁴	6,19449 x 10 ⁻⁴	1,54981 x 10 ⁻⁴	4,86491 x 10 ⁻⁴	2,88964 x 10 ⁻⁴
1,0 x 10 ⁻⁵	0,00107	5,92131 x 10 ⁻⁴	6,31487 x 10 ⁻⁴	7,64321 x 10 ⁻⁴	2,65268 x 10 ⁻⁴
2,0 x 10 ⁻⁵	0,00212	0,00212	0,00259	0,00228	2,71355 x 10 ⁻⁴
4,0 x 10 ⁻⁵	0,00869	0,00931	0,00795	0,00865	6,80882 x 10 ⁻⁴
6,0 x 10 ⁻⁵	0,01368	0,01499	0,00958	0,01275	0,00282
8,0 x 10 ⁻⁵	0,01786	0,01807	0,0181	0,01801	1,30767 x 10 ⁻⁴
1,0 x 10 ⁻⁴	0,05137	0,04526	0,04681	0,04781	0,00318
2,0 x 10 ⁻⁴	0,04325	0,04988	0,04918	0,04744	0,00364
4,0 x 10 ⁻⁴	0,04756	0,04369	0,04886	0,0467	0,00269
6,0 x 10 ⁻⁴	0,04695	0,04207	0,04762	0,04555	0,00303
8,0 x 10 ⁻⁴	4,9292 x 10 ⁻⁴	3,92117 x 10 ⁻⁴	4,34911 x 10 ⁻⁴	4,39983 x 10 ⁻⁴	5,05925 x 10 ⁻⁵

AMT pH 7

Tabela VI: valores absolutos das áreas integrada das bandas em 965 e 3400 cm^{-1} , obtidos em triplicatas para diferentes concentrações de AMT em coloide de Ag. pH 7.

Concentração mol/L	Medidas (1)		Medidas (2)		Medidas (3)	
[AMT]	965 cm^{-1}	3400 cm^{-1}	965 cm^{-1}	3400 cm^{-1}	965 cm^{-1}	3400 cm^{-1}
1,0 x 10 ⁻⁵	1477,425	1,71156 x 10 ⁶	1633,01	1,7003 x 10 ⁶	1350,048	1,56787 x 10 ⁶
2,0 x 10 ⁻⁵	3429,91	2,26917 x 10 ⁶	2466,977	1,99388 x 10 ⁶	2376,147	1,83611 x 10 ⁶
3,0 x 10 ⁻⁵	6043,323	1,41124 x 10 ⁶	4097,706	1,78329 x 10 ⁶	4055,775	1,47337 x 10 ⁶
4,0 x 10 ⁻⁵	5407,013	1,48057 x 10 ⁶	7505,885	2,01662 x 10 ⁶	4226,533	1,65308 x 10 ⁶
5,0 x 10 ⁻⁵	19756,64	1,63865 x 10 ⁶	18380,74	2,00936 x 10 ⁶	13220,86	1,98007 x 10 ⁶
6,0 x 10 ⁻⁵	43087,15	1,98782 x 10 ⁶	16379,49	1,91993 x 10 ⁶	22185,48	1,38844 x 10 ⁶
7,0 x 10 ⁻⁵	61708,51	1,51581 x 10 ⁶	76837,17	1,91191 x 10 ⁶	42545,52	1,5292 x 10 ⁶
8,0 x 10 ⁻⁵	54548,29	1,59121 x 10 ⁶	36699,52	1,32595 x 10 ⁶	32499,58	1,91269 x 10 ⁶
1,0 x 10 ⁻⁴	33113,91	1,50822 x 10 ⁶	56497,48	1,94378 x 10 ⁶	62488,52	1,91507 x 10 ⁶
2,0 x 10 ⁻⁴	142179,5	1,81866 x 10 ⁶	188167,8	1,88958 x 10 ⁶	145175,2	1,78044 x 10 ⁶
4,0 x 10 ⁻⁴	147192,7	1,64429 x 10 ⁶	158070,7	1,77003 x 10 ⁶	190927,6	2,06175 x 10 ⁶

Tabela VII: valores médios e erros referentes à razão entre a área integrada das bandas em 965 e 3400 cm^{-1} , obtidos em triplicatas para diferentes concentrações de AMT em coloide de Ag. pH 7.

Concentração [AMT] mol/L	Medidas (1) Razão (965)/(3400)	Medidas (2) Razão (965)/(3400)	Medidas (3) Razão (965)/(3400)	Médias	Erros ($y \pm$)
$1,0 \times 10^{-5}$	$8,61073 \times 10^{-4}$	$9,60427 \times 10^{-4}$	$8,63205 \times 10^{-4}$	0,00211	$5,67568 \times 10^{-5}$
$2,0 \times 10^{-5}$	0,00129	0,00124	0,00151	0,00304	$1,44747 \times 10^{-4}$
$3,0 \times 10^{-5}$	0,00275	0,0023	0,00428	0,00648	0,00104
$4,0 \times 10^{-5}$	0,00256	0,00372	0,00365	0,0075	$6,5348 \times 10^{-4}$
$5,0 \times 10^{-5}$	0,00668	0,00915	0,01206	0,01984	0,00269
$6,0 \times 10^{-5}$	0,01598	0,00853	0,02168	0,03174	0,00659
$7,0 \times 10^{-5}$	0,02782	0,04019	0,04071	0,04158	0,00729
$8,0 \times 10^{-5}$	0,01699	0,02768	0,03428	0,0561	0,00872
$1,0 \times 10^{-4}$	0,03263	0,02907	0,02196	0,07801	0,00543
$2,0 \times 10^{-4}$	0,08154	0,09958	0,07818	0,20718	0,01151
$4,0 \times 10^{-4}$	0,0926	0,0893	0,08952	0,21175	0,00185

Tabela VIII: valores da área integrada entre 950 a 990 cm^{-1} ("banda de 965 cm^{-1} ") e de 3050 a 3750 cm^{-1} ("banda de 3400 cm^{-1} ") do espectro Raman do coloide de Ag registrado em triplicata. Esses dados foram utilizados no cálculo do LOD para AMT em pH 7.

Medidas	Intensidade do sinal (Área da banda integrada) 950 - 990 cm^{-1} ("965 cm^{-1} ")	Intensidade do sinal (Área da banda integrada) 3050 - 3750 cm^{-1} ("3400 cm^{-1} ")	Razão (965)/(3400)
(1)	70,50943	$5,81149 \times 10^6$	$1,21328 \times 10^{-5}$
(2)	67,2867	$6,1325 \times 10^6$	$1,09721 \times 10^{-5}$
(3)	10,55776	$6,22695 \times 10^6$	$1,69955 \times 10^{-5}$