

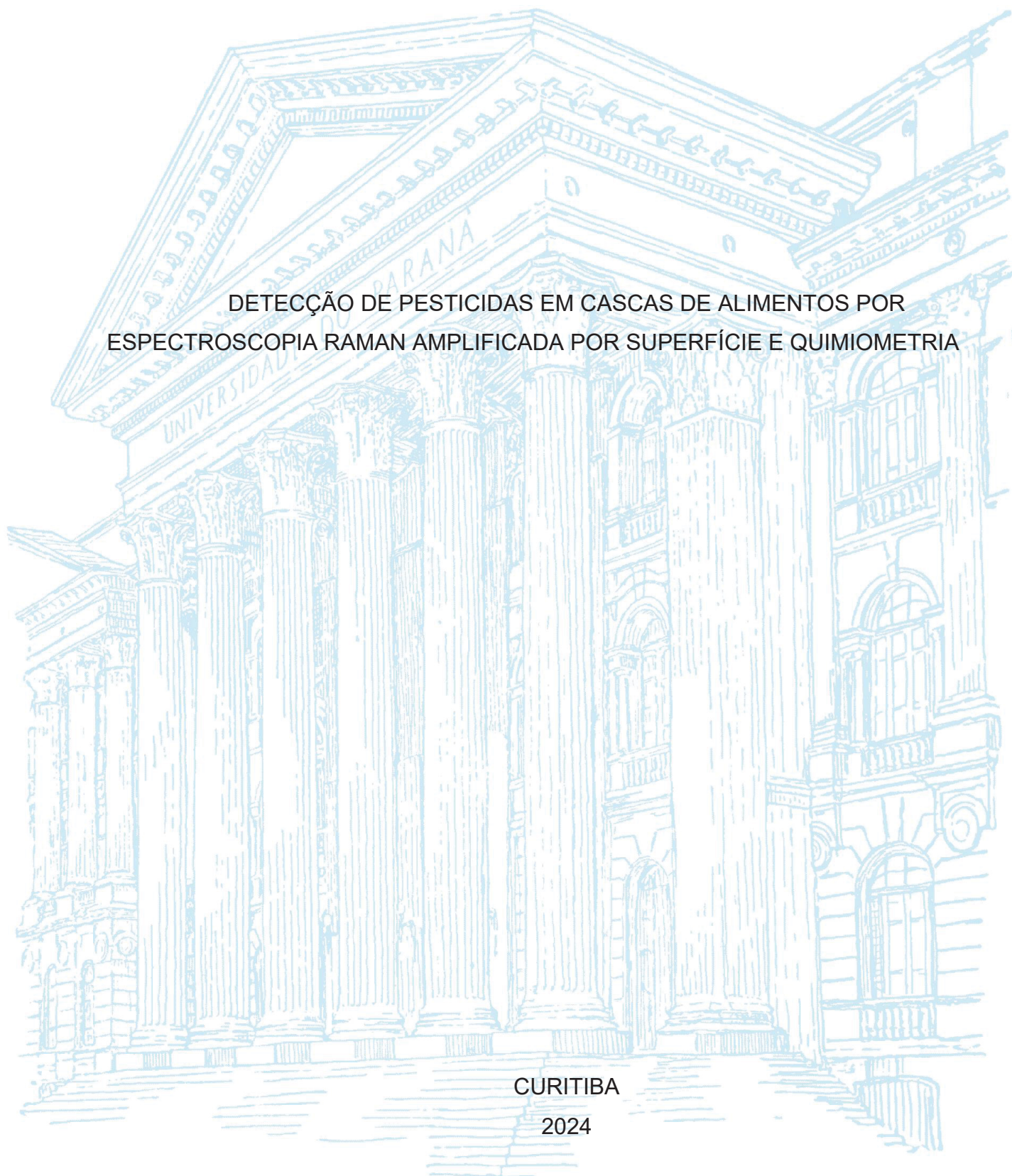
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDERSON VICTOR DA SILVA

DETECÇÃO DE PESTICIDAS EM CASCAS DE ALIMENTOS POR
ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE E QUIMIOMETRIA

CURITIBA

2024



ANDERSON VICTOR DA SILVA

DETECÇÃO DE PESTICIDAS EM CASCAS DE ALIMENTOS POR
ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE E QUIMIOMETRIA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Frederico L. F. Soares

Coorientador: Prof. Dr. Aldo J. G. Zarbin

CURITIBA

2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Silva, Anderson Victor da

Detecção de pesticidas em cascas de alimentos por Espectroscopia Raman amplificada por superfície e quimiometria / Anderson Victor da Silva. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientador: Frederico L. F. Soares

Coorientador: Aldo J. G. Zarbin

1. Pesticidas. 2. Raman, Espectroscopia de. 3. Óxido de grafeno reduzido. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Soares, Frederico L. F.. IV. Zarbin, Aldo J. G.. V. Título.

Bibliotecário: Leticia Priscila Azevedo de Sousa CRB-9/2029



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDERSON VICTOR DA SILVA** intitulada: **"Determinação de pesticidas em cascas de frutas por Espectroscopia Raman amplificada por superfície e quimiometria"** para **"Detecção de pesticidas em cascas de alimentos por Espectroscopia Raman amplificada por superfície e quimiometria"**, sob orientação do Prof. Dr. FREDERICO LUIS FELIPE SOARES, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 25 de Julho de 2024.

Assinatura Eletrônica

29/07/2024 08:56:32.0

FREDERICO LUIS FELIPE SOARES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/07/2024 11:37:31.0

PATRICIO GUILHERMO PERALTA ZAMORA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/07/2024 13:14:29.0

EDUARDO GUILHERME CIVIDINI NEIVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

ATA Nº468

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM QUÍMICA

No dia vinte e cinco de julho de dois mil e vinte e quatro às 09:00 horas, na sala de aulas do PPGQ, Centro Politécnico - UFPR, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **ANDERSON VICTOR DA SILVA**, intitulada: **Determinação de pesticidas em cascas de frutas por Espectroscopia Raman amplificada por superfície e quimiometria** para **"Detecção de pesticidas em cascas de alimentos por Espectroscopia Raman amplificada por superfície e quimiometria"**, sob orientação do Prof. Dr. FREDERICO LUIS FELIPE SOARES. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: FREDERICO LUIS FELIPE SOARES (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), PATRICIO GUILHERMO PERALTA ZAMORA (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), EDUARDO GUILHERME CIVIDINI NEIVA (UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela **APROVAÇÃO**. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, FREDERICO LUIS FELIPE SOARES, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 25 de Julho de 2024.

Assinatura Eletrônica

29/07/2024 08:56:32.0

FREDERICO LUIS FELIPE SOARES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/07/2024 11:37:31.0

PATRICIO GUILHERMO PERALTA ZAMORA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/07/2024 13:14:29.0

EDUARDO GUILHERME CIVIDINI NEIVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU)

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 0000-00000 - E-mail: cpgquim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 384700

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaocassinaturas.jsp> e insira o código 384700

À Bianca, Verônica, Bisteca e Paçoca. Se não fosse por vocês, nada disso
teria sido feito.

AGRADECIMENTOS

À Deus;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Frederico Luis Felipe Soares pela orientação, pela oportunidade, pela atenção durante o período em que passou fora do país, pela paciência e principalmente pela confiança em mim no desenvolvimento desse trabalho;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Aldo José Gorgatti Zarbin, pela coorientação, pela paciência (mesmo eu sendo um poço de ansiedade) e pela oportunidade de fazer parte do GQM, que contribuiu tanto para a melhoria desse trabalho quanto para o meu crescimento profissional e pessoal;

Aos professores Dr. Patrício Peralta Zamora (Departamento de Química da UFPR) e Dra. Marcela Mohallem (Departamento de Química e Biologia da UTFPR), por aceitarem o convite e pela contribuição inestimável dada para este trabalho durante no exame de qualificação;

Aos professores membros da banca examinadora, os professores: Dr. Patrício Peralta Zamora (Departamento de Química da UFPR) e Dr. Eduardo Cividini Neiva (Departamento de Química da FURB). Aos professores Dr. Christian Wittee (Departamento de Química da UFPR) como suplente e Dr. Marco Antônio Farias (Departamento de Química da UFSCar) como suplente, por terem gentilmente aceito o convite para avaliar esse trabalho;

Aos meus amigos do Grupo de Química de Materiais (GQM): Amanda (Mandy), André (Andrézinho), Bernardo, Carla (Carlinha), Carlos (Carlão), Dênis, Eduarda (Duda), Gabriel (Gabrielzinho), João, Karol, Mariana (Mari), Maria Carolina, Mayara, Patrícia (Patty), Thiago (Thiagão), Vinicius (Vini Vini) e Wagner (Waguinho).

Aos meus amigos do DATALab: Eduarda, Marcos e Victor;

Aos meus amigos e professores dos grupos TECNOTRATER, GQA, GAQQ, Lecosin, LAESB, LQAA, LQIA, Q²M e LC2M;

Aos amigos do Departamento de Química, pelas conversas descontraídas, almoços no RU, cervejas e pelos momentos de alegria;

Ao Leonardo Lemes, por auxiliar nas análises de Raman, sendo essencial para o desenvolvimento da pesquisa;

À Ketlyn Borth, por ceder nitrogênio líquido para filtrar Gr-O, sendo essencial para o desenvolvimento da pesquisa.

À Amanda e Patrícia por auxiliarem nas análises de MEV, que foram essenciais para o desenvolvimento da pesquisa;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR (CME-UFPR) pelas imagens de Raman;

Ao meu psiquiatra e psicólogo Dr. Claudio, pela compreensão e ajuda que foi fundamental para a conclusão desse trabalho;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida;

Aos órgãos de fomento que auxiliam financeiramente os trabalhos desenvolvidos no Grupo de Química de Materiais, sendo eles, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanomateriais de Carbono – INCT Nanocarbono e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Nanomateriais para a vida – INCT NanoVida – juntamente com a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao INCT;

A todos os funcionários do corpo técnico-administrativo e professores do Departamento de Química da UFPR;

Ao departamento de Química e à Pós-graduação em Química da UFPR;

À Universidade Federal do Paraná;

RESUMO

O desenvolvimento de metodologias eficientes para detecção, eliminação e controle de riscos à saúde causados por substâncias nocivas, como pesticidas, é um tema de grande relevância para a pesquisa científica. Neste contexto, este trabalho visa otimizar a síntese de um filme fino de óxido de grafeno reduzido com nanopartículas de prata (rGO/AgNPs) por meio da rota interfacial líquido-líquido (LLIR). A otimização busca intensificar o sinal SERS (Surface-enhanced Raman Scattering) para a detecção de 4-aminotiofenol (4-ATP) e, posteriormente, do pesticida ametrina (AMT). O 4-ATP foi empregado como sonda para identificar e avaliar os parâmetros que influenciam a variação do sinal SERS. Dessa forma, foi utilizado um planejamento fatorial fracionário e posteriormente, um planejamento Box-Behnken para investigar os seguintes fatores: concentração e massas dos reagentes, tempos de reação e velocidade de rotação. Os valores obtidos para a condição ótima foram: 7,0 mg de nitrato de prata, 1000 RPM, 60 minutos de tempo de dispersão, 150 mg de borohidreto de sódio, 0,01 mg mL⁻¹ de óxido de grafeno e 45 minutos de tempo de redução. Com base nos resultados, foi construído um modelo de superfície de respostas empírica para determinar as condições ideais de síntese do material. O modelo apresentou um bom ajuste de dados, mas a regressão não foi considerada significativa. Houve um aumento na dispersão Raman cerca de 21500 vezes maior em relação à solução pura de 4-ATP. O material foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), e espectroscopias UV-Vis e Raman. As técnicas de caracterização indicaram o crescimento e aglomeração das AgNPs sobre as folhas de grafeno, o que contribui para o aumento da intensidade SERS. Após isso, o substrato SERS foi utilizado para fazer a detecção do herbicida diretamente depositado em cascas de alimentos, sendo estes maçã e batata. Dessa forma, para garantir a reprodutibilidade da aquisição do sinal, foram realizadas medidas de imageamento hiperespectral das cascas de batata e maçã com diferentes níveis de concentração de ametrina e, a partir das imagens hiperespectrais, foi possível detectar a ametrina em concentrações baixas (1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹) com o mínimo de preparo de amostras.

Palavras-chave: Detecção de pesticidas; SERS (Surface-enhanced Raman Scattering); óxido de grafeno reduzido; nanopartículas de prata; imageamento hiperespectral.

ABSTRACT

The development of efficient methodologies for detection, elimination, and control of health risks caused by harmful substances, such as pesticides, is a topic of great relevance for scientific research. In this context, this work aims to optimize the synthesis of thin film of reduced graphene oxide with silver nanoparticles (rGO/AgNPs) through the liquid-liquid interfacial route (LLIR). The optimization seeks to intensify the SERS (Surface-enhanced Raman Scattering) signal for the detection of 4-aminothiophenol (4-ATP) and, subsequently, the pesticide ametryn (AMT). 4-ATP was employed as a probe to identify and evaluate the parameters influencing the variation of the SERS signal. Thus, a fractional factorial design and, subsequently a Box-Behnken design were used to investigate the following factors: concentration and masses of reagents, reaction times, and rotation speed. The values obtained for the optimal condition were: 7.0 mg of silver nitrate, 1000 RPM, 60 minutes of dispersion time, 150 mg of sodium borohydride, 0.01 mg mL⁻¹ of graphene oxide, and 45 minutes of reduction time. Based on the results, an empirical response surface model was constructed to determine the ideal conditions for the material synthesis. The model showed a good data fit, but the regression was not considered significant. There was an increase in the Raman scattering approximately 21,500 times greater compared of the pure 4-ATP solution. The material was characterized by scanning electron microscopy (SEM), and UV-Vis and Raman spectroscopies. The characterization techniques indicated the growth and agglomeration of AgNPs on graphene sheets, which contributes to the increase SERS intensity. After that, the SERS substrate was used to detect the herbicide directly deposited on food peels, such as apple and potato. Thus, to ensure the reproducibility of signal acquisition, hyperspectral imaging measurements of potato and apple peels with different concentrations of ametryn were performed. From the hyperspectral images, it was possible to detect ametryn at low concentrations (1.0×10^{-7} mol L⁻¹) with minimal sample preparation.

Keywords: Pesticides detection; SERS (Surface-enhanced Raman Scattering); graphene oxide reduce; silver nanoparticles; hyperspectral imaging.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO E ESPALHAMENTO RAMAN.	18
FIGURA 2 – ESPALHAMENTO ANTI-STOKES, RAYLEIGH E STOKES.....	19
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EFEITO DE RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA (LSPR) EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.	21
FIGURA 4 – FENÔMENOS RAMAN E EFEITO SERS.	22
FIGURA 5 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DO COMPÓSITO rGO/AgNPs PARA DETECÇÃO DE MOLÉCULAS ALVO.	25
FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DOS FATORES DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO DE EXPERIMENTOS COM AS RESOLUÇÕES.	29
FIGURA 7 - ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DA SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFITE.....	34
FIGURA 8 - ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DO FILME DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO E SUA POSTERIOR DEPOSIÇÃO EM SUBSTRATO DE VIDRO.	35
FIGURA 9 – ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO 4-AMINOTIOFENOL (4-ATP).....	41
FIGURA 10 – ESPECTRO RAMAN DO 4-ATP (a) NO ESTADO SÓLIDO (LINHA PRETA) E EM SOLUÇÃO AQUOSA $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (LINHA AZUL); (b) EM FILME rGO/AgNPs NA CONDIÇÃO DE PONTO CENTRAL EM LASER VERDE ($\lambda=532 \text{ nm}$).	42
FIGURA 11 – GRÁFICO DE EFEITOS E DESVIO PADRÃO PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO.	45
FIGURA 12 – ESPECTROS RAMAN DO 4-ATP $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NO PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS: (i) MENOR RESPOSTA; (ii) PONTO CENTRAL; (iii) MAIOR RESPOSTA.	46
FIGURA 13 – (a) DISPERSÃO DE GO EM QUARTZO; (b) ESPECTRO UV-Vis DA DISPERSÃO DE GO.....	47

FIGURA 14 – FOTOGRAFIAS DIGITAIS DA REAÇÃO PARA A FORMAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS. (a) ANTES DA ADIÇÃO DE NaBH ₄ ; (b) APÓS A ADIÇÃO DE NaBH ₄ e (c) TÉRMINO DA REAÇÃO.....	48
FIGURA 15 – (a) FOTOGRAFIAS DIGITAIS (i) PLANEJAMENTO BOX-BEHKEN; (ii) MAIOR RESPOSTA PLANEJAMENTO FATORIAL; (iii) PONTO CENTRAL; (iv) MENOR RESPOSTA PLANEJAMENTO FATORIAL e (b) ESPECTRO UV-Vis DOS FILMES FINOS (i) PLANEJAMENTO BOX-BEHKEN; (ii) MAIOR RESPOSTA PLANEJAMENTO FATORIAL; (iii) PONTO CENTRAL; (iv) MENOR RESPOSTA PLANEJAMENTO FATORIAL; (v) rGO.....	50
FIGURA 16 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS AMOSTRAS (a-d) MENORES RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS.	53
FIGURA 17 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS AMOSTRAS (e-h) PONTO CENTRAL DO PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO DE EXPERIMENTOS.	54
FIGURA 18 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS AMOSTRAS (i-l) MAIORES RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS.	55
FIGURA 19 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DA AMOSTRA (a-d) DE MAIOR RESPOSTA DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN.	57
FIGURA 20 – ESPECTROS RAMAN DOS MATERIAIS CARBONÁCEOS; (a): (i) grafite; (ii) Gr-O; (iii) GO; (iv) rGO. (b): (i) rGO/AgNPs PBB; (ii) rGO/AgNPs PFF MAIOR RESPOSTA; (iii) rGO/AgNPs PC; (iv) rGO/AgNPs PFF MENOR RESPOSTA.....	58
FIGURA 21 – ESPECTROS RAMAN DA SOLUÇÃO DE 4-ATP 1.0×10 ⁻³ mol L ⁻¹ NOS PLANEJAMENTOS: (i) PFF MENOR RESPOSTA; (ii) PONTO CENTRAL; (iii) PFF MAIOR RESPOSTA; (iv) BOX-BEHNKEN.....	61
FIGURA 22 – (a) GRÁFICO DE EFEITOS E SEUS DESVIO-PADRÃO DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN; (b) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA EMPÍRICA DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN.....	63
FIGURA 23 – ESPECTROS RAMAN DOS PESTICIDAS: (a) SIMAZINA; (b) ATRAZINA; (c) CARBARIL; (d) AMETRINA.....	66

FIGURA 24 – ESPECTROS RAMAN FILME rGO/AgNPs OTIMIZADA PELO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN DE: (a) CARBENDAZIM; (b) THIABENDAZOL.....	67
FIGURA 25 – ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO HERBICIDA AMETRINA.....	68
FIGURA 26 – (a) ESPECTROS RAMAN DA AMETRINA EM FILME rGO/AgNPs OTIMIZADA PELO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN, (b) ESPECTRO RAMAN DO FILME rGO/AgNPs.....	69
FIGURA 27 – ESPECTROS RAMAN DE AMETRINA DEPOSITADA DIRETAMENTE EM CASCA DE (a) MAÇÃ; (b) BATATA.	71
FIGURA 28 – ESPECTROS RAMAN DE AMETRINA COM rGO/AgNPs BOX-BEHNKEN DEPOSITADA DIRETAMENTE EM CASCA DE (a) MAÇÃ (i) 10^{-4} mol L ⁻¹ ; (ii) 10^{-5} mol L ⁻¹ e (iii) 10^{-7} mol L ⁻¹ ; (b) BATATA (i) 10^{-4} mol L ⁻¹ ; (ii) 10^{-5} mol L ⁻¹ e (iii) 10^{-7} mol L ⁻¹	72
FIGURA 29 – IMAGEAMENTO HIPERESPECTRAL PARA A AMETRINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM CASCAS DE BATATA E MAÇÃ.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO DO TIPO 2^{6-2}_{IV} COM OS VALORES DE NÍVEL MÁXIMO (+1), DE NÍVEL MÍNIMO (-1) E O PONTO CENTRAL (0). .36	36
TABELA 2 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO	36
TABELA 3 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN	37
TABELA 4 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS FIXAS DO PLANEJAMENTO BOX- BEHNKEN.....	37
TABELA 5 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO BOX- BEHNKEN.....	37
TABELA 6 – ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS DO 4-ATP PRESENTES NOS ESPECTRO RAMAN.	42
TABELA 7 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO COM AS RESPOSTAS	43
TABELA 8 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO BOX- BEHNKEN COM A RESPOSTA.....	60
TABELA 9 – ANOVA PARA O MODELO NO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN. .	62
TABELA 10 – ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS DA AMETRINA PRESENTES NOS ESPECTRO RAMAN.	70

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

4-ATP	- 4-aminotiofenol
AgNPs	- Nanopartículas de Prata
AMT	- Ametrina
ANOVA	- Análise de Variância
AuNPs	- Nanopartículas de Ouro
EF	- <i>Enhanced factor</i> (do inglês: fator de intensificação)
GO	- Óxido de Grafeno
Gr-O	- Óxido de Grafite
IR	- Infravermelho
LC	- Cromatografia Líquida
LLIR	- Rota Interfacial Líquido-Líquido
LSPR	- Ressonância de <i>Plasmons</i> de Superfície Localizada
MET	- Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	- Espectrometria de Massas
NPs	- Nanopartículas metálicas
PFF	- Planejamento Fatorial Fracionário
PBB	- Planejamento Box-Behnken
rGO	- Óxido de Grafeno Reduzido
SERS	- <i>Surface Enhanced Raman Scattering</i> (do inglês: espalhamento Raman intensificado por superfície)
UV-Vis	- Espectroscopia de Absorção na região Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN (RAMAN)	17
1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE (SERS)	20
1.3 DERIVADOS DE GRAFENO E SEUS NANOCOMPÓSITOS COM PRATA	24
1.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	27
1.4.1 Planejamento Fatorial Fracionado de Experimentos	27
1.4.2 Planejamento Box-Behnken	30
2 OBJETIVOS	32
2.1 OBJETIVO GERAL	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFITE E PREPARO DA DISPERSÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO	33
3.2 SÍNTESE DO FILME COMPÓSITO ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR INTERFACE LÍQUIDO-LÍQUIDO	34
3.3 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	35
3.4 LIMPEZA DOS SUBSTRATOS E DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS	38
3.5 MEDIDAS DE SERS	39
3.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	40
3.6.1 Espectroscopia de absorção na região UV-Vis	40
3.6.2 Espectroscopia Raman	40
3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
4 RESULTADOS	40
4.1 PERFIL ESPECTROQUÍMICO DO ANALITO-SONDA	41
4.2 PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS	43
4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA	47
4.3.1 Espectroscopia de UV-Vis e fotografias digitais dos compósitos	47
4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	52
4.3.3 Espectroscopia Raman	58
4.3.4 Planejamento Box-Behnken	60

4.3.5 Aplicação do rGO/AgNPS para detecção de resíduos de pesticidas em cascas de alimentos	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	75
REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Pesticidas são produtos químicos utilizados para o controle de pragas, fungos e infestantes na agricultura e na pecuária. Esses produtos apresentam um risco potencial à saúde humana, ao meio ambiente e a organismos aquáticos associados ao seu uso indiscriminado (BOCHNER, 2007).

A toxicidade e ação dos pesticidas variam de acordo com o grupo químico ao qual pertencem. Dessa forma, eles possuem 4 categorias de classificação que estão relacionados a sua toxicidade: classe I – altamente tóxico (possui rótulo vermelho), classe II – moderadamente tóxico (possui rótulo amarelo), classe III – pouco tóxico (possui rótulo azul) e classe IV – não tóxico (possui rotulo verde) (PERES; MOREIRA, 2003). Devido a sua alta toxicidade, e aos impactos ambientais, muitos pesticidas tiveram seu uso proibido no Brasil desde 1985. No entanto, nos últimos anos, houve uma maior flexibilização no uso e na regulamentação desses agroquímicos no Brasil, permitindo a aplicação de produtos de alta toxicidade e que tem o seu uso proibido em vários outros países (LIGNANI; BRANDÃO, 2022; MOTA et al., 2023).

Estudos demonstram que o uso frequente e indiscriminado de pesticidas tem um impacto significativo na qualidade do meio ambiente e na saúde humana (FRIEDRICH et al., 2021; LIGNANI; BRANDÃO, 2022). A interação intensa entre esses produtos e o solo utilizado para o cultivo pode resultar em diversos problemas de contaminação, afetando os produtos cultivados, o solo, o ar e até mesmo a água utilizada na agricultura (NASCIMENTO; MELNYK, 2016). A contaminação por pesticidas pode ter efeitos na saúde humana de duas maneiras distintas, sendo elas os efeitos agudos, aos quais se manifestavam em 24 horas após a exposição a altas concentrações de pesticidas, e os efeitos crônicos, que se desenvolvem ao longo do tempo devido à exposição contínua a doses reduzidas (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; MOTA et al., 2023).

Na última década, houve um grande esforço para a melhoria da qualidade e segurança alimentar, resultando no desenvolvimento de métodos mais eficazes para detectar, eliminar e controlar os riscos impostos por essas substâncias nocivas. A detecção e quantificação de pesticidas são importantes para garantir a segurança alimentar e monitorar os impactos ambientais impostos por esses produtos. Embora vários métodos analíticos como cromatografia, espectrometria de massas (MS) e

espectroscopia sejam empregados, a cromatografia líquida (LC) é considerada a técnica padrão para análise de alimentos devido à sua excepcional seletividade e sensibilidade, principalmente quando acoplada à espectrometria de massas. No entanto, devido aos altos custos e longo tempo de análise associados à LC, tem se impulsionado a exploração de técnicas alternativas para essa análise (PANG; YANG; HE, 2016; SHARMA et al., 2024; TONG et al., 2018). Dessa forma, a espectroscopia Raman surge como uma técnica alternativa viável para a detecção de pesticidas em termos de fácil operação e rapidez na aquisição dos dados, quando comparado com a LC-MS. Além disso, a espectroscopia Raman usualmente não necessita de um preparo de amostras laborioso.

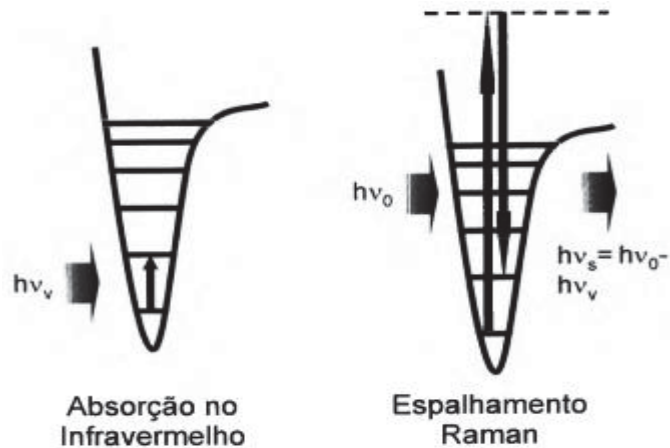
1.1 ESPECTROSCOPIA RAMAN (RAMAN)

A espectroscopia Raman (Raman) foi observada experimentalmente em 1928 pelo físico Chandrasekhara Venkata Raman, recebendo seu nome em homenagem (RAMAN; KRISHNAN, 1928). Essa técnica analítica baseia-se na interação da radiação com a nuvem eletrônica das moléculas e, com isso, é possível estudar a composição química e as características físico-químicas das amostras em questão. O fenômeno responsável pelo efeito Raman ocorre devido à vibração molecular resultante da alteração da polarizabilidade da molécula ao interagir com luz monocromática incidente, geralmente proveniente de um laser.

O laser é uma fonte de emissão importante devido às suas características específicas, que otimizam as condições para a observação do efeito, sendo elas: (1) a alta intensidade, que aumenta a chance de interação entre os fótons e moléculas, aumentando a taxa de espalhamento Raman e (2) a monocromaticidade da luz do laser que possui apenas um comprimento de onda, permitindo a determinação da diferença de energia entre a luz incidente e espalhada ao qual pode-se obter informações específicas de impressões digitais moleculares (SCHLÜCKER, 2014).

Apesar do Raman ter características similares à espectroscopia no infravermelho (IR), a distinção entre ambas as técnicas consiste na natureza do fenômeno físico envolvido. Enquanto o IR foca na absorção da radiação, o Raman deriva do espalhamento (RODRIGUES; GALZERANI, 2012). Essa diferença em nível molecular pode ser descrita na FIGURA 1.

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO E ESPALHAMENTO RAMAN.



Fonte: Adaptado de (RODRIGUES; GALZERANI, 2012).

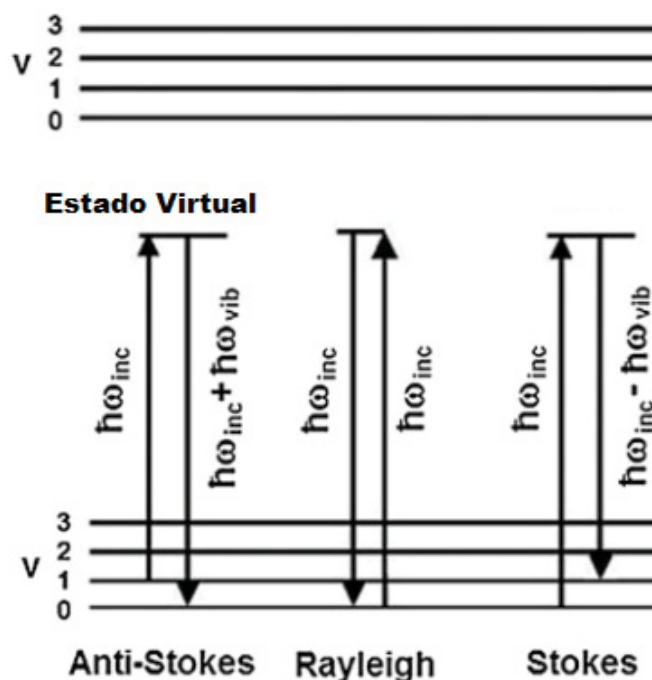
No IR, o fóton emitido é absorvido pela molécula, excitando a mesma para um nível vibracional mais energético, enquanto no Raman, o fóton emitido interage com a molécula e é espalhado a um nível energético diferente daquele incidido, proporcional ao nível vibracional da molécula. Além disso, no IR, a atividade vibracional é proveniente da mudança no momento de dipolo e no Raman, a atividade vibracional tem origem na mudança de polarizabilidade (RAMAN; KRISHNAN, 1928; YASEEN; SUN; CHENG, 2017).

De forma detalhada, no instante que a radiação eletromagnética interage com a superfície de um material, uma parcela dessa luz é refletida enquanto a restante é transmitida para dentro do meio. A fração de luz transmitida para o meio do material pode ainda sofrer outros dois fenômenos físicos, na qual uma parcela dessa radiação é absorvida na forma de calor (IR), enquanto a outra parcela é retransmitida na forma de luz espalhada (Raman). Boa parte da luz espalhada tem a mesma energia da radiação emitida, chamada espalhamento Rayleigh. Entretanto, uma pequena parte da luz espalhada resulta em uma energia diferente da emitida. Essa fração recebe o nome de espalhamento Raman (AROCA, 2006; HAYNES; MCFARLAND; VAN DUYNE, 2005; PROCHAZKA, 2016; SCHLÜCKER, 2014).

O espalhamento Raman pode ainda ser subdividido em dois tipos, que depende da energia do fóton. Quando a energia do fóton dispersado é menor que a energia incidente, tem-se o espalhamento Stokes (PROCHAZKA, 2016) Se a energia do fóton dispersado é maior que a energia incidente, tem-se o espalhamento Anti-Stokes. Na FIGURA 2 temos a representação dos espalhamentos Anti-Stokes,

Rayleigh e Stokes, respectivamente. O espalhamento Stokes possui maior intensidade Raman em comparação com o espalhamento Anti-Stokes. A razão para isso está relacionada aos estados vibracionais dos átomos ou moléculas que está sendo analisado, uma vez que no espalhamento Stokes a energia do fóton incidente é transferida para a molécula, excitando-a de um estado vibracional fundamental para um estado vibracional excitado e no espalhamento Anti-Stokes, a molécula começa em um estado vibracional excitado e perde energia ao ser excitada pelo fóton incidente retornando ao estado fundamental. Dessa forma, o espalhamento Stokes possui maior intensidade porque a transição de um estado fundamental para um estado vibracional excitado é mais provável do que moléculas que estejam em um estado vibracional excitado, que é menos provável devido à menor população desses estados (HAYNES; MCFARLAND; VAN DUYN, 2005; PROCHAZKA, 2016; SCHLÜCKER, 2014).

FIGURA 2 – ESPALHAMENTO ANTI-STOKES, RAYLEIGH E STOKES.



Fonte: Adaptado de (PROCHAZKA, 2016)

Durante o processo de espalhamento da luz, o fóton é excitado até um estado denominado estado virtual. Este estado virtual é um estado eletrônico não permitido, que é formado pela combinação de estados vibracionais da molécula e da radiação resultante da perturbação na função de onda eletrônica da molécula. Esse

fenômeno ocorre em um curto intervalo de tempo, porém suficiente para que o fóton perca a sua identidade e se torne indistinguível das energias cinéticas e potenciais dos elétrons perturbados, ou seja, retornando com uma energia diferente da energia emitida (PROCHAZKA, 2016; SCHLÜCKER, 2014).

Esse efeito está diretamente relacionado com a transição entre os níveis de energia vibracionais do mesmo estado eletrônico da molécula, que geralmente é o estado fundamental. Como exibido na FIGURA 2, ω_{inc} e ω_{vib} representam as frequências incidentes e vibracionais, respectivamente. A variação de estados vibracionais pode ser caracterizada pelas mudanças vibracionais das ligações químicas presentes na molécula analisada. Desta forma, esta técnica desempenha papel fundamental na identificação de substâncias, na caracterização de materiais, na análise de compostos orgânicos e inorgânicos, dentre outros (PANG; YANG; HE, 2016; SCHLÜCKER, 2014).

Uma das vantagens da espectroscopia Raman é que ela pode ser realizada diretamente em amostras sólidas, líquidas e gasosas, sem necessidade de preparo de amostras. Além disso, o Raman é uma técnica não-destrutiva, na qual a amostra não é alterada ou danificada durante a análise (SHARMA et al., 2024; YASEEN; SUN; CHENG, 2017).

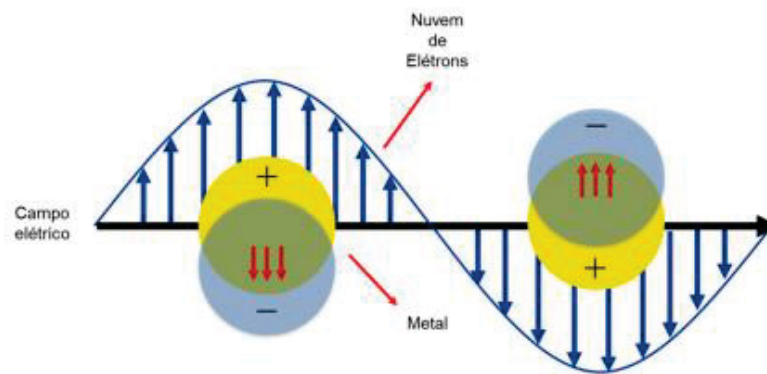
Apesar das vantagens, a espectroscopia Raman possui algumas desvantagens, tais como a baixa intensidade de sinal em comparação com outras técnicas de espectroscopia, devido à baixa seção de choques inelásticos fazendo com que a técnica seja ineficiente para detecção de espécies em sistemas muito diluídos, além da presença de fenômenos de fluorescência, que pode sobrepor o sinal do Raman, dificultando assim a sua análise (RODRIGUES; GALZERANI, 2012). Dessa forma, uma das possibilidades para contornar essas desvantagens, uma excelente alternativa seria a espectroscopia Raman amplificada por superfície, conhecido como efeito SERS.

1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE (SERS)

Na década de 70, o efeito SERS foi descoberto por Fleischmann e colaboradores, cujo estudo relatava o aumento do sinal Raman para a piridina adsorvida em eletrodo rugoso de prata (FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974). Com isso, através de estudos posteriores, verificou-se que o efeito SERS (do

inglês *Surface Enhancement Raman Scattering*) é a intensificação do espalhamento Raman oriundo da interação entre metais – principalmente nanopartículas (NPs) metálicas de prata, ouro e cobre – com radiação eletromagnética. Essa interação resulta na LSPR (do inglês: *Localized Surface Plasmon Resonance*) ao qual são levados em consideração tanto a interação da matéria com a luz quanto a interação da luz e as nanoestruturas metálicas criando um campo eletromagnético localizado que amplifica a quantidade de fótons espalhados pela radiação incidente (MAIER, 2007), conforme FIGURA 3.

FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO EFEITO DE RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE LOCALIZADA (LSPR) EM NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.



Fonte: Adaptado de (RODRIGUES; GALZERANI, 2012).

No efeito SERS, a intensificação do sinal Raman ocorre em uma escala de 10^4 a 10^7 vezes maior em comparação ao sinal Raman sem a presença das nanopartículas (HAYNES; MCFARLAND; VAN DUYN, 2005). A efetividade do substrato pode ser mensurada através de uma propriedade denominada *Enhancement Factor* (EF), do inglês Fator de Intensificação, que é a razão entre a intensidade do sinal SERS do analito (I_{SERS}) e a intensidade do sinal Raman sem o substrato (I_{RS}), como mostrado na equação 1.

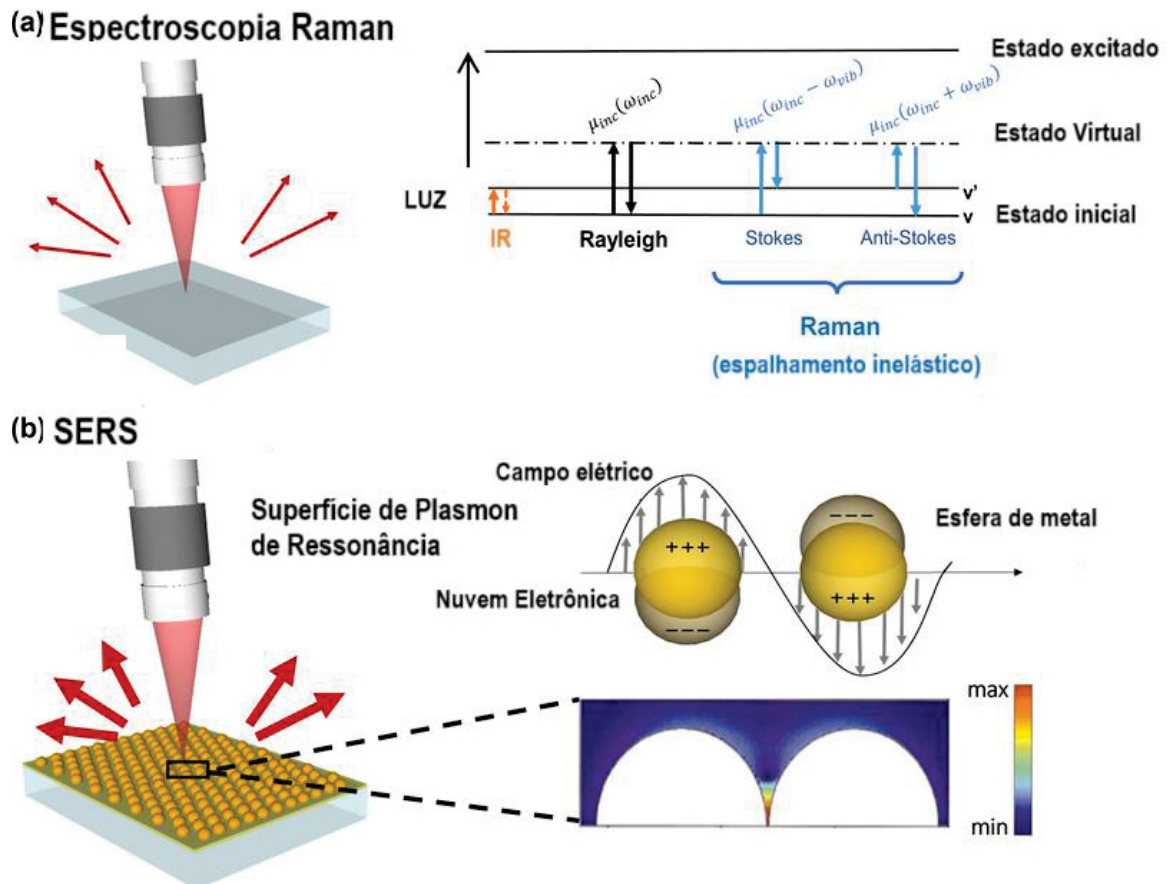
$$EF = \frac{I_{\text{SERS}}/N_{\text{SERS}}}{I_{\text{RS}}/N_{\text{RS}}} \text{ (equação 1)}$$

Para que ocorra o aumento do sinal, é fundamental que o analito esteja entre duas ou mais nanopartículas, em uma região chamada *hot-spot* (HAN et al., 2022). A FIGURA 4 mostra como se dá o efeito SERS de forma didática. Na FIGURA 4 (a) está o esquema de representação da Espectroscopia Raman e o diagrama de energia representado. Da esquerda para a direita, têm-se a absorção na região do

infravermelho (IR), o espalhamento elástico Rayleigh e o espalhamento Raman inelástico Anti-Stokes (esquerda) e Stokes (direita), com ω_{inc} , $\omega_{inc} \pm \omega_{vib}$ e ω_{vib} referindo-se às frequências da luz incidente, da luz espalhada Raman e da vibração molecular, respectivamente.

Além disso, μ_{inc} refere-se ao momento de dipolo induzido, que por sua vez é o produto da polarizabilidade Raman α , e da magnitude do campo eletromagnético incidente E . Na FIGURA 4 (b), temos a representação do SERS e do efeito LSPR, que consiste na oscilação coletiva dos elétrons de condução em uma nanopartícula metálica em ressonância com a frequência da luz incidente, no inferior (gráfico em cores) está a representação do perfil de intensidade do campo elétrico no espaço entre duas nanoesferas, separados por alguns nanômetros. O campo eletromagnético, intensificado pela oscilação coletiva das nanopartículas, possibilita que uma maior quantidade de fótons espalhados sofra a alteração de energia e, portanto, amplifiquem o sinal Raman. Mais detalhe do mecanismo de amplificação do sinal será explicado em seguida.

FIGURA 4 – FENÔMENO RAMAN E EFEITO SERS.



Fonte: Adaptado de (PROCHAZKA, 2016; SCHLÜCKER, 2014)

O efeito SERS é baseado em duas teorias. Uma que foi desenvolvida por Jeanmarie e Van Dunye e outra que foi desenvolvida por Albrecht e Creighton, ambos em 1977, e que buscam justificar o aumento do sinal Raman: o mecanismo molecular (ou químico) e o mecanismo eletromagnético.

O mecanismo molecular (ou químico) destaca que o aumento do sinal Raman ocorre devido à alteração na estrutura eletrônica do analito adsorvido na superfície do metal após a transferência de carga entre o analito e o metal (JEANMAIRE; VAN DUYNE, 1977). Já o mecanismo eletromagnético destaca o efeito eletromagnético gerado pelo aumento do campo elétrico na superfície do metal que é proveniente da interação entre a estrutura metálica e o analito (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977).

Apesar de ambas as teorias, estudos recentes sugerem que o efeito eletromagnético é o que oferece o aumento mais significativo na intensidade do sinal Raman em comparação com o efeito químico (SCHATZ; VAN DUYNE, 2001). Isso ocorre devido ao campo elétrico da radiação eletromagnética que induz a oscilação de elétrons da camada de valência da superfície metálica, com o efeito LSPR, ilustrado na FIGURA 3. A LSPR provoca um intenso campo eletromagnético que acarreta em um momento de dipolo induzido na superfície do metal. Esse momento de dipolo, por sua vez, gera um aumento na polarizabilidade do analito, permitindo um maior aumento de fótons espalhados com alterações em sua frequência, em outras palavras, aumenta a quantidade de fótons pelo espalhamento Raman (MAIER, 2007; SCHLÜCKER, 2014).

A frequência de oscilação na LSPR depende de vários fatores, sendo os valores de constantes dielétricas tanto para o metal quanto para o meio reacional um parâmetro importante para o aumento da intensidade do campo elétrico na superfície metálica, bem como para aumentar a intensidade do sinal Raman. Além disso, alguns estudos relatam que o tamanho e o formato das nanopartículas que devem ser entre 10 e 100 nm e preferencialmente cilíndrico (AROCA, 2006; SCHLÜCKER, 2014).

O efeito químico no SERS depende da interação entre a molécula e a superfície metálica, para que ocorra a transferência de carga entre a molécula e as nanopartículas metálicas, sendo influenciado pela polarizabilidade da molécula

(OTTO, 2005). Em moléculas que possuem ligações do tipo sigma e pi, as ligações induzem uma redistribuição significativa da densidade de elétrons na molécula levando a grandes mudanças na polarizabilidade (OSAWA et al., 1994). Essa mudança intensifica o espalhamento Raman, aumentando o sinal e facilitando a detecção da molécula adsorvida. Em interações mais fracas, como as forças de Van der Waals, a presença do efeito é menos intensa do que ligações fortes pelo fato de as forças de Van der Waals induzirem apenas pequenas perturbações na densidade de elétrons da molécula. Em contrapartida, quando uma interação forte, como uma ligação química, há um maior aumento na polarizabilidade da molécula e, conseqüentemente, menor aumento no sinal Raman (OSAWA et al., 1994).

O uso da SERS para análise de pesticidas se iniciou com Alak e Vo-Dinh, ao qual obtiveram espectros Raman de 8 organofosforados utilizando microesferas de prata depositadas em superfície de vidro (ALAK; VO-DINH, 1987). No entanto, a aplicação da técnica foi direcionada para testes de solo, em vez de alimentos. Em uma aplicação mais recente, D'Agostino e colaboradores propuseram um método para preparação de chips SERS utilizando nanopartículas de prata ao qual foram utilizados para detecção do fungicida *Thiram* (D'AGOSTINO et al., 2020). Apesar de haver uma recente crescente na quantidade de trabalhos aos quais se utilizaram de nanopartículas para o aumento do sinal Raman de pesticidas, ainda é um desafio a implementação de uma rota de síntese de nanopartículas que seja facilmente implementada, estável e reprodutível, além de baixo custo e que seja ecologicamente correta em comparação com outras abordagens.

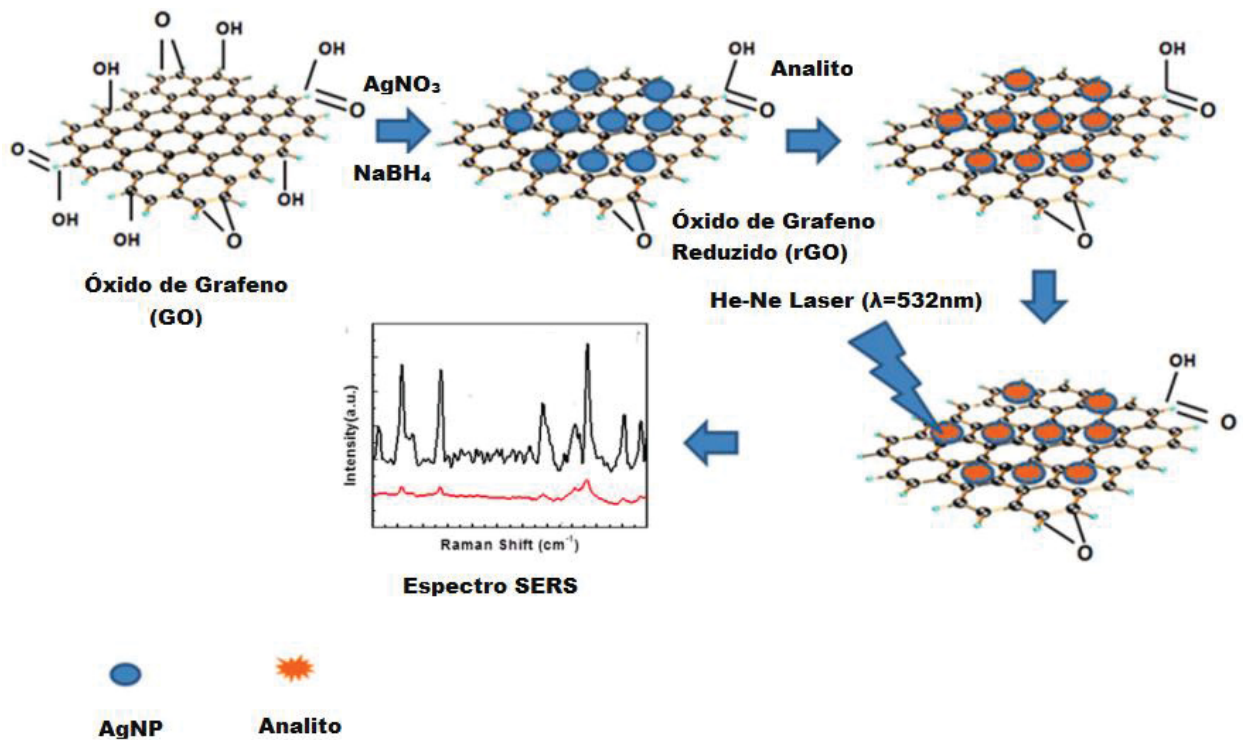
1.3 DERIVADOS DE GRAFENO E SEUS NANOCOMPÓSITOS COM PRATA

O grafeno, que corresponde a uma folha bidimensional de átomos de carbono com hibridização sp^2 , foi testado pela primeira vez em 2010 como substrato para melhorar o sinal do espalhamento Raman, uma vez que a estrutura da interconexão sp^2 da estrutura pura do grafeno e dos seus derivados (óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido(rGO)) fornecem múltiplos sítios de adsorção para as moléculas, principalmente para as moléculas aromáticas. Essa característica é atribuída devido à presença das ligações π conjugadas na estrutura do grafeno, que permite uma interação favorável com moléculas aromáticas por meio das forças de interação π - π (JIANG et al., 2018). Além disso, os grupos

oxigenados presentes tanto na superfície dos derivados de grafeno (rGO e GO) podem ser utilizados como sítios de nucleação que auxiliam no controle do tamanho e da morfologia das nanopartículas (WANG et al., 2010). Essa afinidade entre o grafeno e as moléculas aromáticas é explorada em diversas aplicações, onde a adsorção seletiva de moléculas aromáticas é de interesse, como sensores na detecção de pesticidas (SHARMA et al., 2024; WANG et al., 2021a). Sabendo disso, o grafeno e suas variações são materiais com grande potencial para uma gama de aplicações, incluindo áreas biológicas, eletrônicas e muitas outras (JIANG et al., 2018).

Derivados de grafeno ou de partículas plasmônicas podem ser diretamente colocados em contato com o analito, eliminando, assim, a necessidade de incorporação de materiais ativos em Raman em uma matriz sólida. Materiais do tipo G-SERS (em inglês *Graphene-Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) feitos a partir de GO e nanopartículas metálicas, têm sido recentemente projetados visando aprimorar mais a eficiência de substratos para SERS (JIANG et al., 2018). Esses substratos foram relatados na literatura onde o GO é modificado com nanopartículas, tanto de prata como de ouro, em sua superfície, conforme ilustrado na FIGURA 5.

FIGURA 5 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PREPARO DO COMPÓSITO rGO/AgNPs PARA DETECÇÃO DE MOLÉCULAS ALVO.



Fonte: Adaptado de (JIANG et al., 2018).

Entre os derivados de grafeno, tanto o GO quanto o rGO são amplamente utilizados como substrato potenciais para aplicação em SERS, onde as folhas de grafeno têm sido empregadas como suporte robusto para dispersar e estabilizar nanopartículas (LU et al., 2011; XU et al., 2013). Desse modo, o Grupo de Química de Materiais da UFPR (GQM-UFPR) descreveu uma rota para obtenção de compósitos com base em rGO/AgNPs na forma de filmes finos, em uma única etapa de síntese através do método interfacial líquido-líquido (LLIR) (do inglês *Liquid-liquid Interfacial Route*) (MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015; ZARBIN, 2021), permitindo a sua deposição em diferentes substratos tais como vidro, Si/SiO₂, quartzo e, até mesmo, diretamente em cascas de frutas.

No método LLIR, a auto-organização espontânea do nanomaterial na interface resulta de um equilíbrio entre repulsões causadas pelo confinamento do material e a busca por um arranjo que maximize a estabilidade do sistema, como consta em diversos trabalhos do grupo (ZARBIN, 2021). O filme resultante de nanopartículas sobre as superfícies das folhas de GO apresenta flexibilidade, bem como a capacidade de formar suspensões estáveis em dispersão e também podem ser processados em filmes macroscópicos. Essas propriedades tornam esses materiais interessantes para a fabricação de substratos SERS altamente eficientes e versáteis.

O uso de nanopartículas ancoradas em materiais de grafeno para uso analítico do SERS tem baseados em SERS tem crescido nos últimos anos (PANG; YANG; HE, 2016; WANG et al., 2021a). Em uma dessas aplicações, Ma e colaboradores sintetizaram AgNPs combinado com óxido de grafeno para a detecção do pesticida *Thiram*, cujo composto é amplamente utilizado na agricultura para proteger as plantas contra doenças causadas por fungos. Foi observado que o filme preparado exibiu uma alta capacidade intensificação SERS devido às interações π - π e eletrostáticas do GO com as moléculas do pesticida. Os pesquisadores conseguiram quantificar o pesticida com um baixo limite de detecção de 0,26 ng/cm², valor que é inferior aos limites máximos de resíduos de pesticidas em frutas prescritos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (MA et al., 2018).

Em outro trabalho do GQM-UFPR, Fonsaca e colaboradores sintetizaram filme fino rGO/AgNPs funcionalizado para a detecção de 4-ATP e os autores verificaram um grande potencial para atividade catalítica para degradação do pesticida Paraoxon e como sensor para nitrofenóis (FONSACA et al., 2017).

Seguindo essa mesma linha, Kubackova e colaboradores conseguiram detectar pesticidas organoclorados otimizando substratos, com diferentes tipos de metais (Ag e Au), com diferentes tipos de funcionalização das nanopartículas e com diferentes energias de excitação do laser para SERS, conseguindo detectar concentrações de 10^{-8} mol L⁻¹ de pesticidas (KUBACKOVA et al., 2015).

1.4 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

A eficiência dos processos químicos pode ser aumentada através da otimização das variáveis que os afetam. Isso é frequentemente realizado por meio de experimentos de separação, que identificam quais os fatores significativos de maior impacto sobre a resposta experimental. Dessa forma, a síntese de filmes finos baseados em óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de prata (rGO/AgNPs) para SERS é influenciada por uma série de parâmetros durante o processo de preparação, incluindo a concentração dos reagentes, os tempos de síntese, entre outros fatores. O objetivo ao realizar os experimentos é verificar a função que descreve o sistema ou obter uma aproximação que seja adequada de modo a selecionar as melhores condições de operação do sistema. Nesse contexto, a utilização de planejamento de experimentos se mostra uma abordagem interessante para avaliar a significância das variáveis envolvidas e compreender os fenômenos subjacentes a síntese. Para considerar a interação entre os fatores, são utilizados planejamentos multivariados, como o fatorial fracionado, o composto central, o Box-Behnken e outros. Nesses planejamentos, os fatores são variados simultaneamente, permitindo a investigação das interações entre os parâmetros que influenciam nas respostas.

1.4.1 Planejamento Fatorial Fracionado de Experimentos

Ao conduzir um experimento bem planejado, empregando as técnicas como planejamento fatorial fracionado de experimentos, é possível reduzir o tempo de

produção, os custos operacionais e as variações, enquanto se aumenta o rendimento e, por conseguinte, a eficácia do processo. Esse tipo de planejamento envolve a realização deliberada de alterações nos diversos parâmetros da síntese, visando avaliar seu impacto no resultado final. Tal abordagem oferece diversas vantagens, incluindo a redução no número de experimentos necessários, a capacidade de investigar interações entre variáveis distintas e a confiabilidade dos resultados obtidos (JAMSHIDNEZHAD, 2015; LIU, 2020; OTTO, 2016).

Adicionalmente, o planejamento fracionado de experimentos possibilita determinar o impacto de cada variável no resultado global, permitindo o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevam as respostas desejadas com uma quantidade mínima de experimentos. Isso resulta em uma eficiência aprimorada do processo experimental, economia de recursos e conclusões científicas mais robustas. No entanto, ao realizar o planejamento fatorial fracionário, é possível que alguns efeitos se confundam. Portanto, é essencial garantir que os efeitos de primeira ordem (efeitos dos parâmetros isolados) não se confundam com o efeito de ordem superior (efeitos das interações entre os parâmetros). Os efeitos de primeira ordem referem-se às influências individuais dos parâmetros experimentais sobre a resposta, enquanto os efeitos de ordem superior referem-se às influências combinadas de dois ou mais parâmetros experimentais sobre a resposta, conhecidas como interações. Essa confusão de efeitos no planejamento fatorial fracionário é denominada resolução. A resolução de um planejamento fatorial fracionário é uma medida da capacidade do experimento de distinguir entre os efeitos de diferentes fatores e suas interações. Planejamentos com maiores resoluções são preferíveis porque minimizam as confusões entre os efeitos principais e as interações. A FIGURA 6 mostra quais são as resoluções, que determina a estimativa dos efeitos dos fatores e a quantidade de experimentos possíveis.

FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DOS FATORES DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO DE EXPERIMENTOS COM AS RESOLUÇÕES.

	Factors													
Runs	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
4	Full	III												
8		Full	IV	III	III	III								
16			Full	V	IV	IV	IV	III	III	III	III	III	III	III
32				Full	VI	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
64					Full	VII	V	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV
128						Full	VIII	VI	V	V	IV	IV	IV	IV

Legenda: *Factors* (do inglês: Fatores): Quantidade de variáveis estudadas; *Runs* (do inglês: corridas): Quantidade de experimentos.

Fonte: Adaptado de (ONOKWAI et al., 2022)

As resoluções dos planejamentos são:

- Resolução III: Nenhum efeito principal (efeito de primeira ordem) é confundido com outro efeito principal. No entanto, os efeitos principais podem estar confundidos com interações de dois fatores. Esse tipo de planejamento é útil quando a prioridade é entender os efeitos principais, mesmo que algumas interações possam estar combinadas.
- Resolução IV: Os efeitos principais (efeitos de primeira ordem) não se confundem com interação de dois fatores, mas as interações de dois fatores podem estar confundidas entre si. Esse planejamento fornece uma separação mais clara entre os efeitos principais e as interações, sendo útil quando tanto os efeitos principais quanto algumas interações precisam ser estudados e compreendidos.
- Resolução V: Nenhum efeito principal ou interação de dois fatores está confundido com outro efeito principal ou interação de dois fatores. No entanto, as interações de dois fatores podem estar confundidas com interações de três fatores. Esse nível de resolução permite uma análise detalhada tanto dos efeitos principais quanto das interações de dois fatores, sendo ideal para estudos complexos onde a precisão na identificação dos efeitos é de suma importância.

Ao mapear os resultados das combinações de cada fatores, cria-se uma superfície que mostra como a resposta do experimento muda em relação as variáveis. O

gráfico plotado desses resultados é denominado superfície de resposta (BRUNS, 2005).

Nesse contexto, as superfícies de respostas desempenham um papel de suma importância na otimização de processos e na construção de modelos matemáticos quando a relação exata entre os fatores envolvidos não é plenamente compreendida. Além disso, as superfícies de respostas oferecem uma abordagem sistemática para determinar as condições ideais de aplicação e síntese de nanopartículas para SERS, permitindo uma compreensão mais profunda dos níveis e dos fatores de interesse.

Para o emprego efetivo da superfície de resposta, é necessário realizar planejamentos tais como o Box-Behnken, Composto Central, dentre outros (JAMSHIDNEZHAD, 2015; OTTO, 2016). Esses métodos fornecem um meio eficiente para otimizar a produção de substratos SERS destinados a detecção de substâncias de interesse, como no caso deste estudo, o foco será na detecção de pesticidas.

1.4.2 Planejamento Box-Behnken

O planejamento Box-Behnken é uma classe de experimentos de segunda ordem baseados em planejamentos fatoriais fracionados de três níveis, nos quais os cada ensaio do planejamento é distribuído equidistante em relação ao ponto central. O planejamento Box-Behnken produz 13 ensaios para avaliar 3 variáveis, gerando 10 coeficientes. Além disso, o Box-Behnken não possui combinações onde todos os fatores estejam ao mesmo tempo em níveis altos ou baixos, sendo úteis para evitar experimentos em condições extremas (BRUNS, 2005; OTTO, 2016).

A aplicação do planejamento Box-Behnken para otimização de sínteses de nanopartículas em SERS tem sido explorada nos últimos anos. Em exemplos práticos, Sallum e colaboradores sintetizaram nanopartículas de prata em filtro de papel e otimizaram o processo para aumentar a intensidade da resposta SERS utilizando um planejamento fatorial de experimentos. Este método foi aplicado com sucesso para determinar e quantificar nicotinamida em amostras comerciais com um aumento em 20 mil vezes na intensidade do sinal SERS (SALLUM et al., 2014a). Em outro trabalho, Sallum e colaboradores propuseram a utilização de substrato AgNPs em filtro de papel otimizado com planejamento fatorial de experimentos para a

quantificação de ácido acetilsalicílico em amostras comerciais em baixas concentrações e, posteriormente, compararam com HPLC (método padrão) ao qual obtiveram erro relativo de 2,06% comparado com o método de referência (SALLUM et al., 2014b).

Da mesma forma, Junior e colaboradores propuseram a quantificação simultânea de tiamina, nicotinamida e riboflavina em amostras farmacêuticas através de SERS com AuNPs coloidais, utilizando um planejamento fatorial de experimentos com ponto central para otimização dos parâmetros SERS (JUNIOR et al., 2018).

Em outro exemplo, Berge e colaboradores propuseram um estudo sobre a interação entre noradrenalina e AuNPs e as agregações das AuNPs para obtenção de maior intensificação do sinal SERS. Neste trabalho, foi avaliado os parâmetros de agregação (natureza, tamanho e concentração de nanopartículas) para a otimização do sinal. Dessa forma, foi feito um planejamento Box-Behnken para limitar o número de experimentos utilizando os 3 principais fatores de otimização, fixando outros dois fatores (BERGE et al., 2022).

É evidente que a técnica SERS está ganhando destaque no estudo da qualidade e segurança alimentar, especialmente no que diz respeito à detecção de pesticidas devido à sua capacidade de detectar esses produtos em baixas concentrações, além da sua seletividade e baixos limites de quantificação (PANG; YANG; HE, 2016).

Portanto, os exemplos de trabalhos mencionados anteriormente demonstram que a modificação multivariada dos parâmetros de síntese de nanopartículas pode resultar na obtenção de substratos SERS capazes de detectar moléculas em baixas concentrações possibilitando respostas mais eficientes com menos recursos e este trabalho surge como uma abordagem multivariada na síntese de nanopartículas para o aumento da intensidade do sinal para a detecção de pesticidas por SERS.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho consiste em otimizar as condições de síntese de um substrato para espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS) em filmes finos de óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de prata (rGO/AgNPs) para detectar pesticidas em cascas de frutas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Sintetizar o filme rGO/AgNPs como substrato para aplicação da SERS;
- ii. Otimizar as condições de síntese por planejamento fatorial de experimentos e por planejamento Box-Behnken em uma molécula-sonda;
- iii. Testar a técnica analítica com pesticidas que contenham átomos em comum com o da molécula-sonda;
- iv. Desenvolver modelos quimiométricos para a detecção dos pesticidas;
- v. Analisar amostras reais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados neste trabalho apresentam pureza analítica. Para a produção do óxido de grafite (Gr-O), foram utilizados os seguintes reagentes: pó de grafite (Graflake, 99,84% - Nacional Grafite), permanganato de potássio (KMnO_4 , 99%, synth), ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 98%, Anidrol), ácido clorídrico (HCl , 37%, Panreac), nitrato de sódio (NaNO_3 , 99,0%, Vetec), solução aquosa de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30% m/m, Vetec). A água deionizada foi fornecida por um sistema de purificação Millipore (Milli-Q) com resistência igual ou menor do que 18,2 $\text{M}\Omega$ cm.

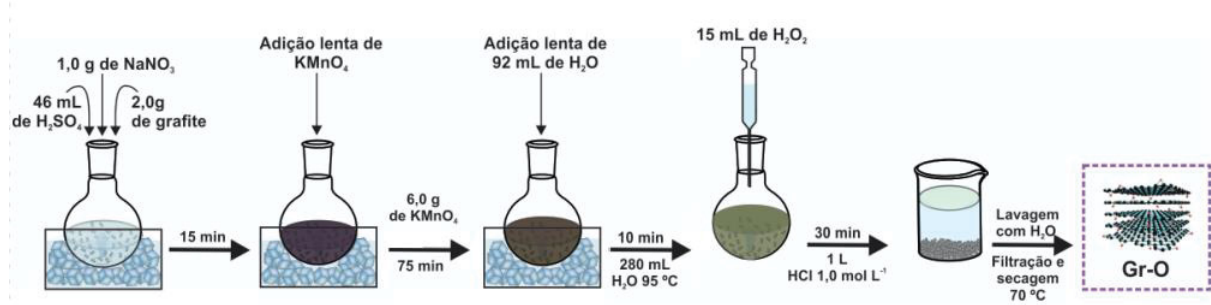
Para a produção do filme rGO/AgNPs foram necessários os seguintes reagentes: nitrato de prata (AgNO_3 , 99,9%, Vetec), borohidreto de sódio (NaBH_4 , 98%, Acros Organic), tolueno (99,9%, Sigma Aldrich) e suspensão aquosa de GO obtida pela esfoliação do Gr-O.

Os pesticidas utilizados neste trabalho são: Simazine (98%, Sigma Aldrich), Atrazina (98%, Sigma Aldrich), Carbaril (98%, Sigma Aldrich), Ametrim (98%, Sigma Aldrich), Carbendazim (97%, Supelco) e Tiabendazol (99%, Supelco).

3.1 SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFITE E PREPARO DA DISPERSÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO

O óxido de grafite (Gr-O) foi preparado pelo método Hummers modificado (HUMMERS; OFFEMAN, 1958). Em um balão de fundo redondo de 500 mL, foi adicionado 46 mL de H_2SO_4 , 2,0 g de pó de grafite, 1,0 g de NaNO_3 em um banho de gelo a 0°C sob agitação magnética durante 15 minutos. Em seguida, foi adicionado lentamente (de 30 em 30 segundos, para evitar o aumento brusco da temperatura do sistema) 6,0 g de KMnO_4 , onde o sistema permaneceu sob agitação por mais 75 minutos. Posteriormente, foi adicionado 92 mL de água quente deionizada e adicionado cuidadosamente 10 mL de solução de H_2O_2 30% m/m. O sobrenadante foi filtrado e lavado com 1,0 L de solução de HCl 10% para a remoção dos íons sulfato até o pH próximo de 7, conforme a FIGURA 7. O produto foi seco em estufa a 70°C por 24 horas (MEHL et al., 2014; SOUZA et al., 2016).

FIGURA 7 - ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DA SÍNTESE DO ÓXIDO DE GRAFITE



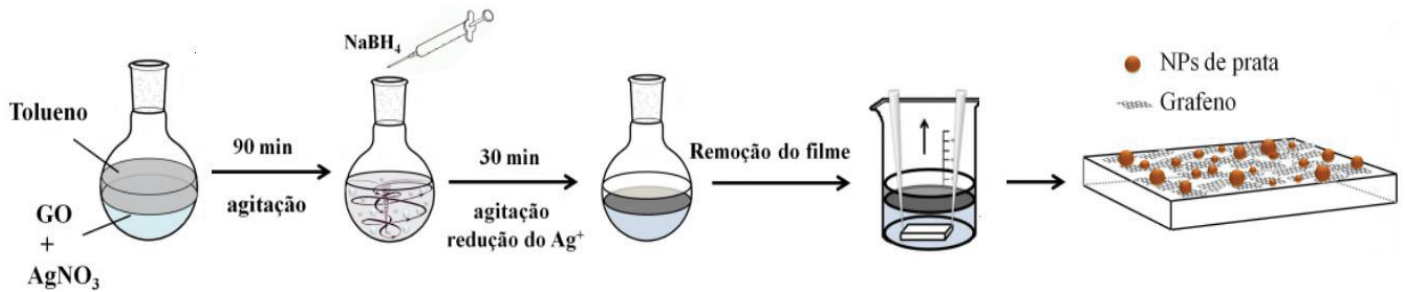
Fonte: Adaptado de (MEHL et al., 2014).

Após a secagem, o material foi disperso em água Milli-Q (1 mg mL^{-1}) usando um frasco âmbar de 100 mL sob agitação ultrassônica (Unique USC 1880, 37 kHz e 154 W) durante 90 minutos. O óxido de grafeno (GO) foi disperso e a solução resultante foi centrifugada a 3000 RPM durante 90 minutos, sendo o sólido precipitado descartado. Após esse período, obteve-se uma dispersão de coloração marrom, característica desse material (MEHL et al., 2014; SOUZA et al., 2016).

3.2 SÍNTESE DO FILME COMPÓSITO ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR INTERFACE LÍQUIDO-LÍQUIDO

O compósito sintetizado para o planejamento de experimentos foi o filme de óxido de grafeno reduzido (rGO) e nanopartículas de prata (AgNPs) através da rota interfacial líquido-líquido (LLIR), que foi executado com base na metodologia descrita por (MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015). Em um balão de fundo redondo de 50 mL foram transferidos 30 mL da suspensão aquosa de GO ($0,02 \text{ mg mL}^{-1}$) com 3,0 mg de AgNO_3 . No mesmo balão, foi transferido 20 mL de tolueno e deixado sob agitação de 1500 RPM durante 90 minutos. Após esse período, foi adicionado 120 mg de NaBH_4 dissolvida em 5 mL de água deionizada na reação com adição rápida, ainda sob agitação, por mais 30 minutos, para que ocorresse a redução concomitante do GO e dos íons Ag^+ . Após o término da reação, foi observado a formação de um filme cinza escuro na interface água-tolueno, conforme ilustração na FIGURA 8. Essas condições de síntese foram definidas como as condições de ponto central para o planejamento fatorial fracionário.

FIGURA 8 - ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DO FILME DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO E SUA POSTERIOR DEPOSIÇÃO EM SUBSTRATO DE VIDRO.



Fonte: Adaptado de (MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015)

Após o término da síntese, foi feita a limpeza das fases aquosa e orgânicas adicionando e retirando pequenas porções de água e tolueno. Para que o filme pudesse ser removido e depositado em um substrato desejado (quartzo para a caracterização por UV-Vis, Si/SiO₂ para a caracterização em MEV e vidro para análise em Raman) foi utilizado o método interfacial, cuja metodologia é difundida pelo Grupo de Química de Materiais (GQM) da UFPR.

3.3 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Foram realizados dois planejamentos de experimentos modificando de forma multivariada a condição de ponto central da síntese do filme compósito rGO/AgNPs, um planejamento fatorial fracionário e um planejamento do tipo Box-Behnken. No planejamento fatorial fracionário, foram avaliadas 6 variáveis, aos quais os parâmetros estudados do planejamento foram: a concentração de GO ([GO] %), a massa de AgNO₃ adicionada (mAgNO₃), a massa de NaBH₄ adicionada (mNaBH₄), a velocidade de rotação por minuto (RPM), o tempo de dispersão (t₁), o tempo de redução (t₂). As variáveis t₂ e RPM têm a seguinte função geradora: t₂: I=1234 e RPM: I=234, respectivamente. Este planejamento foi designado como 2⁶⁻²_{IV} porque os parâmetros foram ajustados em dois níveis, sendo eles alto (+1) e baixo (-1), e duas variáveis consideradas menos significativas foram combinadas a partir das variáveis restantes, consideradas mais significativas. Além disso, este planejamento tem resolução IV, o que significa que nenhum efeito principal está sendo confundido com outro efeito principal ou qualquer interação de segunda ordem, mas as interações de segunda ordem estão associadas entre si. Na TABELA 1 e 2, são

mostrados os valores codificados de maior nível, menor nível e ponto central, do planejamento fatorial fracionário e a condição de cada experimento realizado.

TABELA 1 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO DO TIPO 2^{6-2}_{IV} COM OS VALORES DE NÍVEL MÁXIMO (+1), DE NÍVEL MÍNIMO (-1) E O PONTO CENTRAL (0).

Níveis Codificados	X1	X2	X3	X4	X1X2X3X4	X2X3X4
+1	0.03	5	150	45	2000	120
0	0.02	3	120	30	1500	90
-1	0.01	1	90	15	1000	60

LEGENDA: X1: [GO] (%); X2: massa de AgNO_3 (mg); X3: massa de NaBH_4 (mg); X4: t2 (min); X1X2X3X4: rotação (RPM); X2X3X4: t1 (min).

Fonte: O autor (2024)

TABELA 2 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X1X2X3X4	X2X3X4
PC 1	0	0	0	0	0	0
PC 2	0	0	0	0	0	0
PC 3	0	0	0	0	0	0
1	-1	-1	-1	-1	+1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1	+1	+1
5	-1	-1	+1	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1	-1	+1	+1
7	-1	+1	+1	-1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1

LEGENDA: PC: Ponto Central; X1: [GO] (%); X2: m AgNO_3 (mg); X3: m NaBH_4 (mg); X4: t2 (min); X1X2X3X4: rotação (RPM); X2X3X4: t1 (min).

Fonte: O autor (2024)

Para minimizar a variabilidade de sinal SERS na superfície do filme fino rGO/AgNPs, foram coletados 10 espectros de três filmes por cada experimento. A média da variação da altura na intensidade da banda do analito foi utilizada como resposta do planejamento.

As 3 variáveis de maiores significâncias foram utilizadas para fazer a otimização do planejamento Box-Behnken. De acordo com o resultado do

planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{6-2}_{IV} , as variáveis são: massa de AgNO_3 , rotação e tempo de dispersão (t1). As variáveis: Tempo de redução (t2) e $m(\text{NaBH}_4)$ foram fixadas no nível +1 do planejamento fatorial fracionário e a variável [GO] foi fixada ao nível -1 do planejamento fatorial fracionário, de acordo com os coeficientes determinados por cada fator durante o planejamento experimental. As condições experimentais das amostras que tiveram as maiores respostas SERS foram utilizados como ponto central do novo planejamento.

Os parâmetros de cada nível do planejamento Box-Behnken estão na TABELA 3. Os níveis fixos dos fatores foram obtidos das amostras com as melhores respostas e estão representados na TABELA 4. A TABELA 5 são mostrados os valores codificados de cada nível do planejamento Box-Behnken.

TABELA 3 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN

Níveis Codificados	$m(\text{AgNO}_3)$ (mg)	Tempo de Dispersão (min)	Velocidade de Rotação (rpm)
+1	7	75	1500
0	5	60	1000
-1	3	45	500

Fonte: O autor (2024)

TABELA 4 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS FIXAS DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN

Variáveis	Níveis fixados
[GO] (%)	0.01
$m\text{NaBH}_4$ (mg)	150
Tempo de Redução (min)	45

Fonte: O autor (2024)

TABELA 5 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN.

Ensaios	X2	X1X2X3X4	X2X3X4
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	1
8	1	0	-1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1

Ensaio	X2	X1X2X3X4	X2X3X4
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

LEGENDA: X2: m(AgNO₃) (mg); X1X2X3X4: rotação (rpm); X2X3X4: t1 (min).
Fonte: O autor (2024)

3.4 LIMPEZA DOS SUBSTRATOS E DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS

Antes da deposição dos filmes, os substratos (vidro, placas de Si/SiO₂ e as placas de quartzo) passaram por um processo de limpeza com base na metodologia utilizada pelo Grupo de Química de Materiais (GQM) da UFPR, sendo divididos em algumas etapas:

1. As placas de vidro, Si/SiO₂ e quartzo foram colocadas em um béquer contendo água deionizada e sabão, sendo levadas ao banho ultrassom por 15 minutos.
2. Após esse tempo, as placas foram lavadas com água deionizada para retirada do sabão e colocados novamente em um béquer contendo apenas água deionizada, sendo levados ao banho ultrassom por mais 15 minutos.
3. Todos os substratos foram colocados em um béquer com isopropanol e levados ao ultrassom por mais 15 minutos.
4. Finalmente, os substratos foram secos em estufa a 100°C por 1 hora.

As cascas de alimentos passaram por um processo de limpeza que foi dividida em algumas etapas, seguindo a metodologia empregada em artigos na literatura (MA et al., 2018; PANG; YANG; HE, 2016; SHARMA et al., 2024; WANG et al., 2021b):

1. As frutas e legumes foram lavadas em água potável corrente por 2 minutos para remover sujeira e impurezas superficiais.
2. Em seguida, as frutas e legumes foram imersos em um banho ultrassom com água deionizada por 15 minutos.

3. Após isso, os alimentos foram enxaguados com álcool etílico 70% por 30 segundo e enxaguada novamente com água deionizada por 1 minuto para remover os resíduos de álcool.
4. Os alimentos foram cuidadosamente cortados com uma faca, que foi previamente limpa com água deionizada e álcool etílico para evitar contaminação da amostra. As cascas foram cortadas em pedaços quadrados de 1 cm x 1 cm para padronização de tamanho.
5. Após isso, as cascas foram secas em um dessecador por 24 horas.

3.5 MEDIDAS DE SERS

Uma solução aquosa de 4-aminotiofenol (4-ATP) foi usada como molécula sonda para determinar a variabilidade da intensidade SERS nos filmes rGO/AgNPs. Para isso, o sistema água/filme/tolueno foi transferido a um béquer de 50 mL contendo o substrato desejado (quartzo, Si/SiO₂ ou vidro) para a deposição do filme. O substrato foi elevado em direção ao filme para deposição. Após isso, os substratos foram secos em estufa a 70°C por 1 hora. Em seguida, 30 µL de solução aquosa de 4-ATP com concentração 10⁻³ mol L⁻¹ foram gotejados nos substratos e secas em dessecador por 24 horas. Posteriormente, espectros Raman foram coletados sobre a área de deposição da solução. Os substratos de vidro possuem dimensão de 1 x 1 cm.

Para demonstrar a aplicabilidade do substrato rGO/AgNPs otimizado na análise de pesticidas, uma solução alcoólica de ametrina com concentração de 10⁻³ mol L⁻¹ foi gotejada no filme e secas ao ar em temperatura ambiente por 1 hora e analisadas por espectroscopia Raman. Soluções adicionais de 1,0×10⁻⁴, 1,0×10⁻⁵ e 1,0×10⁻⁷ mol L⁻¹ foram preparadas para testes em cascas de batata e maçã. Um volume de 30 µL da solução alcoólica do pesticida foi depositado por gotejamento nas cascas das amostras e seco ao ar por 1 hora. Posteriormente, o filme rGO/AgNPs foi depositado por *drop-casting* nas cascas e secos em dessecador por 24 horas antes da realização das medidas SERS.

As imagens hiperespectrais foram analisadas usando o software MATLAB versão R2019A com a ferramenta PLS_Toolbox e Imaging Processing toolbox. Os dados foram tratados com diferentes processamentos para a geração de um vetor global por imagem que foram correlacionados com as concentrações do herbicida.

As amostras orgânicas de batata e maçã foram obtidas em um supermercado local.

3.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

Todas as caracterizações foram feitas em amostras sólidas, com exceção dos espectros UV-Vis para as dispersões de GO e rGO em água.

3.6.1 Espectroscopia de absorção na região UV-Vis

Os espectros UV-Vis foram obtidos usando um espectrofotômetro Shimadzu UV-2450, de 200 a 800 nm, que foram obtidos da dispersão de GO, rGO e diretamente dos filmes depositados em quartzo nas mesmas dimensões de uma cubeta convencional, utilizando o ar como referência.

3.6.2 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos em um espectrofotômetro Raman confocal (WITec Alpha 300R) com um laser de 532 nm, potência de 29 mW com 10 acumulações de 10 segundos de tempo de aquisição em várias regiões do filme sobre o vidro. Foram coletados espectros nas cascas das frutas e legumes a 5 mW de potência com 10 acumulações e 0,5 segundos de tempo de aquisição em várias regiões das cascas. O menor tempo foi necessário devido a fluorescência das cascas. A faixa espectral analisada foi de 500 a 3500 cm^{-1} . Para os espectros SERS a faixa analisada foi de 500 a 2500 cm^{-1} .

3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

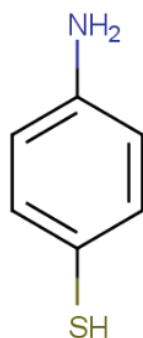
As imagens de MEV foram obtidos utilizando o equipamento MIRA FEG-SEM (Tescan) com voltagem de 15 kV e um detector EDS (Oxford Instruments) para a análise elementar. Os filmes foram depositados em substratos de Si/SiO₂.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL ESPECTROQUÍMICO DO ANALITO-SONDA

Com o objetivo de entender a influência das modificações multivariadas na síntese do compósito rGO/AgNPs sobre a intensidade SERS, foram empregados planejamentos fatoriais fracionários e Box-Behken, utilizando o composto e-aminotiofenol (4-ATP) como sonda, representado na FIGURA 9. A escolha dessa molécula se baseia na ampla utilização de compostos com grupos tióis para SERS devido à sua capacidade de formar ligações estáveis de enxofre com metais (prata, ouro e cobre) e pela forte interação das superfícies metálicas com grupos amino (MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015; UETSUKI et al., 2010; WANG et al., 2006).

FIGURA 9 – ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO 4-AMINOTIOFENOL (4-ATP).



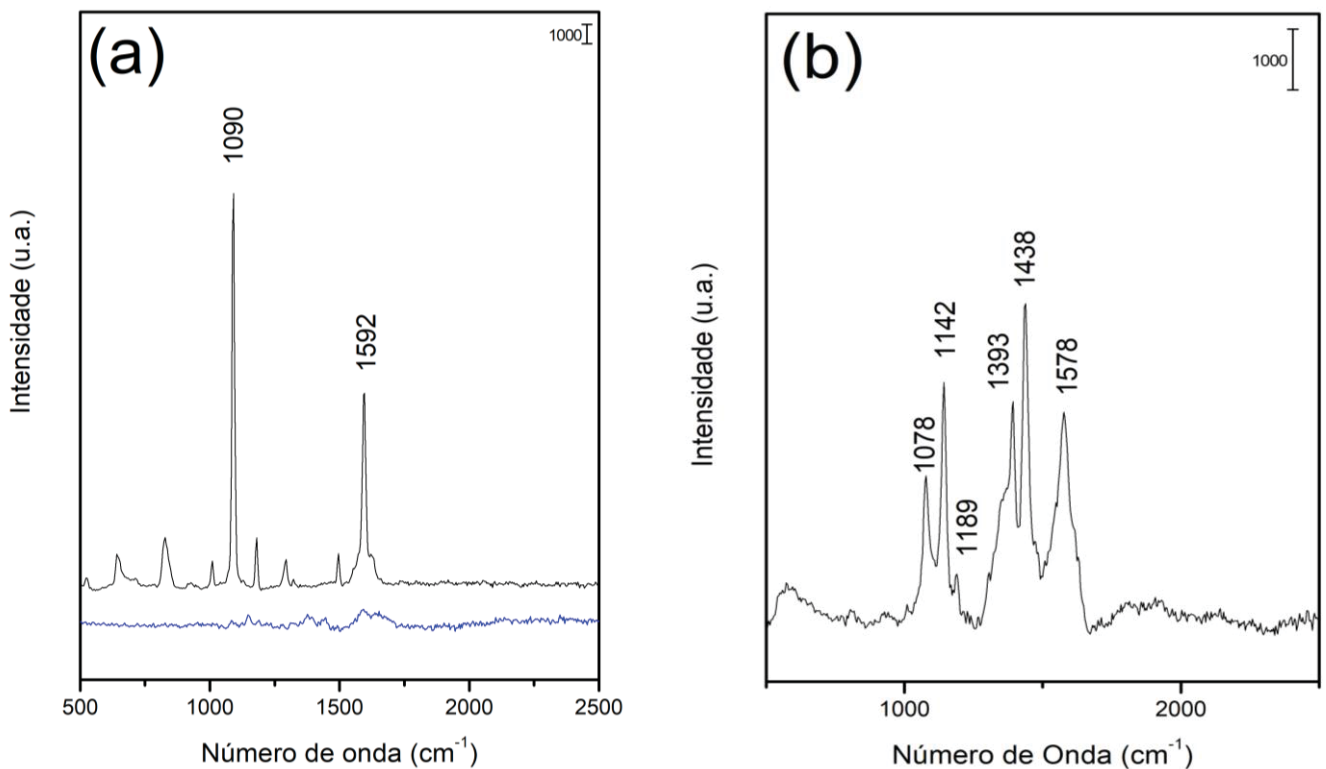
Na FIGURA 10 (a) estão representados os espectros Raman do 4-ATP no estado sólido e a partir da solução aquosa seca antes da análise com concentração $1,0 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ que foi gotejado em substrato de vidro e (b) está representado o espectro Raman do 4-ATP em concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ gotejado no filme rGO/AgNPs na condição de ponto central.

Na FIGURA 10 (a) na linha preta, o espectro Raman do 4-ATP sólido apresenta bandas intensas em 1090 cm^{-1} e 1590 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos de C-S e C-C, respectivamente. Nota-se que o sinal Raman é extremamente baixo e praticamente imperceptível no espectro da solução do 4-ATP, como ilustrado na linha azul na FIGURA 10 (a). A intensificação do sinal é evidente quando o espectro da solução é coletado sobre o substrato rGO/AgNPs, FIGURA 10 (b). Além da amplificação, é possível observar um deslocamento das bandas, em comparação com o sólido, e que houve o aumento da intensidade de outras bandas, sendo elas: em 1078 cm^{-1} referente ao $\nu(\text{C-S})$ que pode sugerir a formação da ligação Ag-S entre os grupos tióis e a superfície das AgNPs (UETSUKI et al., 2010; WANG; HU; DONG, 2006) sendo favorecida ao aumento químico do sinal SERS, além das

bandas 1142 cm^{-1} , 1393 cm^{-1} e 1438 cm^{-1} , referentes aos modos $\nu\text{CC} + \delta\text{CH}$ e $\delta\text{CC} + \nu\text{CH}$, respectivamente (MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015; SUN et al., 2008; UETSUKI et al., 2010; WANG; HU; DONG, 2006).

Todas as atribuições referentes aos espectros descritos estão sumarizadas na TABELA 6 (KIM; CHOI; SHIN, 2014; MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015; ORENDORFF et al., 2006; WANG et al., 2006).

FIGURA 10 – ESPECTRO RAMAN DO 4-ATP (a) NO ESTADO SÓLIDO (LINHA PRETA) E EM SOLUÇÃO AQUOSA $1,0 \times 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$ (LINHA AZUL); (b) EM FILME rGO/AgNPs NA CONDIÇÃO DE PONTO CENTRAL EM LASER VERDE ($\lambda=532\text{ nm}$).



Fonte: O autor (2024)

TABELA 6 – ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS DO 4-ATP PRESENTES NOS ESPECTRO RAMAN.

Sólido 4-ATP	4-ATP $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ no composto rGO/AgNPs (Ponto Central)	Atribuições*
1090	1078	νCS
1120	-	δCH
-	1142	δCH
1173	1189	δCH
1286	-	νCH

1315	-	$\nu_{CC} + \delta_{CH}$
-	1393	$\nu_{CC} + \delta_{CH}$
1420	1438	$\delta_{CC} + \nu_{CH}$
1490	-	$\nu_{CC} + \delta_{CH}$
1592	1578	ν_{CC}
1620	-	δ_{NH}

*Atribuições para os espectros Raman do 4-ATP são denotadas da seguinte forma: ν = estiramento; δ = torção.

Conhecendo bem o espectro do substrato 4-ATP, foi feito o planejamento de experimentos de forma a estudar a intensificação do sinal SERS. A resposta do planejamento fatorial fracionário do tipo 2^{6-2}_{IV} e do planejamento Box-Behnken foi a variação da intensidade da banda em 1420 cm^{-1} do espectro Raman do 4-ATP.

4.2 PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS

A TABELA 7 mostra o valor da intensidade do 4-ATP $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ da banda SERS em 1438 cm^{-1} em cada experimento que foi codificado em cada condição do planejamento. A escolha da banda em 1438 cm^{-1} se dá devido a essa banda estar presente no espectro do 4-ATP gotejado somente no vidro para ser comparada, porém no espectro Raman convencional essa banda está deslocada em 1420 cm^{-1} . Esse deslocamento azul, mais energético (para maiores números de onda) se dá devido a maior interação entre o analito e a superfície do metal. A banda em 1592 cm^{-1} não foi escolhida pois essa sofre alterações de intensidade devido a presença do rGO nos compósitos, uma vez que o grafeno possui uma banda nessa região.

TABELA 7 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO COM AS RESPOSTAS

Ensaio	X1	X2	X3	X4	X1X2X3X4	X2X3X4	Valor Médio da Intensidade Raman (u.a.)
PC 1	0	0	0	0	0	0	1392
PC 2	0	0	0	0	0	0	1034
PC 3	0	0	0	0	0	0	986
1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	1374
2	+1	-1	-1	-1	-1	-1	481
3	-1	+1	-1	-1	-1	+1	1433
4	+1	+1	-1	-1	+1	+1	965

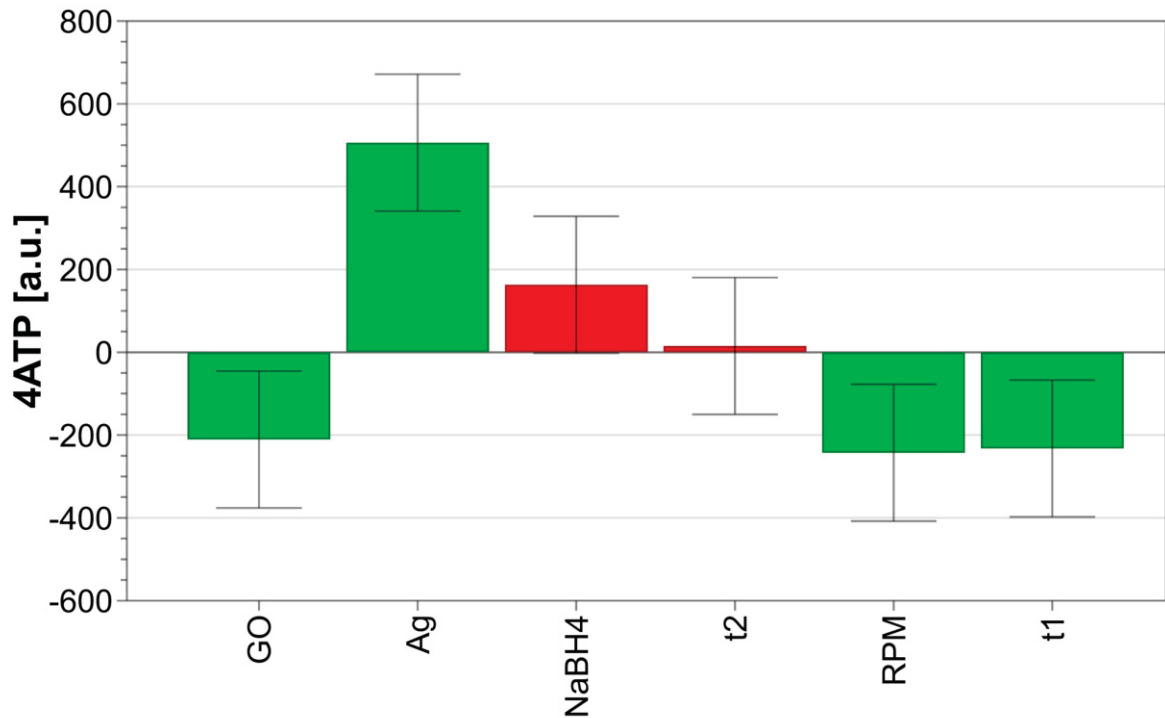
Ensaio	X1	X2	X3	X4	X1X2X3X4	X2X3X4	Valor Médio da Intensidade Raman (u.a.)
5	-1	-1	+1	-1	-1	+1	397
6	+1	-1	+1	-1	+1	+1	354
7	-1	+1	+1	-1	+1	-1	624
8	+1	+1	+1	-1	-1	-1	2722
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	515
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1	334
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	1509
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1	616
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1	369
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	1806
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1	4096
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	283

LEGENDA: PC: Ponto Central; X1: [GO] (%); X2: m AgNO₃ (mg); X3: mNaBH₄ (mg); X4: t₂ (min); X1X2X3X4: rotação (rpm); X2X3X4: t₁ (min).

Fonte: O autor (2024)

Para os valores da TABELA 7, uma análise estatística foi realizada para determinar quais os parâmetros que foram mais significativos para o aumento da intensidade SERS do 4-ATP. A FIGURA 11 mostra os valores para as confusões dos efeitos do planejamento fatorial fracionário, com suas respectivas barras de erro, baseado nas replicatas do ponto central. A FIGURA 12 apresenta os espectros Raman do 4-ATP em pontos do planejamento onde foi obtido a menor resposta, a maior resposta e o ponto central do planejamento fatorial fracionário. É possível verificar o aumento da intensidade de outras bandas (988 e 1352 cm⁻¹) com as condições de maior intensidade do sinal para o planejamento fatorial fracionário. O planejamento fatorial fracionário (IV) apresenta baixa resolução, que amplia a variabilidade experimental levando a resultados menos precisos e mais propensos a erros. Isso é exemplificado pela dificuldade em distinguir efeitos de segunda ordem e de ordem superior, bem como as suas interações, que apresentam comportamento não-significativo, semelhante a um ruído experimental. Dessa forma, é preferível avaliar somente os efeitos principais.

FIGURA 11 – GRÁFICO DE EFEITOS E DESVIO PADRÃO PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO.



LEGENDA: GO: Concentração de GO; Ag: AgNO_3 ; t2: tempo de redução; RPM: Velocidade de rotação; t1: tempo de dispersão.

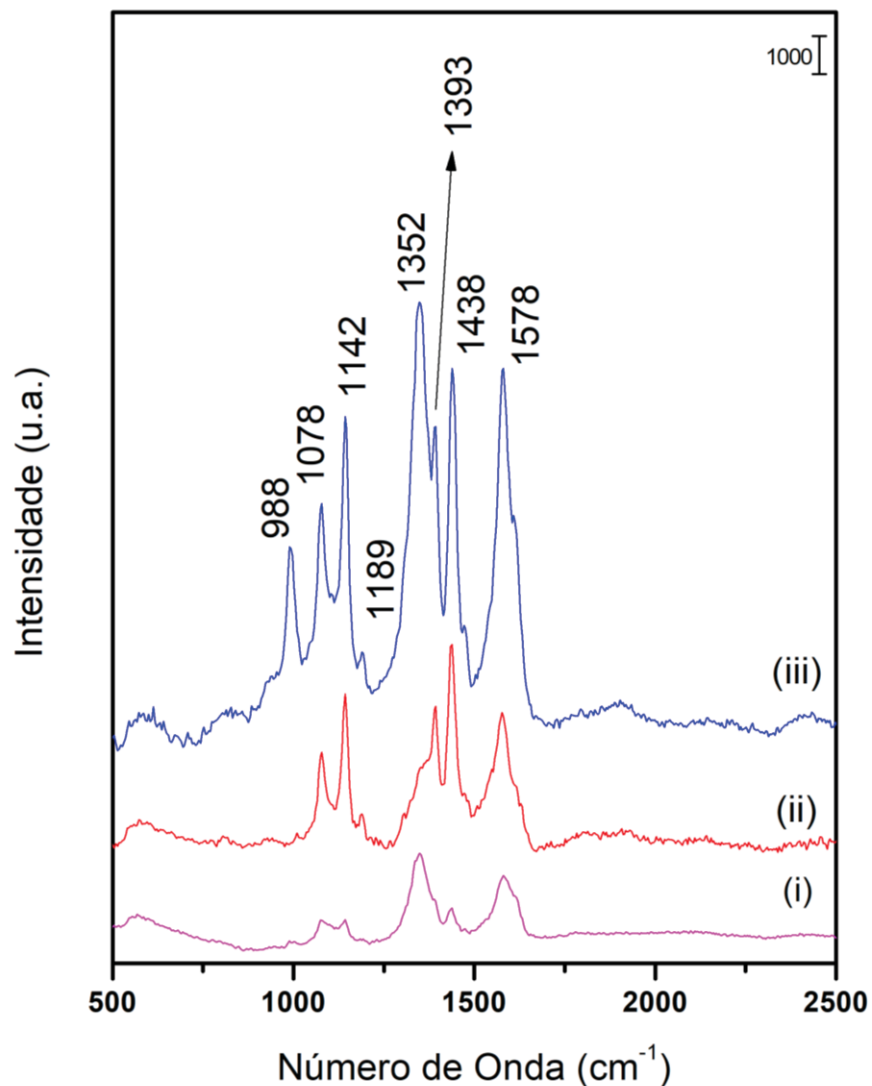
Fonte: O autor (2024)

Através da análise dos efeitos principais e os seus desvios padrão, é possível observar que a massa de nitrato de prata é a variável que tem significância. Além disso, a massa de nitrato de prata tem uma influência positiva, ou seja, em seu nível máximo há um aumento na intensidade SERS. A concentração de GO, o tempo de dispersão (t1) e a velocidade de rotação também mostraram níveis de significância para o aumento da intensidade SERS, mas com impacto negativo. Dessa forma, os menores níveis da concentração de GO, menores tempos de dispersão (t1) e menores velocidades de rotação tendem a aumentar a intensidade SERS.

No entanto, a massa de NaBH_4 e tempos de redução (t2) são efeitos positivos, mas seus intervalos de confiança são maiores do que os valores dos coeficientes de suas médias absolutas. Dessa forma, pode-se inferir que essas duas variáveis não são significativas na contribuição do aumento da intensidade SERS para o substrato rGO/AgNPs. Com isso, para otimizar as condições de síntese de forma a aumentar a intensidade SERS, é necessário aumentar a massa de nitrato de

prata adicionada, diminuir a concentração de GO, diminuir o tempo de dispersão e diminuir a velocidade de rotação. Foram feitas as caracterizações das amostras de rGO/AgNPs do planejamento fatorial fracionado de experimentos: menores respostas, ponto central e maiores respostas em SERS e também foi feita a caracterização da amostra rGO/AgNPs do planejamento Box-Behnken que teve a maior resposta em SERS.

FIGURA 12 – ESPECTROS RAMAN DO 4-ATP $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NO PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS: (i) MENOR RESPOSTA; (ii) PONTO CENTRAL; (iii) MAIOR RESPOSTA.



Fonte: O autor (2024)

Para entender a influência das variáveis significativas na síntese do substrato e a razão pelas diferentes respostas nos espectros SERS, a caracterização dos filmes finos rGO/AgNPs foi realizada.

Pelos espectros Raman do planejamento, FIGURA 12, é possível observar a presença das bandas D e G do grafeno presente no espectro Raman da menor resposta do planejamento fatorial fracionário, em 1352 e 1578 cm^{-1} , respectivamente. Uma vez que as concentrações de 4-ATP são as mesmas, um dos indícios para esse fato se dá pela menor massa de nitrato de prata adicionada (fazendo com que forme menor quantidade de nanopartículas), pelo maior tempo de redução (t_2) (fazendo com que ocorra muita coalescência e poucos *hot-spots*) ou pela menor rotação do sistema (fazendo com que não forme uma quantidade de nanopartículas significativas) sendo necessário realizar o cálculo de intensificação (EF) para verificar o número de moléculas detectadas pelos experimentos dos planejamentos fatoriais fracionários.

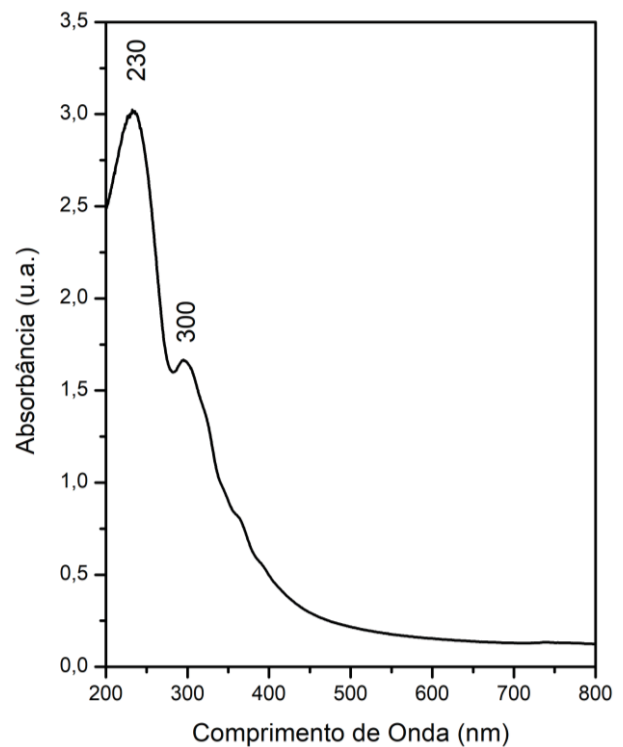
As demais caracterizações do material se apresentam no tópico a seguir.

4.3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA

4.3.1 Espectroscopia de UV-Vis e fotografias digitais dos compósitos

A formação dos nanocompósitos de rGO/AgNPs se inicia com o preparo do GO, que foi obtida através da oxidação do grafite *bulk* formando o Gr-O por ação de agentes oxidantes. O Gr-O foi esfoliado para obter o GO, que possui coloração amarelo claro, conforme FIGURA 13 (a), sendo caracterizado por espectroscopia UV-Vis antes da síntese do compósito rGO/AgNPs, conforme ilustrado na FIGURA 13 (b).

FIGURA 13 – (a) DISPERSÃO DE GO EM QUARTZO; (b) ESPECTRO UV-Vis DA DISPERSÃO DE GO.

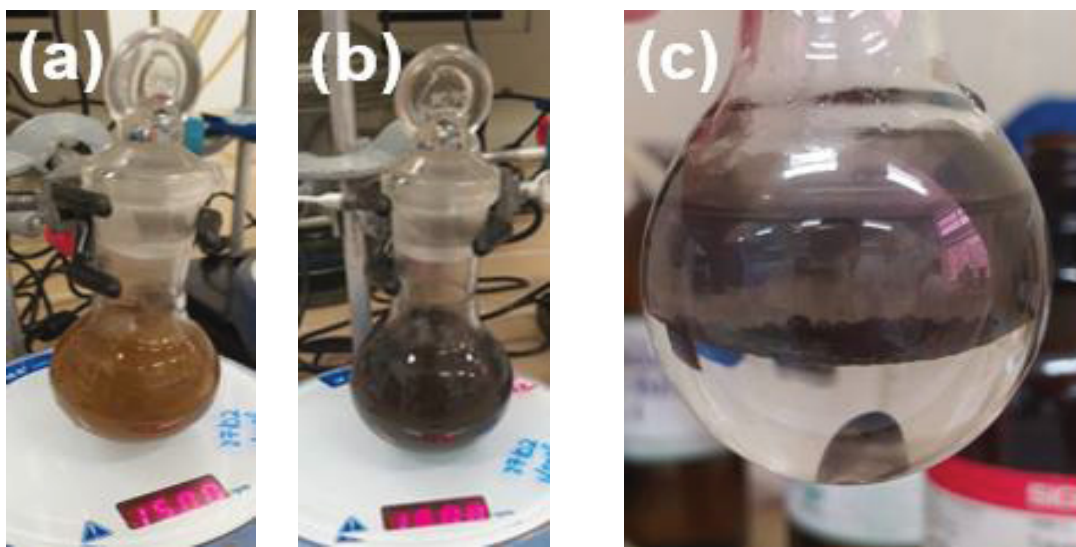
(a)**(b)**

Fonte: O autor (2024)

Foi observado no espectro do GO duas bandas características, sendo uma em 230 nm e outra em 300 nm, respectivamente. A banda em 230 nm está relacionada à transição $\pi-\pi^*$ de ligações C-C dos anéis aromáticos, e outra em 300 nm, está associada à transição $n-\pi^*$ de ligações C=O (FERNÁNDEZ-MERINO et al., 2013; PAREDES et al., 2008; QU et al., 2012).

A seguir, foi realizada a formação das AgNPs simultaneamente com a redução do GO após a adição de NaBH_4 . A FIGURA 14 apresenta as fotos da reação de formação do nanocompósito.

FIGURA 14 – FOTOGRAFIAS DIGITAIS DA REAÇÃO PARA A FORMAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS. (a) ANTES DA ADIÇÃO DE NaBH_4 ; (b) APÓS A ADIÇÃO DE NaBH_4 e (c) TÉRMINO DA REAÇÃO.



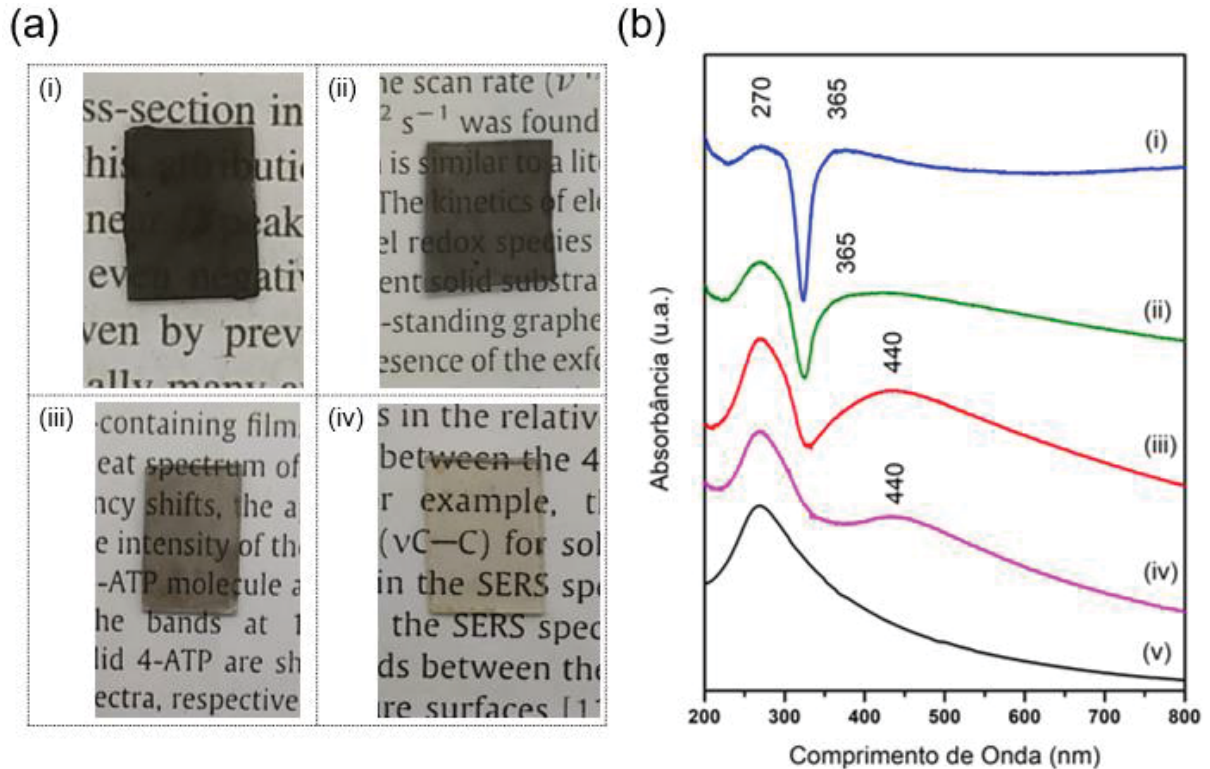
Fonte: O autor (2024)

Em todos os filmes, foi notado a mudança da coloração, passando de marrom FIGURA 14 (a) para preto FIGURA 14 (b), durante a adição de NaBH_4 . Ao término da reação, a solução aquosa ficou límpida e incolor FIGURA 14 (c), além disso ocorreu a formação de um filme com cor escura na interface aquosa/orgânica, indicando a formação do composto rGO/AgNPs.

Após a síntese completa, foram feitas as deposições dos filmes em substrato de vidro e quartzo pelo método LLIR. As fotografias digitais dos nanocompósitos depositadas nos substratos são mostradas na FIGURA 15 (a) e seus espectros UV-Vis coletados FIGURA 15 (b). Os filmes apresentam transparência e qualidade óptica, sendo uma característica importante para o SERS pois permite a interação da luz com a superfície de contato subjacente, permitindo uma detecção mais sensível do analito adsorvido na superfície metálica (PARK; LEE; KO, 2017).

Todos os filmes foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis. No espectro do rGO (FIGURA15b-v), comparado com os espectros do GO, observa-se que houve um deslocamento da banda em 230 para 270 nm, indicando a restauração da conjugação entre as folhas de grafeno (JIANG et al., 2018), comprovando, assim, a redução do GO para rGO. Além disso, todos os espectros são característicos pela ausência da banda em 300 nm, que é uma das evidências que conclui que houve a redução dos grupos funcionais oxigenados presentes no GO para rGO, como esperado (MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015).

FIGURA 15 – (a) FOTOGRAFIAS DIGITAIS (i) PLANEJAMENTO BOX-BEHKEN; (ii) MAIOR RESPOSTA PLANEJAMENTO FATORIAL; (iii) PONTO CENTRAL; (iv) MENOR RESPOSTA PLANEJAMENTO FATORIAL e (b) ESPECTRO UV-Vis DOS FILMES FINOS (i) PLANEJAMENTO BOX-BEHKEN; (ii) MAIOR RESPOSTA PLANEJAMENTO FATORIAL; (iii) PONTO CENTRAL; (iv) MENOR RESPOSTA PLANEJAMENTO FATORIAL; (v) rGO.



LEGENDA: PFF: Planejamento Fatorial Fracionário.

Fonte: O autor (2024)

Os espectros das menores respostas SERS e das amostras de ponto central tinham em comum a banda em 440 nm, como mostra a FIGURA 15 (b-iii.iv). Essa banda é atribuída ao fenômeno de ressonância de plasmons de superfície nas AgNPs, sugerindo que houve a redução dos íons Ag^+ para AgNPs. O deslocamento do espectro pode ser atribuído ao formato, tamanho e a interação das AgNPs com as folhas de grafeno e o substrato, como relatado em trabalhos anteriores.

Amostras que tiveram as menores intensidades SERS no planejamento fatorial de experimentos mostravam a baixa intensidade banda *plasmon* da prata em 440 nm, como ilustrado na FIGURA 15 (b-iv). A intensidade dessa banda é relacionada diretamente com a massa inicial de $AgNO_3$ adicionada. Essas amostras tiveram 3 fatores significativos: maiores níveis de tempo de redução (+1) e maiores níveis de velocidade de rotação (+1) e menores níveis de $AgNO_3$ adicionada (-1).

O maior tempo de redução (t_2) é um fator que contribui para as menores respostas em SERS. Uma das hipóteses que investiga este fato é que após a adição do agente redutor NaBH_4 , em maiores intervalos de tempos de redução, as nanopartículas de prata irão coalescer-se mais devido ao grande intervalo de tempo de redução, fazendo com que haja um prevailecimento da prata na forma de *bulk* e, dessa forma, a prata irá absorver menos luz e dispersar mais por meio de espalhamento inelástico, diminuindo sua intensidade SERS (KELLY et al., 2003; MAIER, 2007; PUSTOVIT; SHAHBAZYAN, 2005). Hipótese que pode ser confirmada através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Menores níveis de NaBH_4 na síntese limita a redução eficaz de AgNO_3 e GO para AgNPs e rGO, mesmo com altos níveis (+1) tanto de AgNO_3 quanto de concentração de GO. Essa hipótese é corroborada pelo gráfico de efeitos do planejamento fatorial de experimentos, demonstrando a influência positiva da concentração de NaBH_4 na intensidade do sinal SERS, que é um indicador da formação de AgNPs e rGO.

Em maiores níveis de velocidade de rotação, acredita-se que a coalescência de nanopartículas seja facilitada devido ao aumento de choques de NPs, reduzindo a disponibilidade de nanopartículas e conseqüentemente, diminuindo o efeito SERS. Isso, por sua vez, resulta em diminuição na intensidade SERS. Estudo anterior afirma que a taxa de rotação é um fator importante tanto para a formação quanto para a qualidade do filme na interface líquido-líquido (ZARBIN, 2021).

O espectro UV-Vis das amostras que tiveram as maiores médias de intensidades SERS do planejamento fatorial de experimentos e do planejamento Box-Behnken (que será discutido posteriormente), (amostras (ii) e (i), respectivamente) exibem um deslocamento da banda plasmon da prata para 365 nm, indicando a formação de nanopartículas menores. Ainda, a intensidade dessa banda é diretamente proporcional a massa inicial de AgNO_3 adicionada, o que leva a uma maior formação de AgNPs.

Como reportado em estudo anterior, o aumento da massa de AgNO_3 adicionada na síntese do compósito rGO/AgNPs pode diminuir a transparência do filme devido à redução de Ag^+ para AgNPs (MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015). Além disso, o escurecimento do filme pode também indicar a uma maior redução das folhas de GO para rGO. Este efeito pode ser observado pelas fotografias digitais dos filmes na FIGURA 15 (a), na amostra (i) ao qual foi sintetizada nas seguintes

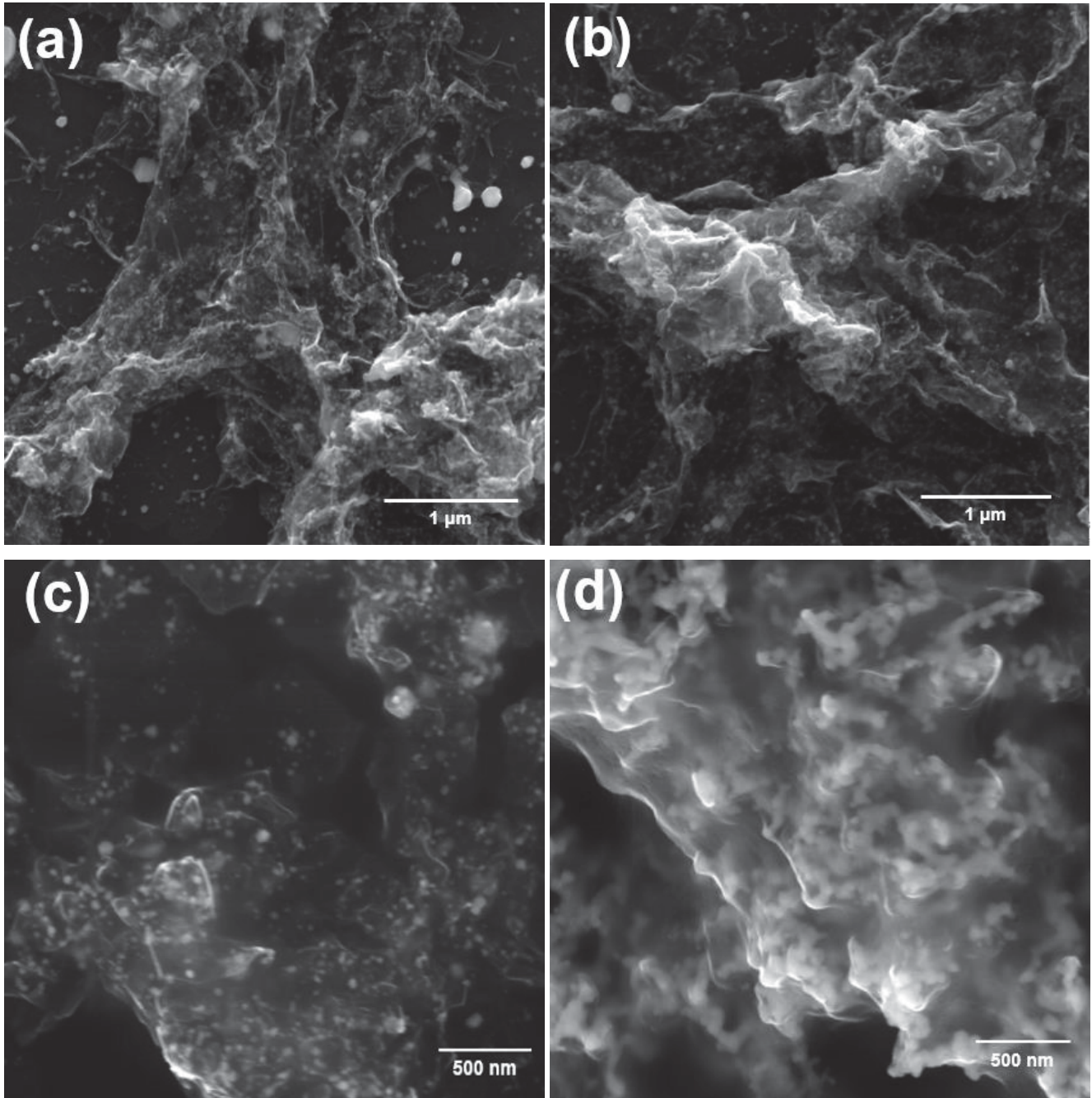
condições: 7,0 mg de AgNO_3 , 1000 RPM, 45 minutos para o tempo de dispersão (t_1), 150 mg de NaBH_4 , 45 minutos para o tempo de redução (t_2) e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de GO.

Em relação aos tempos de dispersão (t_1), há indícios de que quanto maior for esse intervalo de tempo, maior será o favorecimento da interação dos íons Ag^+ com o GO antes da formação do composto rGO/AgNPs. Essa interação facilita a nucleação das nanopartículas de prata na superfície do GO, deixando-as mais disponíveis. Após a adição do agente redutor, essas nanopartículas de prata ficam ligadas as folhas do GO através de interações eletrostáticas entre a carga positiva dos íons Ag e a carga negativa dos grupos carboxilatos na superfície do GO (JIANG et al., 2018).

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

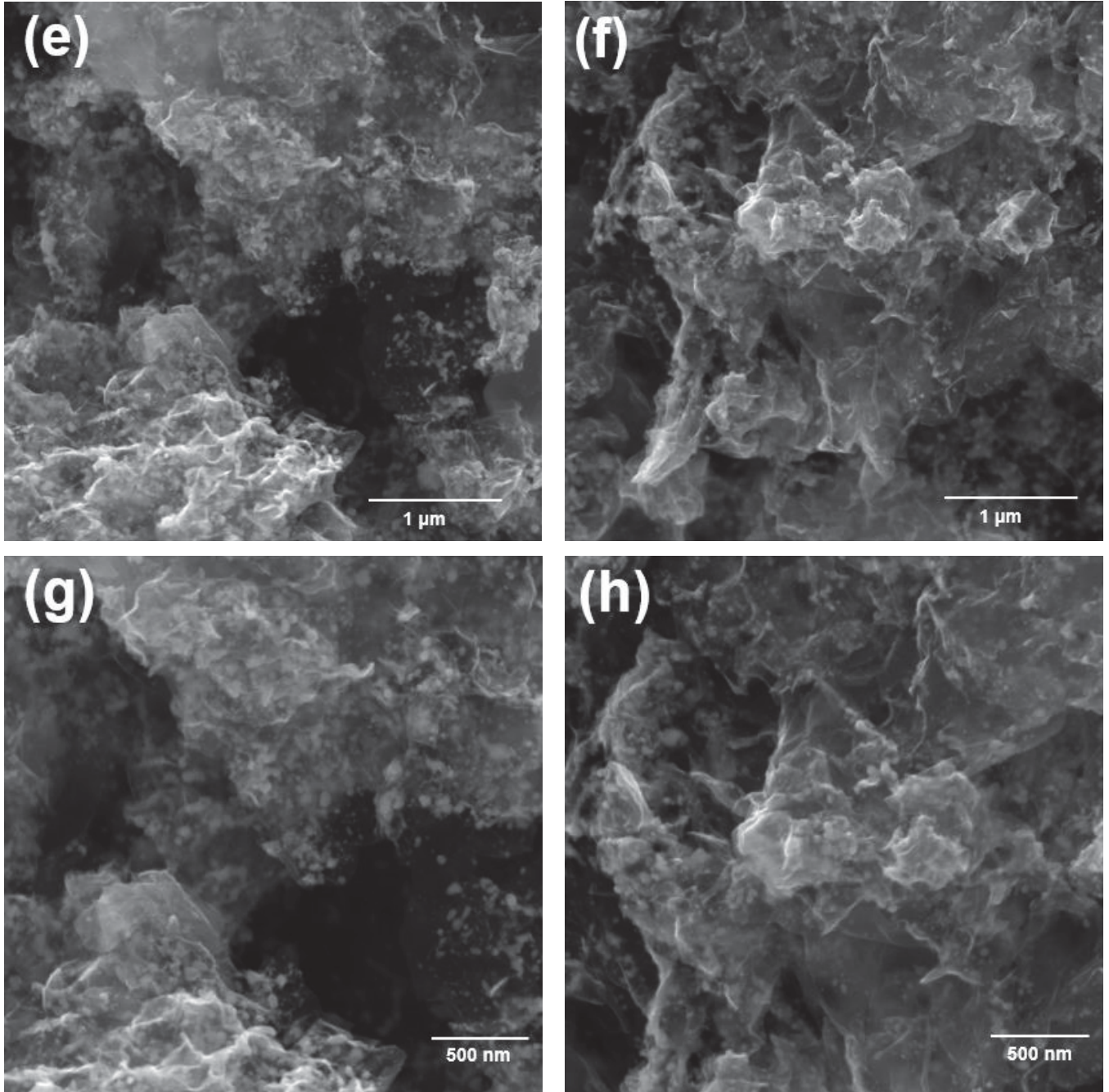
Para confirmar as hipóteses das análises UV-Vis, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelou as morfologias dos filmes nas FIGURA 15, 16 e 17. Estão apresentadas as imagens do composto com a menor intensidade SERS, obtida através do planejamento fracionário de experimentos, do ponto central e do ponto de maior intensidade SERS do planejamento fatorial de experimentos. Todas as amostras caracterizadas por MEV foram depositadas em substratos de Si/SiO₂.

FIGURA 16 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS AMOSTRAS (a-d) MENORES RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS.



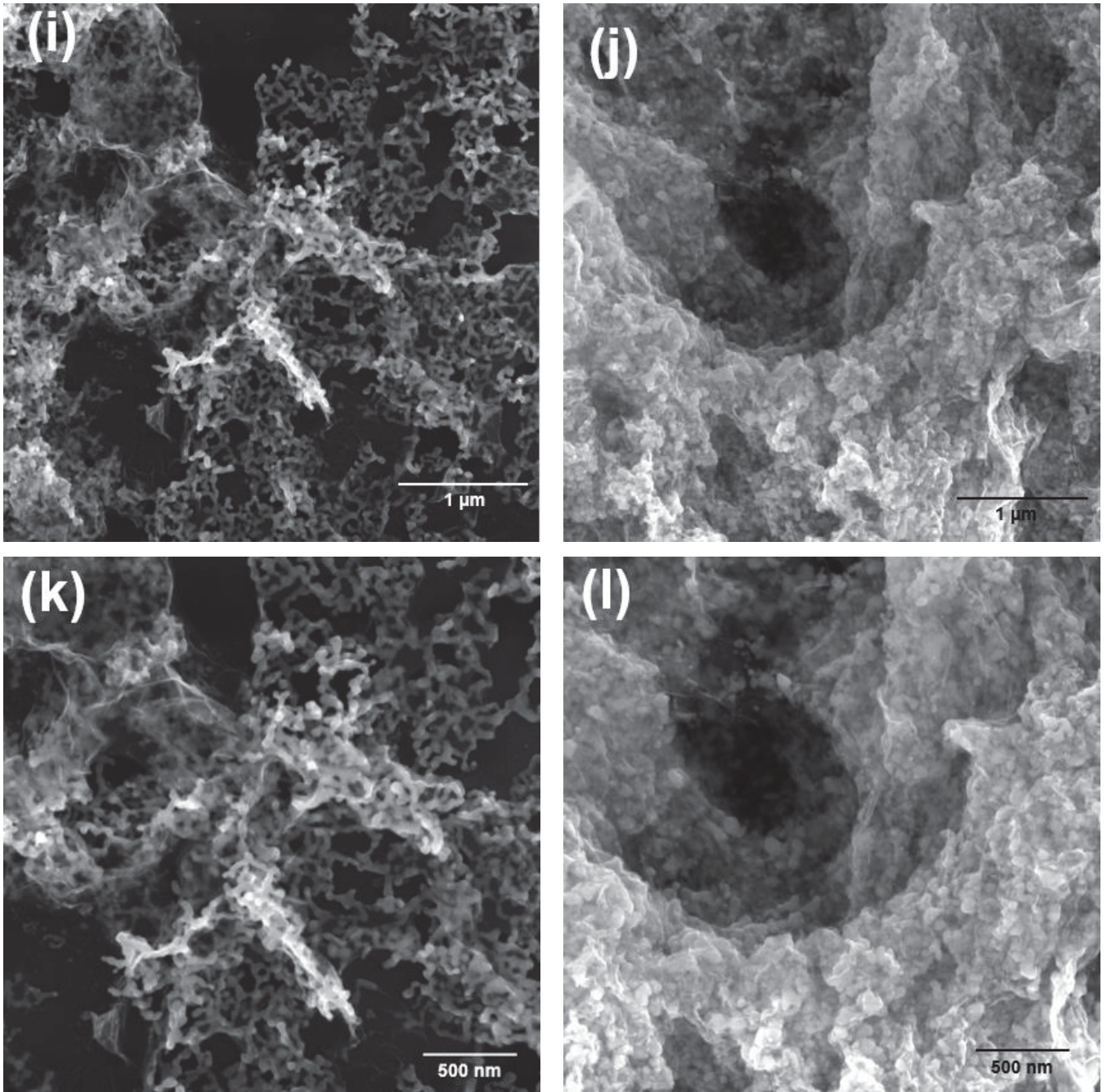
Fonte: O autor (2024)

FIGURA 17 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS AMOSTRAS (e-h) PONTO CENTRAL DO PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO DE EXPERIMENTOS.



Fonte: O autor (2024)

FIGURA 18 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DAS AMOSTRAS (i-l) MAIORES RESPOSTAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DE EXPERIMENTOS.



Fonte: O autor (2024)

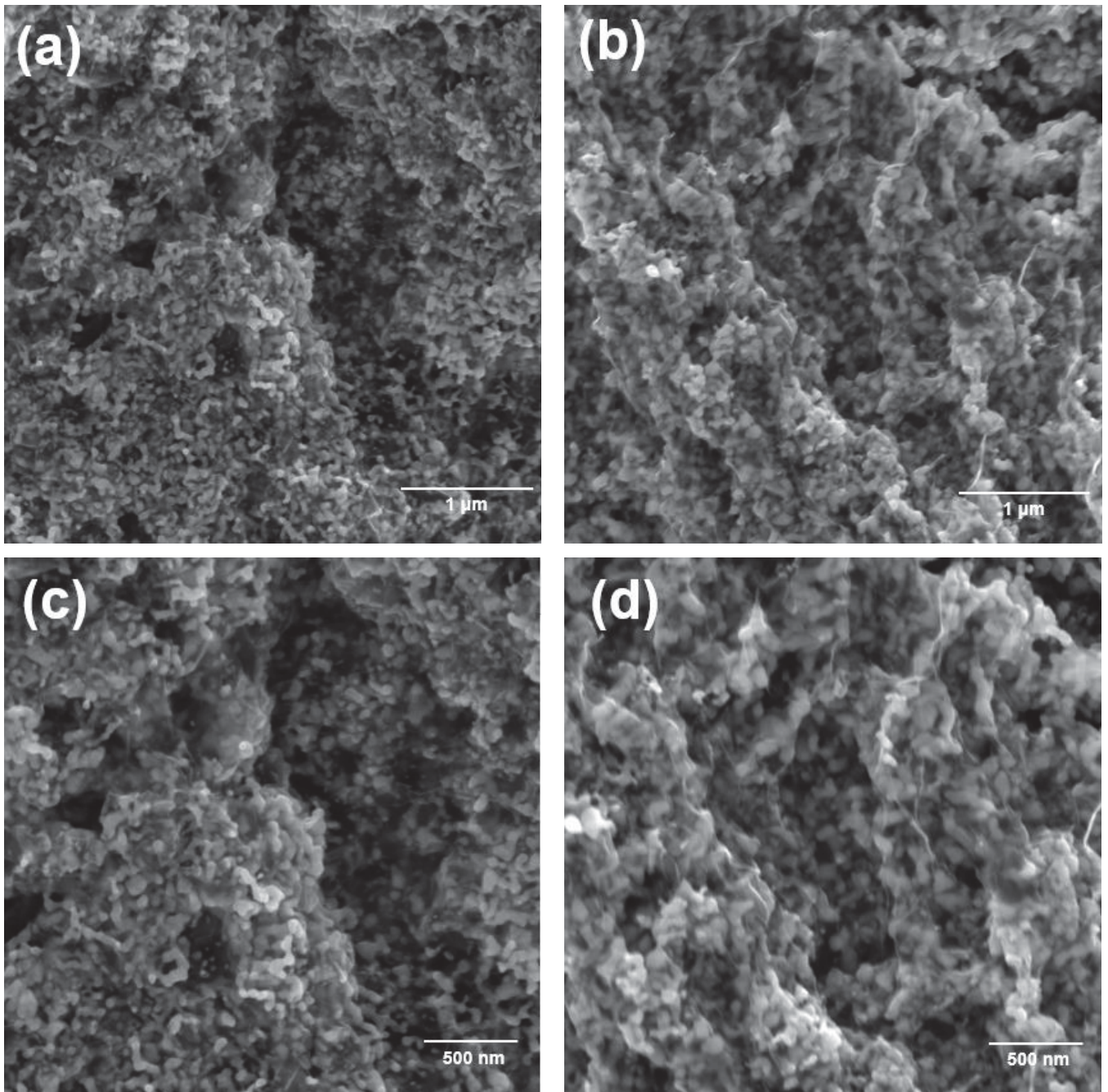
Nas imagens de MEV, é possível confirmar a presença de AgNPs em todas as amostras. As amostras com menor intensidade média de SERS apresentam AgNPs recobertas de forma mais uniforme pelas folhas de grafeno, exibindo menos partículas aglomeradas conforme observado pela FIGURA 16a-d. A baixa densidade e a distribuição dispersa de AgNPs nas folhas do grafeno resultam em uma excitação LSPR fraca, consequentemente a amplificação do sinal SERS é menos intensa (JIANG et al., 2018). Essa diferença foi observada em todas as amostras preparadas com a menor massa de AgNO_3 adicionada na síntese pelo planejamento fracionário fatorial de experimentos.

Nas amostras do ponto central do planejamento fracionário fatorial de experimentos FIGURA 17 (e-h) as AgNPs estão cobertas pelas folhas de grafeno igualmente como nas amostras de menores respostas do planejamento fatorial de experimentos. No entanto, as amostras do ponto central apresentam maior agregação em comparação com as amostras preparadas com a menor massa de AgNO_3 adicionada. Nota-se claramente também um aumento do número de nanopartículas dispersas e pela folha de grafeno. Esse fato deve-se a maior quantidade de AgNO_3 adicionada em comparação com as amostras de menores respostas do planejamento de experimentos.

Para as amostras com maiores respostas SERS, como na FIGURA 18 é possível verificar nas imagens (j) e (l) que existe ainda um pequeno recobrimento das folhas de grafeno sobre as AgNPs e nas imagens (i) e (k) é possível observar que as AgNPs estão mais disponíveis na superfície das folhas de grafeno e maiores aglomerados levando a um aumento de *hot-spots* na região e, consequentemente, a um aumento na intensidade do sinal SERS. É possível verificar o formato menos esférico e alongado das NPs, bem como as aglomerações entre as NPs. A literatura também corrobora que o aumento do efeito SERS pode ocorrer em amostras que contém maiores aglomerados de nanopartículas não estabilizadas (KLEINMAN et al., 2013). Estes aglomerados facilitam a formação de *hot-spots* que intensificam significativamente o sinal SERS.

Posteriormente, foi feito também a caracterização por MEV das amostras do planejamento Box-Behnken para confirmar as hipóteses de espectroscopia UV-Vis. As amostras foram depositadas também em Si/SiO_2 conforme FIGURA 19(a-d).

FIGURA 19 – IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DA AMOSTRA (a-d) DE MAIOR RESPOSTA DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN.



Fonte: O autor (2024)

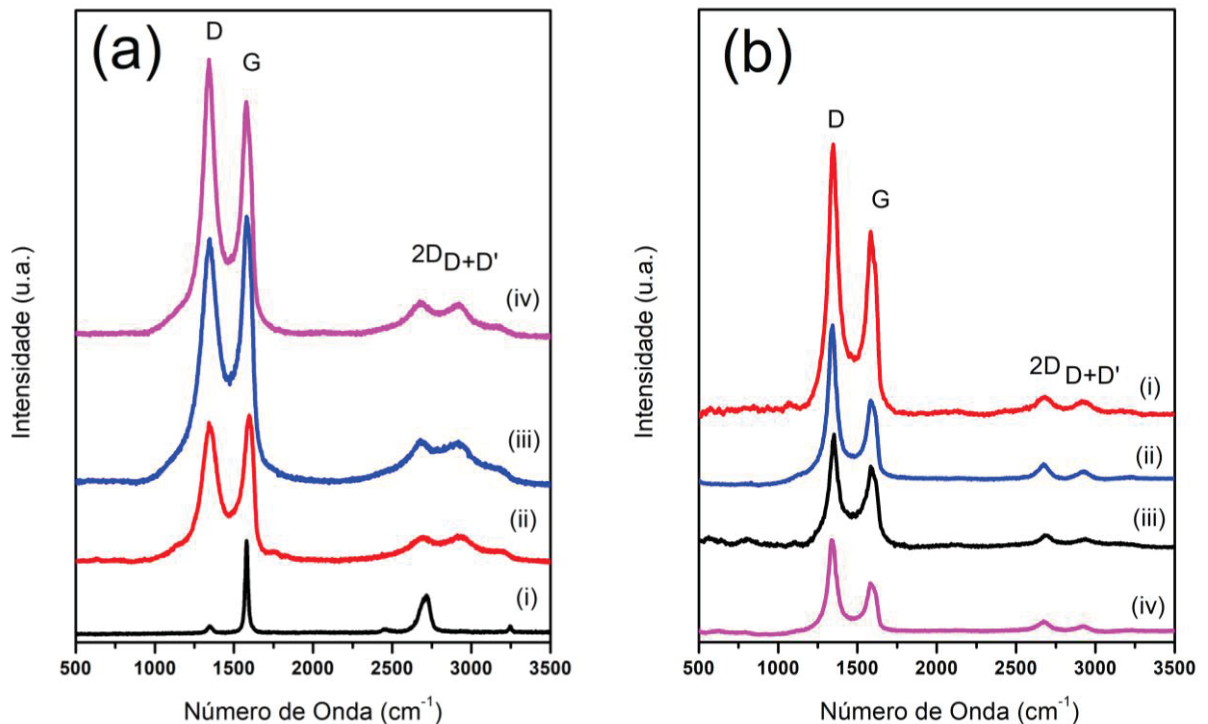
É possível verificar que nas imagens do planejamento Box-Behnken, as AgNPs estão recobrando totalmente as folhas de grafeno e estão bem mais disponíveis na superfície das folhas. Além disso, as nanopartículas estão bem mais aglomeradas, possuindo formatos alongados, corroborando com o seu espectro UV-Vis. Esse fato é devido a maior quantidade de AgNO_3 adicionada na síntese, uma

vez que essa quantidade é maior do que a quantidade adicionada no planejamento fatorial de experimentos.

4.3.3 Espectroscopia Raman

A técnica de espectroscopia Raman foi aplicada para caracterizar o grafeno usado no substrato de forma a compreender o estado do grafeno pelos sinais obtidos no espectro. Dessa forma, foram feitas as caracterizações das amostras de grafite, Gr-O, GO, rGO e de rGO/AgNPs de menor resposta, de ponto central, de maior resposta do planejamento fatorial de experimentos e da maior resposta do planejamento Box-Behnken por espectroscopia Raman, como mostrado na FIGURA 20. Através da dos espectros, podemos investigar as propriedades vibracionais dos carbonos sp^2 e as propriedades eletrônicas dos materiais carbonáceos. Os espectros Raman foram obtidos com laser verde em $\lambda = 532$ nm.

FIGURA 20 – ESPECTROS RAMAN DOS MATERIAIS CARBONÁCEOS; (a): (i) grafite; (ii) Gr-O; (iii) GO; (iv) rGO. (b): (i) rGO/AgNPs PBB; (ii) rGO/AgNPs PFF MAIOR RESPOSTA; (iii) rGO/AgNPs PC; (iv) rGO/AgNPs PFF MENOR RESPOSTA.



LEGENDA: PC: Ponto Central; PFF: Planejamento Fatorial Fracionário.; PBB: Planejamento Box-Behnken.

Fonte: O autor (2024)

Analisando os espectros, é possível observar as bandas características dos materiais gráfiticos. Os espectros Raman dos materiais carbonáceos apresentam bandas bem definidas e características, tais como as bandas D, G, 2D e D+D' (MALARD et al., 2009) e em ambas as FIGURAS 20 (a) e (b) possuem essas características em comum. Em (a), temos os materiais: (i) grafite, (ii) Gr-O, (iii) GO e (iv) rGO. Já em (b) temos os materiais: (i) rGO/AgNPs do planejamento Box-Behnken, (ii) rGO/AgNPs da maior resposta do planejamento fatorial fracionário, (iii) rGO/AgNPs do ponto central do planejamento fatorial de experimentos e (iv) rGO/AgNPs da menor resposta do planejamento fatorial de experimentos.

Na FIGURA 20 (a) nos espectros Raman dos materiais carbonáceos, podemos observar que possuem as bandas D, G, 2D e D+D' em comum. Analisando os espectros, a banda D, em aproximadamente 1350 cm^{-1} , é comumente associada as falhas na estrutura gráfitica, proveniente das ligações sp^2 e ao efeito de borda, no qual as bordas apresentam ligações incompletas (SU et al., 2009), sendo esta uma banda proibida no Raman, oriunda do estiramento simétrico dos átomos de carbono no hexágono e a presença de defeitos quebra a simetria do anel e regra de seleção é relaxada. A banda G, centrada em, aproximadamente, 1580 cm^{-1} , é atribuída aos modos de estiramentos C=C das estruturas gráfiticas. Sabe-se que a posição e a intensidade desta banda podem fornecer informações referentes ao grau de grafitação da amostra, na qual os deslocamentos para maiores números de onda indicam a diminuição no grau de grafitação. Além disso, o alargamento dessa banda indica uma maior heterogeneidade ou desordem da estrutura (FERRARI, 2007; FERRARI et al., 2006). A banda 2D, em aproximadamente, 2700 cm^{-1} , é característica e proveniente de materiais gráfiticos, estando relacionada a organização estrutural do plano dimensional do grafeno, característicos de grafeno com excelente qualidade estrutural (RAMOS; ZARBIN, 2020). Nota-se também a presença da banda D+D' cuja intensidade está relacionada com altas quantidades de defeito do material. (MALARD et al., 2009; SU et al., 2009).

Os resultados indicam que as AgNPs carregadas na superfície de rGO podem intensificar o sinal Raman do rGO, devido ao aumento eletromagnético causado pelas AgNPs fazendo com que o nanocompósito seja um possível substrato para detecção molecular (MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015).

Dessa forma, o comportamento espectral dos materiais em sequência: grafite → Gr-O → GO → rGO → rGO/AgNPs seguem os padrões descritos na literatura.

4.3.4 Planejamento Box-Behnken

Dessa forma a simplificar o planejamento na etapa de otimização das condições de síntese, decidiu-se utilizar apenas as 3 variáveis mais significativas do planejamento fatorial fracionário. Desta forma, apenas da massa de AgNO_3 , Rotação e tempo de dispersão (t_1) e concentração de Go terem sido considerados significativos, apenas os 3 primeiros fatores foram utilizados para otimização do sistema em um planejamento Box-Behnken. A TABELA 8 mostra as condições experimentais em que o planejamento foi desenvolvido e o resultado de cada experimento.

TABELA 8 – MATRIZ DE EXPERIMENTOS PARA O PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN COM A RESPOSTA

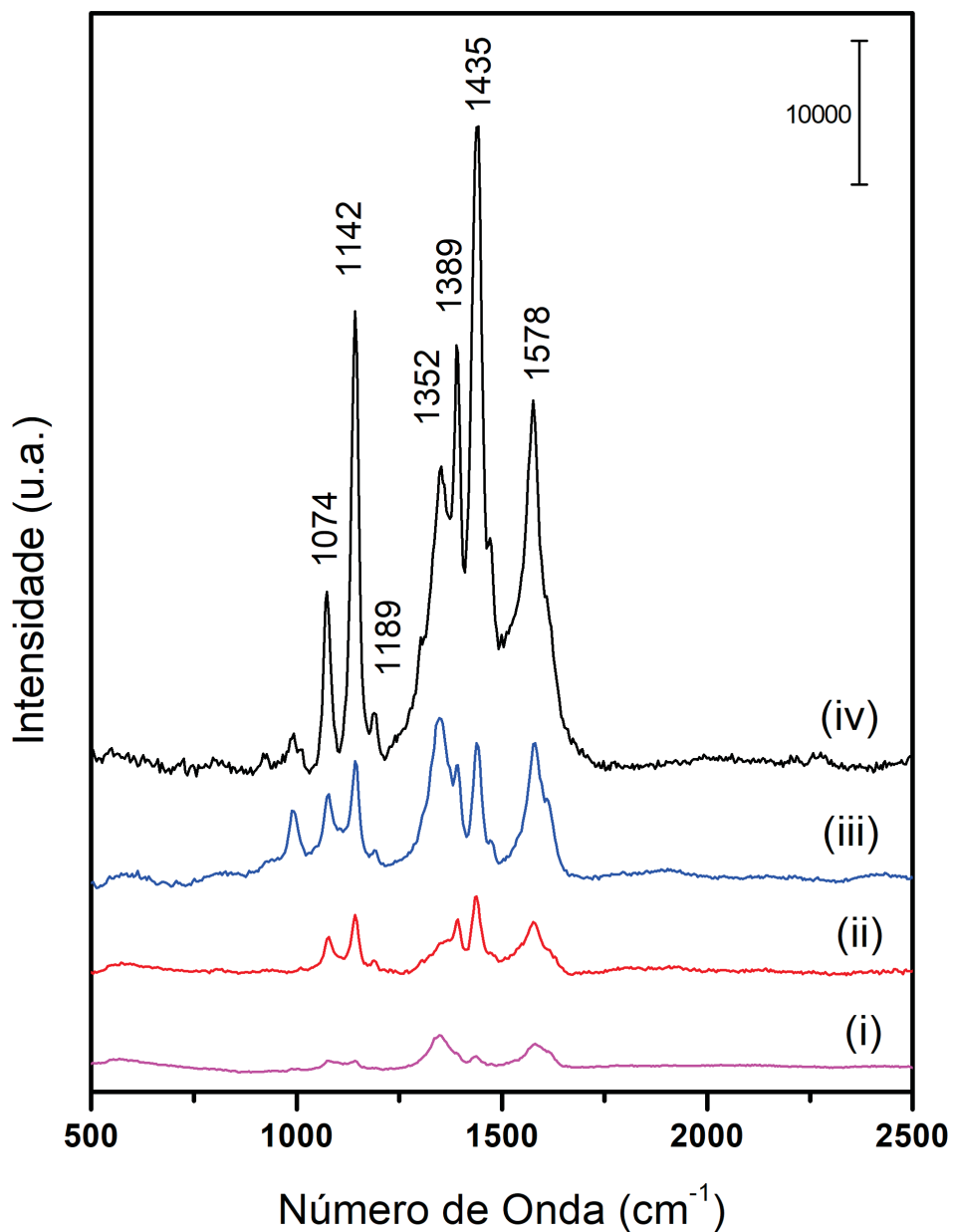
Ensaio	Níveis			Valor Médio da Intensidade Raman (u.a.)		
	X2	X1X2X3X4	X2X3X4	R1	R2	R3
1	-1	-1	0	4417	2841	5466
2	-1	1	0	2392	983	1936
3	1	-1	0	976	8622	6036
4	1	1	0	5242	2860	5506
5	-1	0	-1	8492	2232	2173
6	-1	0	1	1829	2147	1876
7	1	0	1	21593	8832	5189
8	1	0	-1	4395	4968	4325
9	0	-1	-1	1457	791	649
10	0	-1	1	1578	1170	1110
11	0	1	-1	1448	1138	1096
12	0	1	1	1737	2041	779
13	0	0	0	1654	2427	5709
14	0	0	0	1419	6117	4166
15	0	0	0	6616	5680	5239

LEGENDA: B: $m(\text{AgNO}_3)$ (mg); E: rotação (rpm); F: t_1 (min); R1: resposta do substrato de vidro 1; R2: resposta do substrato de vidro 2; R3: resposta do substrato de vidro 3.

Fonte: O autor (2024)

Foi observado que o melhor resultado foi obtido pelo ensaio 7. Na FIGURA 21 estão ilustrados os espectros Raman da menor, do ponto central e da maior resposta do planejamento fatorial de experimentos em comparação com a melhor resposta do planejamento Box-Behnken. As atribuições de todas as bandas Raman observadas no espectro SERS estão na TABELA 8.

FIGURA 21 – ESPECTROS RAMAN DA SOLUÇÃO DE 4-ATP 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ NOS PLANEJAMENTOS: (i) PFF MENOR RESPOSTA; (ii) PONTO CENTRAL; (iii) PFF MAIOR RESPOSTA; (iv) BOX-BEHNKEN.



LEGENDA: PFF: Planejamento Fatorial Fracionário.

Fonte: O autor (2024)

Um modelo matemático quadrático foi proposto para esse sistema, onde é possível observar os coeficientes e as suas significâncias e o ajuste do modelo obtido utilizando a ANOVA na TABELA 9. O modelo apresenta-se de acordo com a equação 2, em que X_1 , X_2 e X_3 representam os valores das variáveis independentes massa de nitrato de prata ($m\text{AgNO}_3$), tempo de dispersão (t_1) e rotação (RPM), respectivamente.

$$\text{Resposta} = 4336,89 + 1739,95X_1 - 331,453X_2 - 1130,62X_3 + 2012,38X_1^2 - 2409,06X_2^2 - 677,849X_3^2 + 448,967X_1X_2 - 1240,11X_1X_3 - 7,21615X_2X_3 \text{ (Equação 2)}$$

Verificou-se que as três variáveis independentes e suas interações não foram consideradas significativas uma vez que a equação quadrática poderia explicar somente 38% da variância do modelo. Além disso, os valores obtidos pelo teste F para verificar a falta de ajuste e o teste F da regressão para verificar se a variância explicada pela regressão é significativamente maior que a variância dos resíduos não puderam ser usados para predição, como de acordo com a FIGURA 22-a.

TABELA 9 – ANOVA PARA O MODELO NO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN.

Fonte de Variação	gl ¹	SQ ²	MQ ³	F	p-valor	
Regressão	8,32252×10 ⁷	9	9,24724×10 ⁶	1,95483	0,238	
Resíduo	2,36523×10 ⁷	5	4,73045×10 ⁶			
Falta de ajuste	2,0035×10 ⁷	3	6,66834×10 ⁶	3,6925	0,220	
Erro puro	2,0035×10 ⁷	2	1,80862×10 ⁶			R ² max = 0,779
Total	1,06877×10 ⁷	14	7,6341×10 ⁶			R ² adj = 0,380

gl¹: grau de liberdade; SQ²: Soma quadrática; MQ³: Média quadrática.

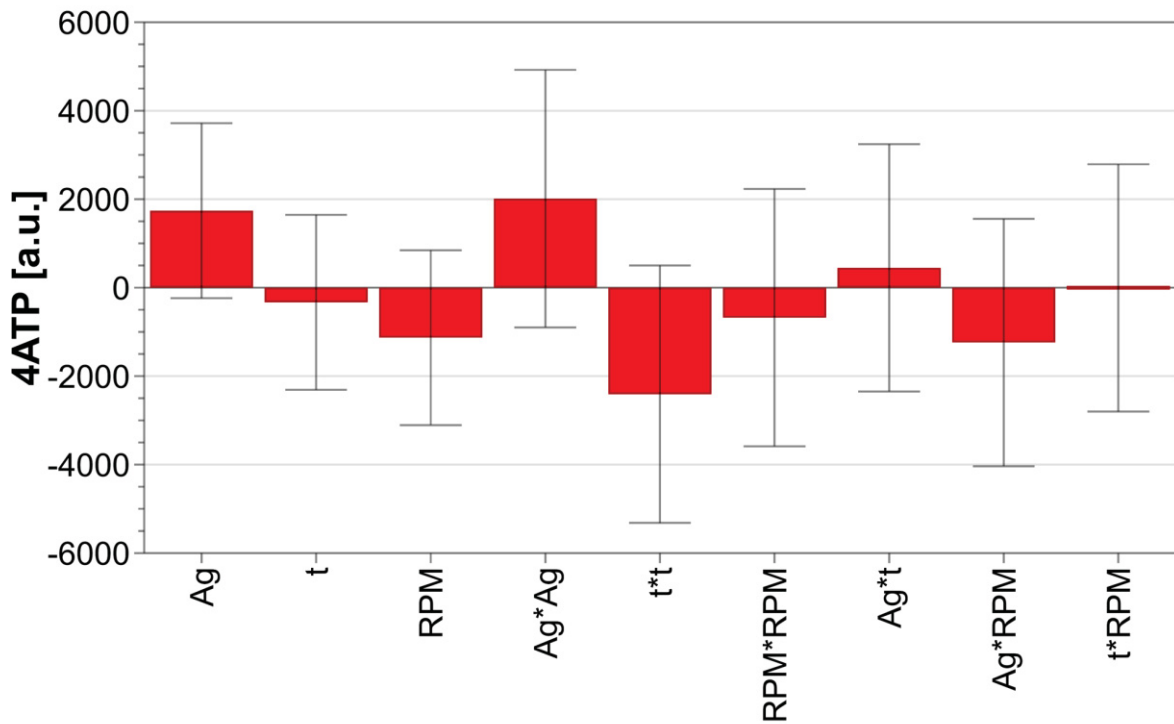
Fonte: O autor (2024)

Entretanto, de forma a deixar os resultados do planejamento mais visuais e facilitar a sua interpretação, foi interpolada uma superfície de resposta utilizando como base os valores obtidos pelo planejamento Box-Behnken. Dessa forma, a FIGURA 22-b apresenta uma estimativa para a superfície de resposta empírica por interpolação dos resultados do planejamento.

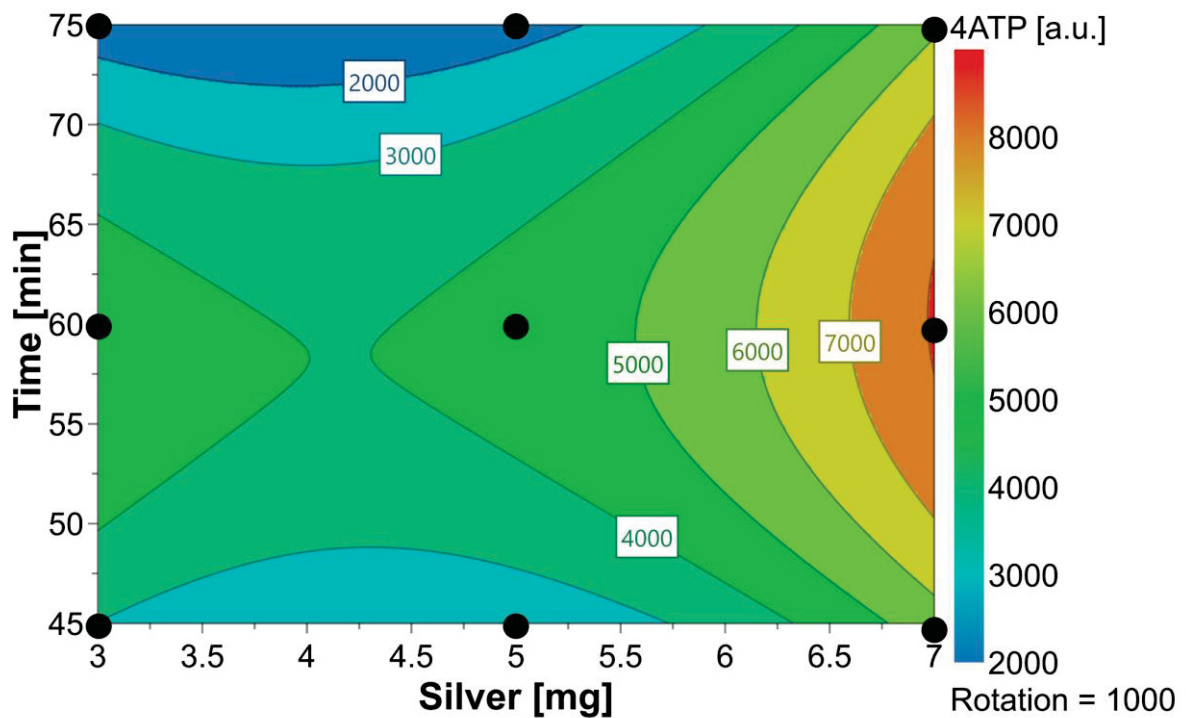
De acordo com a FIGURA 21-b, a condição com a maior resposta da intensidade SERS do 4-ATP é de a condição do ensaio 7 do planejamento, onde se utilizou as seguintes condições 7,0 mg de nitrato de prata, 1000 RPM, 60 minutos para o tempo de dispersão (t_1), 150 mg de borohidreto de sódio, 45 minutos para o tempo de redução (t_2) e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de GO. Esta condição foi considerada como a melhor condição de síntese do substrato, nas condições estudadas, e foi a empregada para o restante do trabalho.

FIGURA 22 – (a) GRÁFICO DE EFEITOS E SEUS DESVIO-PADRÃO DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN; (b) SUPERFÍCIE DE RESPOSTA EMPÍRICA DO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN

(a)



(b)



Fonte: O autor (2024)

A estratégia de otimização baseada no planejamento de experimentos do tipo Box-Behnken resultou em um aumento de 8 vezes na intensidade do sinal SERS em comparação com a resposta obtida no ponto central do planejamento fatorial. Além disso, houve um aumento na dispersão Raman cerca de 21500 vezes maior em relação à solução pura de 4-ATP. Comparado com o espectro do ponto central do planejamento fatorial fracionário, a melhor resposta obtida pelo Box-Behnken apresentou uma intensificação de sinais em todas as bandas espectrais.

As mudanças espectrais observadas nos espectros SERS são consistentes com a formação das ligações Ag-S entre o grupo tiol do 4-ATP e a superfície do filme rGO/AgNPs corroborando com trabalhos anteriores (MEHL; OLIVEIRA; ZARBIN, 2015; UETSUKI et al., 2010; WANG; HU; DONG, 2006; ZHANG et al., 2011). Este resultado experimental destaca indícios de uma ocorrência de regra de seleção da superfície SERS que pode ser utilizada para avaliar a interação do 4-ATP com o filme fino rGO/AgNPs. Uma hipótese é que a diminuição da intensidade das vibrações de alongamento N-H e a maior intensificação da vibração de alongamento

C-S no SERS é indicativo de interação do 4-ATP na forma de tiol através dos átomos de S por ligação covalente (OSAWA et al., 1994).

4.3.5 Aplicação do rGO/AgNPs para detecção de resíduos de pesticidas em cascas de alimentos.

Para investigar o espectro SERS do rGO/AgNPs com pesticidas, foram feitos alguns testes com diferentes analitos. Foram testados pesticidas da classe das triazinas (atrazina, simazina e ametrina – classe II), dos carbamatos (carbaril – classe II), dos anti-helmínticos (tiabendazol – classe III) e dos benzimidazólicos (carbedazim – classe III).

Inicialmente, os pesticidas simazina, atrazina, carbaril e ametrina na concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram depositados no filme rGO/AgNPs obtida da síntese do ponto central do planejamento fatorial de experimentos e seus espectros SERS foram obtidos. No entanto, não foi possível verificar variação de intensidade de sinal, somente as bandas D e G, conhecidas do material carbonáceo utilizado neste trabalho como substrato.

Três fatores se mostraram principais ao adquirir um espectro SERS para pesticidas no substrato estudado. Tanto o espectro do vidro quanto o espectro do GO sobrepujam o sinal do analito de interesse. Ao utilizar o laser de 532 nm, observou-se a presença de uma banda entre 850-1300 cm⁻¹, correspondente aos modos vibracionais dos grupos Si-O presentes no vidro, conforme descrito na literatura (YADAV; SINGH, 2015), além das bandas D e G do substrato rGO/AgNPs.

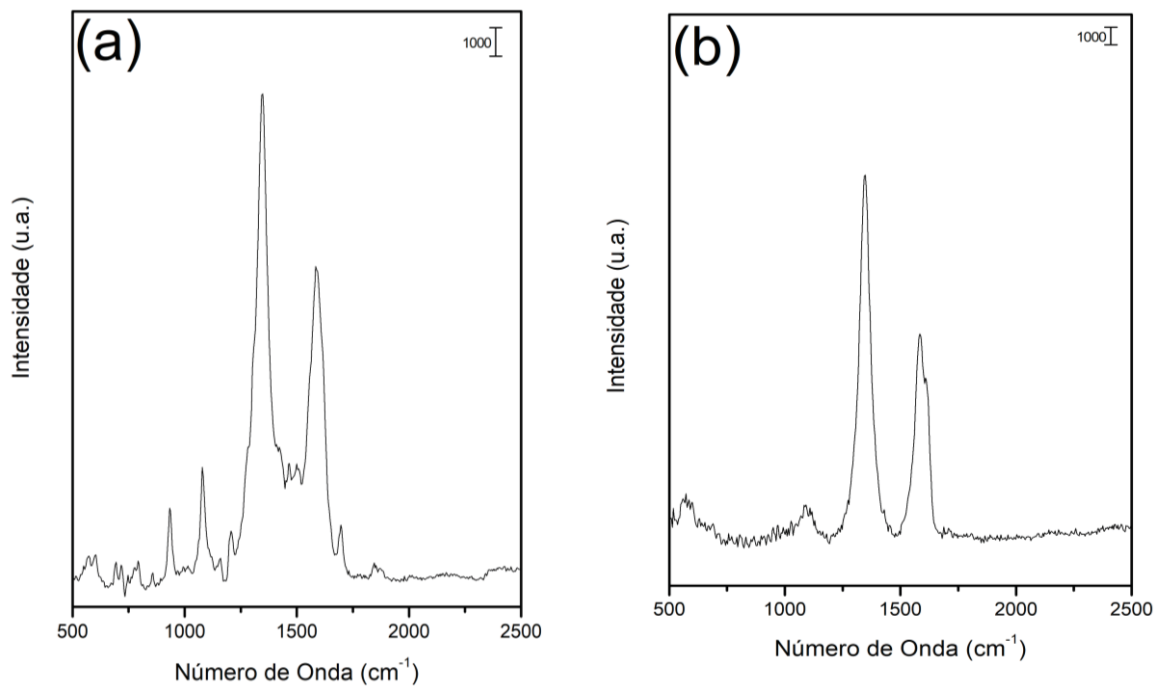
O segundo fator é que os filmes rGO/AgNPs em substratos podem perder seu efeito SERS após serem armazenados a 25°C ao ar por 50 dias (JIANG et al., 2018), sendo um dos indícios para que a reprodutibilidade das respostas do filme com o envelhecimento do sistema possa prejudicar a reutilização e a sua confiabilidade, o que requer que o sistema seja preparado no local e utilizado em até 7 dias, mantendo uma certa estabilidade devido a provável oxidação da prata. Uma alternativa a ser investigada para contornar essa limitação seria a substituição de AgNPs por AuNPs.

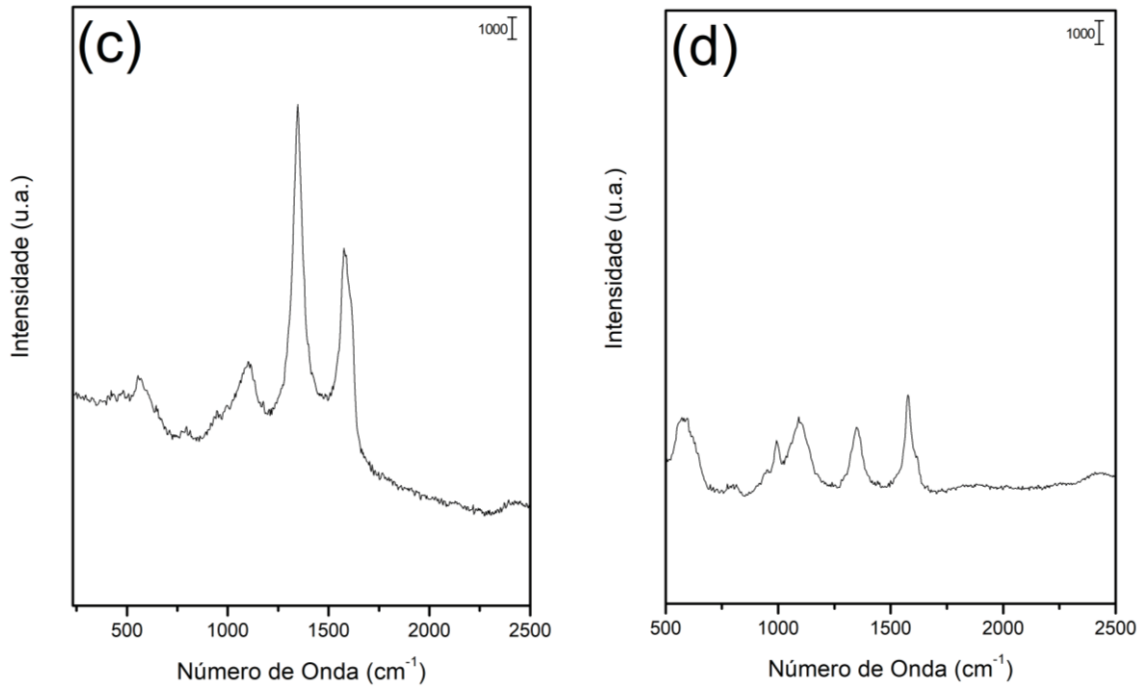
O terceiro fator foi a ausência de secagem adequada do conjunto substrato com pesticida. Inicialmente, a aquisição do sinal era realizada imediatamente após a adição da solução do analito sobre o substrato. Entretanto, como o intervalo de

tempo de secagem se mostrou importante para a otimização da intensidade do sinal SERS, como consta em (JUNIOR et al., 2018; SALLUM et al., 2014b) foi aplicado a secagem por 1 hora do conjunto substrato + pesticida.

Com o ajuste destes pontos, os espectros dos pesticidas foram novamente coletados onde é possível observar sinais relacionados com os analitos de interesse, como consta na FIGURA 23. A simazina e o carbaril foram selecionados para serem utilizados nos ensaios do planejamento fatorial de experimentos. Porém, nas condições do primeiro planejamento empregado (planejamento fatorial fracionário) não houveram variações significativas de sinal SERS, impedindo a utilização das respostas dos pesticidas na seleção das variáveis mais significativas.

FIGURA 23 – ESPECTROS RAMAN DOS PESTICIDAS: (a) SIMAZINA; (b) ATRAZINA; (c) CARBARIL; (d) AMETRINA.





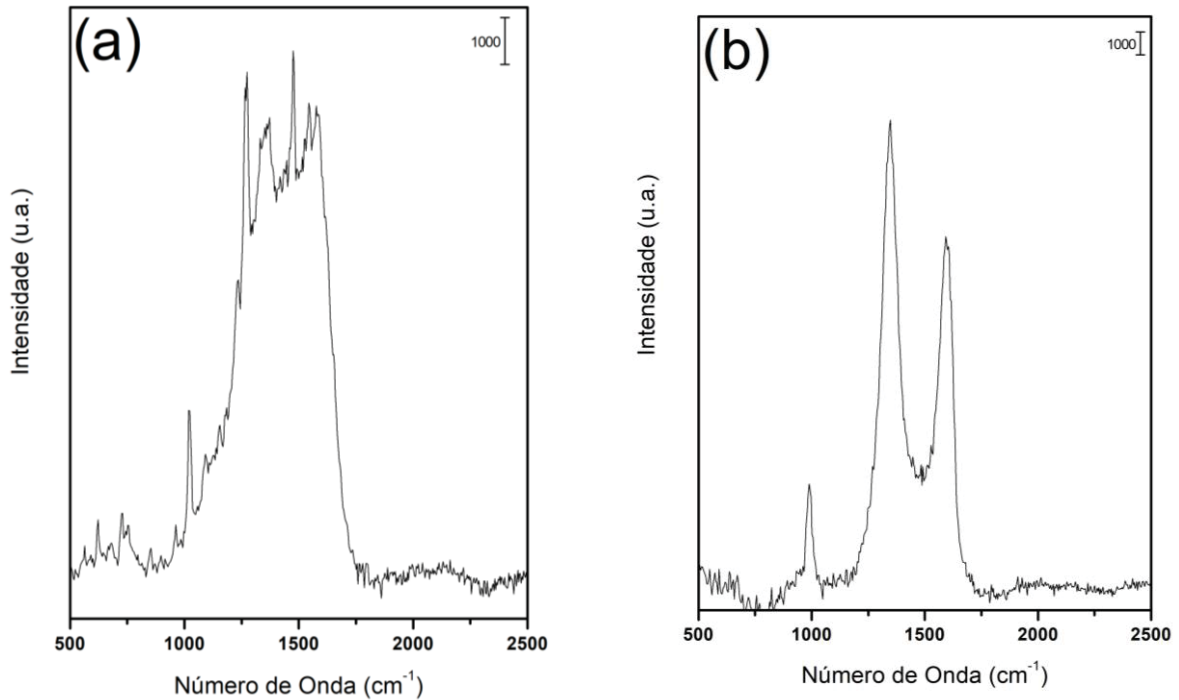
Fonte: O autor (2024)

Dessa forma, escolheu-se trabalhar apenas com a sonda SERS (4-ATP) e, após as modificações do planejamento, selecionar a melhor condição de síntese para utilizar posteriormente nos analitos de interesse.

Após a otimização da condição de síntese, de acordo com os resultados do planejamento Box-Behnken foram realizados novos testes para a detecção dos pesticidas utilizando a técnica SERS. Para isso, buscou-se pesticidas que continham, em sua estrutura, átomos de enxofre como no 4-ATP.

Nesse contexto, o filme foi testado em outros pesticidas, sendo eles o Carbazim e o Tiabendazol. Ambos os sinais detectados foram intensos e próximos aos valores obtidos para o 4-ATP, entretanto, a maior parte do sinal referente aos analitos são de bandas espectrais com frequências próximas as bandas D e G do grafeno, gerando uma sobreposição de sinais. Estes analitos poderão ser estudados em trabalhos futuros com o auxílio de ferramentas quimiométricas. Na FIGURA 24 estão os espectros Raman dos pesticidas, respectivamente.

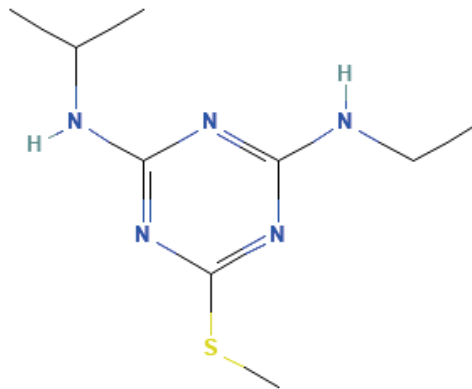
FIGURA 24 – ESPECTROS RAMAN FILME rGO/AgNPs OTIMIZADA PELO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN DE: (a) CARBENDAZIM; (b) THIABENDAZOL.



Fonte: O autor (2024)

Em seguida, foram avaliados pesticidas que contenham mais de um grupo facilmente adsorvidos em superfícies metálicas, como os grupo amino, reportado extensivamente na literatura (PANG; YANG; HE, 2016). Desta forma, iniciou-se testes com o herbicida amplamente utilizado na agricultura, a ametrina, cuja representação molecular contém tanto o grupo tioéter quanto grupos amino. A FIGURA 25 apresenta a estrutura química da ametrina.

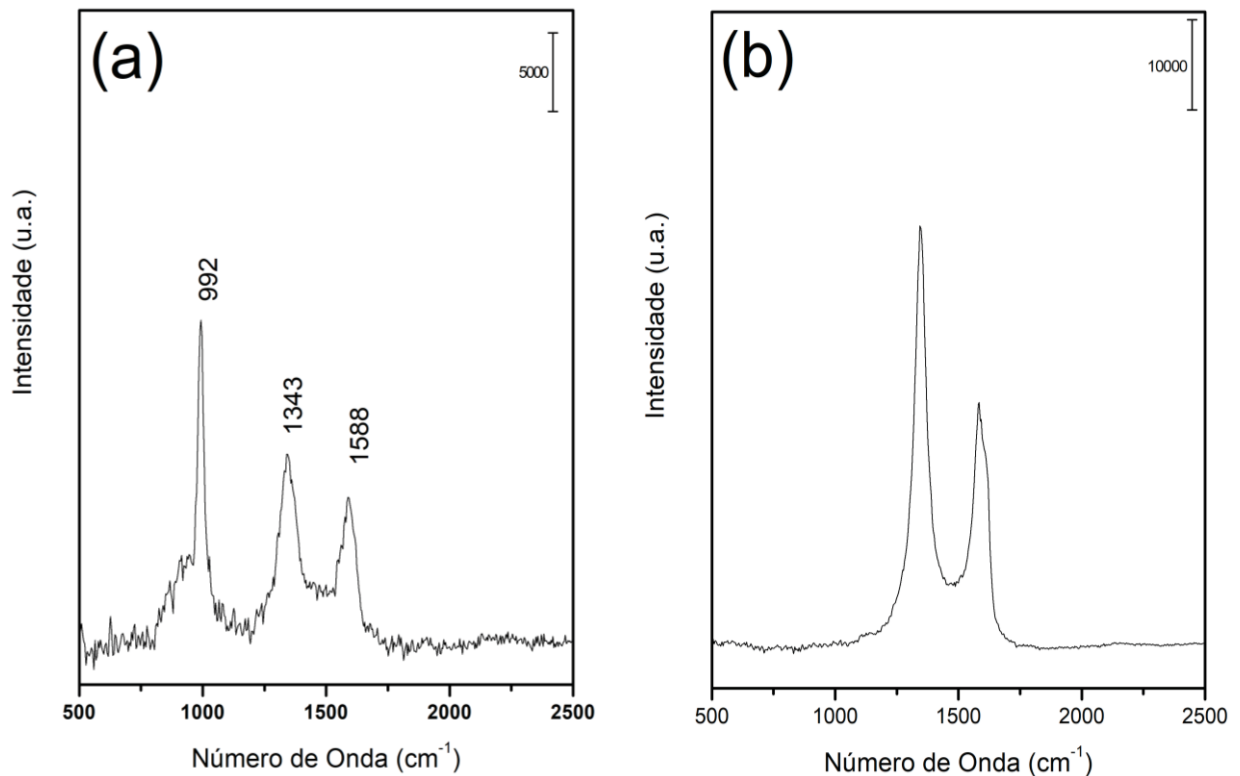
FIGURA 25 – ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DO HERBICIDA AMETRINA.



A identificação deste herbicida se torna relevante uma vez que seu potencial no controle de pragas, seu uso prolongado e inadequado representa uma ameaça ao meio ambiente, contaminando fontes de água com resíduos persistentes que

geram preocupações sobre o potencial de transferência para a cadeia alimentar, uma vez que fatores como a proximidade de plantações a fontes de água contaminadas e a interação entre diferentes produtos no comércio podem difundir a sua contaminação cruzada (CHEN et al., 2015, 2015; MNYANDU; MAHLAMBI, 2021; YANG et al., 2024). Além disso, a ametrina já foi utilizada em SERS em trabalhos anteriores (CHEN et al., 2015; SANTOS COSTA et al., 2009) de forma a facilitar a sua comparação com espectros já relatados na literatura. Após a aquisição do sinal SERS, foi detectado a ametrina com espectro de acordo com os reportados, como consta na FIGURA 26 (a).

FIGURA 26 – (a) ESPECTROS RAMAN DA AMETRINA EM FILME rGO/AgNPs OTIMIZADA PELO PLANEJAMENTO BOX-BEHNKEN, (b) ESPECTRO RAMAN DO FILME rGO/AgNPs.



Fonte: O autor (2024)

No espectro SERS da ametrina, a banda atribuída ao modo de respiração (*breathing*) do anel é deslocada para 992 cm⁻¹, o que é típico para a interação de cicloaminas com superfícies metálicas. As bandas em 1343 e 1588 cm⁻¹, respectivamente, são atribuídas as combinações dos modos vibracionais $\nu(\text{NC})_{\text{anel}} + \delta\text{CH} + \delta\text{NH}$ e $\nu(\text{NC})_{\text{anel}} + \delta\text{NH}$, sendo a banda 1343 cm⁻¹ atribuída ao estiramento do anel sugerindo interação do átomo de nitrogênio do anel com a superfície de prata

(SANTOS COSTA et al., 2009). Uma hipótese que pode ser investigada é que as bandas em 1343 e 1588 cm^{-1} que estão presentes na molécula da ametrina podem ter sido sobrepostas pelas bandas D e G do filme rGO/AgNPs, como mostra a FIGURA 26 (b), uma vez que os espectros das bandas dependem dos tipos de nanopartículas (Au ou Ag) e dos formatos das nanopartículas. As atribuições, de forma detalhada, do espectro Raman da ametrina, está na TABELA 10.

TABELA 10 – ATRIBUIÇÕES DAS BANDAS DA AMETRINA PRESENTES NOS ESPECTRO RAMAN.

Ametrina número de onda (cm^{-1})*	Ametrina $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ no compósito rGO/AgNPs (Box-Behken)	Ametrina $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ no compósito rGO/AgNPs (casca)	Atribuições**
552	-	586	δNH
-	-	595	δNH
722	-	716	$\delta(\text{NC})_{\text{anel}} \text{ fora do plano}$
928	-	914	$\nu(\text{NC})_{\text{anel}} + \nu(\text{CS})$
999	992	979	$\tau(\text{CH}_3) + \nu(\text{NC})_{\text{anel}}$
1066	-	1057	$\nu(\text{NC})_{\text{anel}} + \delta(\text{NH})$ + $\tau(\text{CH}_3)$
1341	1343	1347	$\nu(\text{NC})_{\text{anel}} + \delta(\text{CH})$ + $\delta(\text{NH})$
1545	1588	1584	$\nu(\text{NC})_{\text{anel}} + \delta(\text{NH})$

*Obtidas pela referência (SANTOS COSTA et al., 2009)

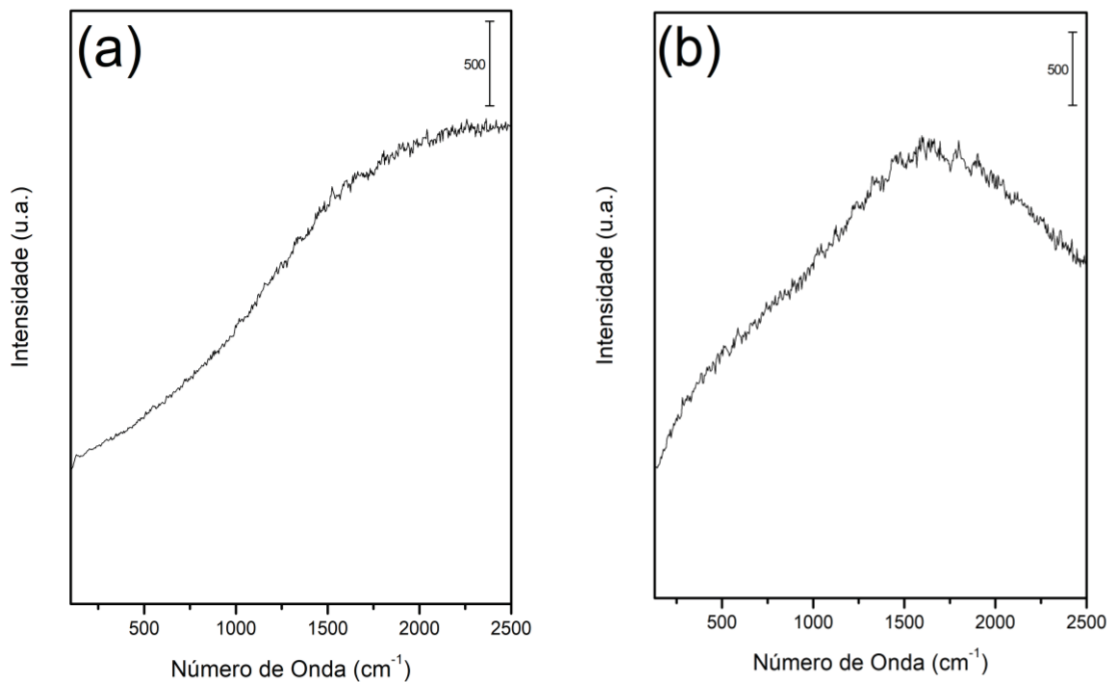
**Atribuições para os espectros Raman da Ametrina são denotadas da seguinte forma: ν = estiramento; δ = torção, τ = twisting.

A seguir, foi realizada a tentativa na detecção do herbicida em casca de alimentos. Para isso, inicialmente, foi avaliado o espectro Raman do herbicida gotejado diretamente em cascas de maçã e batata, respectivamente, sem a aplicação do substrato rGO/AgNPs como consta na FIGURA 27 (a) e (b), respectivamente. Os espectros foram obtidos com uma potência de laser incidente de 5 mW e tempo de integração de 0,5 segundos. Em ambos os sinais, é possível observar apenas fenômeno de fluorescência, uma vez que os analitos se encontram em uma concentração baixa para o Raman convencional ($1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), e a

casca da maçã e a casca da batata apresentam diversos compostos fluorófos que são facilmente excitados pelo laser de 532 nm, gerando o fenômeno da fluorescência.

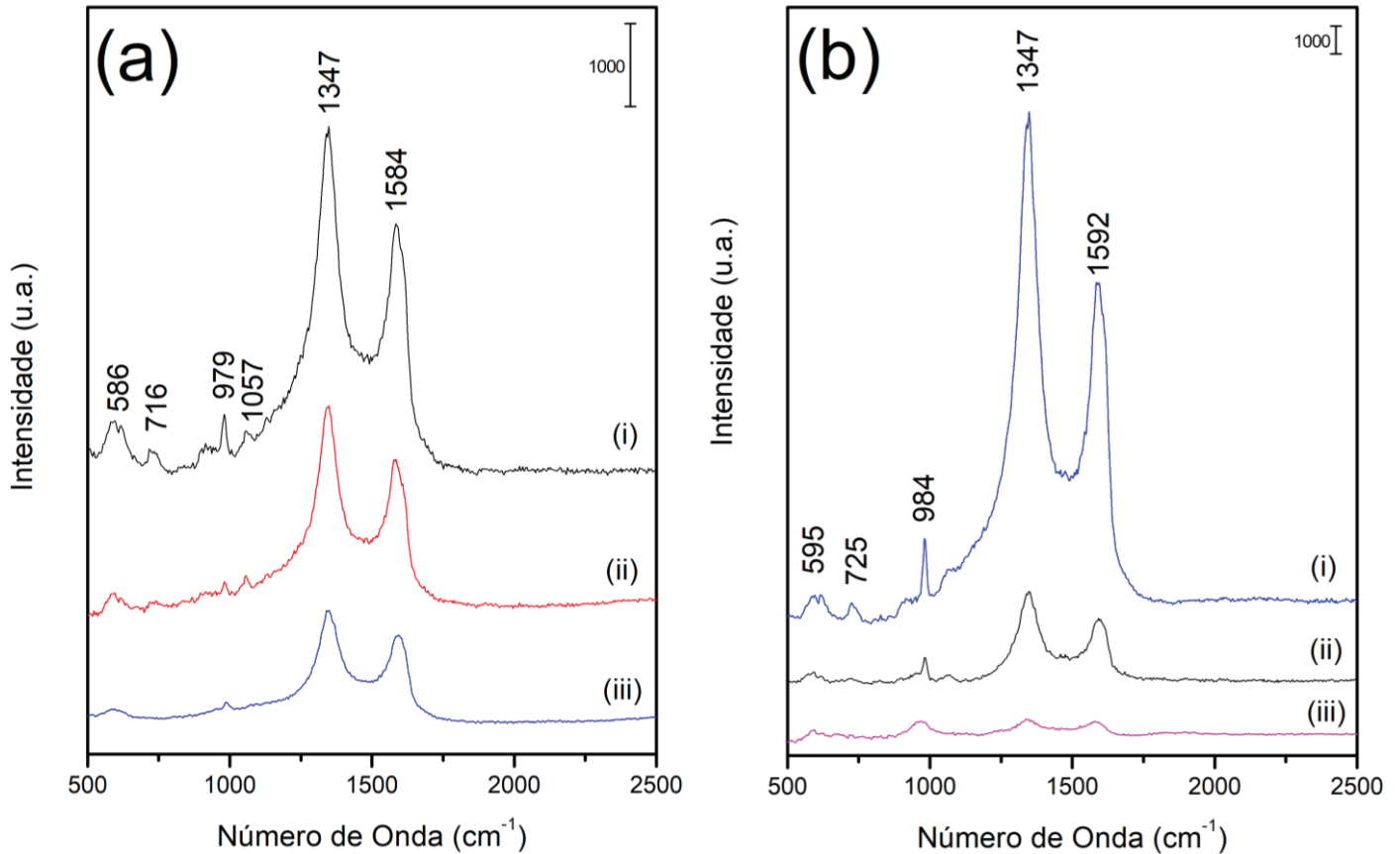
A FIGURA 28 mostra os espectros Raman da ametrina depositada em casca de maçã e batata, ambos com o substrato rGO/AgNPs, com uma potência de laser incidente de 5 mW e tempo de integração de 0,5 segundos. As bandas em 1343 e 1588 cm^{-1} , respectivamente, aparecem também nas cascas de maçã e batata, como consta na FIGURA 28 (a) e (b).

FIGURA 27 – ESPECTROS RAMAN DE AMETRINA DEPOSITADA DIRETAMENTE EM CASCA DE (a) MAÇÃ; (b) BATATA.



Fonte: O autor (2024)

FIGURA 28 – ESPECTROS RAMAN DE AMETRINA COM rGO/AgNPs BOX-BEHNKEN DEPOSITADA DIRETAMENTE EM CASCA DE (a) MAÇÃ (i) 10^{-4} mol L $^{-1}$; (ii) 10^{-5} mol L $^{-1}$ e (iii) 10^{-7} mol L $^{-1}$; (b) BATATA (i) 10^{-4} mol L $^{-1}$; (ii) 10^{-5} mol L $^{-1}$ e (iii) 10^{-7} mol L $^{-1}$.



Fonte: O autor (2024)

Com o uso do substrato, além do incremento do número de fótons espalhados, típico do efeito SERS, é possível observar uma supressão da fluorescência devido ao recobrimento da casca com a estrutura de rGO/AgNPs, que atua como uma barreira protetora para a excitação dos compostos fluoróforos das cascas. Desta forma, foi possível observar o sinal espectral do herbicida diretamente na superfície das cascas da maçã e batata, sem nenhuma etapa de extração ou clean-up da amostra. Apenas com a adição do substrato diretamente sobre a casca contaminada. Os espectros SERS foram obtidos em concentrações de 10^{-4} mol L $^{-1}$, 10^{-5} mol L $^{-1}$ e 10^{-7} mol L $^{-1}$ e foi realizado em duplicata. Como esperado, em baixas concentrações de ametryn ($1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$), a intensidade do sinal SERS diminui, porém, esses resultados mostram que a aplicação de uma curva analítica para a detecção da ametryn (mesmo em concentrações baixas de $1,0 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$) é bastante promissor.

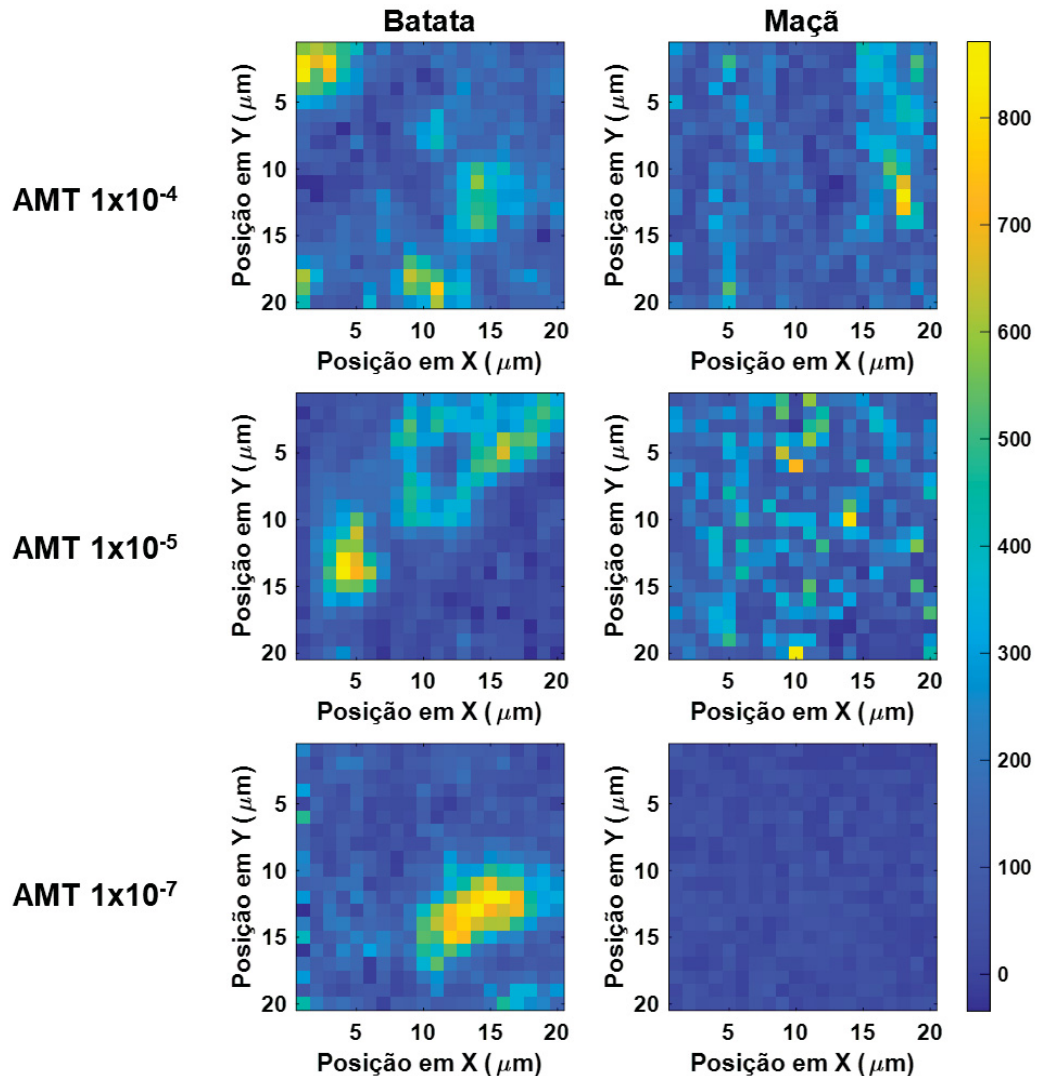
Para garantir a reprodutibilidade da aquisição do sinal, foram realizadas medidas de imageamento hiperespectral das cascas de batata e maçã com diferentes níveis de concentração de ametrina, após a aplicação do substrato rGO/AgNPs. Para isso, foram mapeadas áreas de 20 x 20 μm , com passo de 1 μm , das amostras com o substrato para SERS. Foram obtidos espectros com 10 acumulações de 0,5 segundos, resultando em imagens hiperespectrais em menos de 30 minutos. Vale ressaltar que as condições de imagens ainda podem ser otimizadas, e pode-se detectar o analito com tempos ainda menores de aquisição.

A FIGURA 29 mostra as imagens hiperespectrais para a ametrina em diferentes concentrações nas cascas de batata e maçã, onde a barra de cores representa a intensidade do sinal da ametrina em 975 cm^{-1} . Desta forma, quanto mais amarelo é a coloração da imagem, maior é a intensidade do sinal para a ametrina naquela região. Em contrapartida, quanto mais azul é a coloração da imagem, menor é o sinal da ametrina na região analisada.

Pelas imagens hiperespectrais é possível observar a facilidade em detectar a ametrina mesmo em concentrações baixas ($1,0 \times 10^{-7}\text{ mol L}^{-1}$) com o mínimo de preparo de amostras. A amostra de batata, por apresentar menos compostos fenólicos em sua casca do que a maçã, mostrou-se mais sensível para a detecção de ametrina, entretanto, foi possível encontrar regiões com alta quantidade do analito localizada na casca de ambos os alimentos.

Convém mencionar que apesar da detecção do sinal para o analito, existe uma alta heterogeneidade do sinal, o que é esperado por se tratar de uma técnica que ainda apresenta uma certa falta de reprodutibilidade, como a SERS, aliada a detecção de amostras sólidas que apresentam um comportamento muito mais homogêneo do que amostras sólidas.

FIGURA 29 – IMAGEAMENTO HIPERESPECTRAL PARA A AMETRINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES EM CASCAS DE BATATA E MAÇÃ.



Fonte: O autor (2024)

Entretanto, o uso de imageamento hiperespectral possibilita uma maior amostragem para análise, garantindo maior robustez dos resultados. Apesar das variações observadas no sinal de espalhamento SERS, os resultados observados mostram o potencial da técnica para aplicação de detecção de pesticida diretamente em casca de alimentos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível otimizar a síntese de nanopartículas de prata em óxido de grafeno reduzido, utilizando-se dois delineamentos experimentais (um fracionário e um Box-Behnken) para intensificar o sinal SERS. A dispersão obtida utilizando a síntese otimizada foi cerca de 8 vezes maior que a condição experimental inicial e, aproximadamente, 21500 vezes maior que a análise Raman tradicional. O material otimizado foi caracterizado com o intuito de compreender de forma significativa como as alterações dos fatores estudados refletem nas propriedades do material. O melhor material, portanto, teve as seguintes condições de síntese: 7,0 mg de nitrato de prata, 1000 RPM, 60 minutos de tempo de dispersão, 150 mg de borohidreto de sódio, $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ de óxido de grafeno e 45 minutos de tempo de redução.

As cascas de alimentos contaminadas com o herbicida aos quais foram depositados os filmes rGO/AgNPs foram mapeadas por imageamento Raman e os dados foram tratados com diferentes processamentos para a geração de um vetor global por imagem que foram correlacionados com as concentrações do herbicida. Através das imagens foi possível detectar o herbicida em baixas concentrações, cerca de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ com o mínimo de preparo de amostras.

Dessa forma, este trabalho demonstra a capacidade do método empregado para detectar o herbicida ametrina diretamente em cascas de maçã e batata, além de ser possível detectar outros pesticidas. A técnica SERS surge como uma ferramenta alternativa para o desenvolvimento de métodos analíticos mais rápidos, baratos e ecologicamente corretos em comparação com abordagens tradicionais.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Apesar das pequenas variações observadas no sinal de espalhamento SERS, um dos próximos passos seria no desenvolvimento de uma curva analítica baseada em padrão interno usando este método para validação, a utilização de AuNPs ao invés de AgNPs testando tanto em casca de alimentos como em suco de frutas a partir de referência de acordo com a literatura. Outra recomendação seria a utilização de algoritmos quimiométricos para a análise de outros pesticidas como o carbedanzim e o tiabendazol.

REFERÊNCIAS

ALAK, A. M.; VO-DINH, TUAN. Surface-enhanced Raman spectrometry of organo phosphorus chemical agents. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 2149–2153, 1 set. 1987.

ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, n. 15, p. 5215–5217, jun. 1977.

AROCA, R. **Surface enhanced vibrational spectroscopy**. Hoboken, NJ: Wiley, 2006.

BERGE, M. et al. Optimization of experimental conditions by surface enhanced Raman Scattering (SERS) spectroscopy with gold nanoparticles suspensions. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 268, p. 120628, mar. 2022.

BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 73–89, mar. 2007.

BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. [s.l.] Editora da Unicamp, 2005.

CHEN, Y. et al. Quantitative determination of ametryn in river water using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with an advanced chemometric model. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 142, p. 166–171, mar. 2015.

D'AGOSTINO, A. et al. In situ seed-growth synthesis of silver nanoplates on glass for the detection of food contaminants by surface enhanced Raman scattering. **Talanta**, v. 216, p. 120936, ago. 2020.

FERNÁNDEZ-MERINO, M. J. et al. Identifying efficient natural bioreductants for the preparation of graphene and graphene-metal nanoparticle hybrids with enhanced catalytic activity from graphite oxide. **Carbon**, v. 63, p. 30–44, nov. 2013.

FERRARI, A. C. et al. Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers. **Physical Review Letters**, v. 97, n. 18, p. 187401, 30 out. 2006.

FERRARI, A. C. Raman spectroscopy of graphene and graphite: Disorder, electron–phonon coupling, doping and nonadiabatic effects. **Solid State Communications**, v. 143, n. 1–2, p. 47–57, jul. 2007.

FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163–166, maio 1974.

FONSACA, J. E. S. et al. Tailoring multifunctional graphene-based thin films: from nanocatalysts to SERS substrates. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 5, n. 20, p. 9591–9603, 2017.

FRIEDRICH, K. et al. Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. e00061820, 2021.

HAN, X. X. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, p. 87, 6 jan. 2022.

HAYNES, C. L.; MCFARLAND, A. D.; VAN DUYN, R. P. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 17, p. 338 A-346 A, 1 set. 2005.

HUMMERS, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of Graphitic Oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339–1339, mar. 1958.

JAMSHIDNEZHAD, M. **Experimental design in petroleum reservoir studies**. Oxford, UK: Elsevier : Gulf Professional Publishing, 2015.

JEANMAIRE, D. L.; VAN DUYN, R. P. Surface raman spectroelectrochemistry. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 84, n. 1, p. 1–20, nov. 1977.

JIANG, Y. et al. Highly durable graphene-mediated surface enhanced Raman scattering (G-SERS) nanocomposites for molecular detection. **Applied Surface Science**, v. 450, p. 451–460, ago. 2018.

JUNIOR, B. R. A. et al. Determination of B-complex vitamins in pharmaceutical formulations by surface-enhanced Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 188, p. 589–595, jan. 2018.

KELLY, K. L. et al. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 1 jan. 2003.

KIM, K.; CHOI, J.-Y.; SHIN, K. S. Surface-Enhanced Raman Scattering of 4-Nitrobenzenethiol and 4-Aminobenzenethiol on Silver in Icy Environments at Liquid Nitrogen Temperature. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 21, p. 11397–11403, 29 maio 2014.

KLEINMAN, S. L. et al. Creating, characterizing, and controlling chemistry with SERS hot spots. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 15, n. 1, p. 21–36, 2013.

KUBACKOVA, J. et al. Sensitive Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Detection of Organochlorine Pesticides by Alkyl Dithiol-Functionalized Metal Nanoparticles-Induced Plasmonic Hot Spots. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 663–669, 6 jan. 2015.

LIGNANI, L. D. B.; BRANDÃO, J. L. G. A ditadura dos agrotóxicos: o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas e as mudanças na produção e no consumo de pesticidas no Brasil, 1975-1985. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 29, n. 2, p. 337–359, jun. 2022.

LIU, S. **Bioprocess engineering: kinetics, sustainability, and reactor design**. Third edition ed. Amsterdam, Netherlands ; Cambridge, MA: Elsevier, 2020.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. D. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, jun. 2018.

LU, G. et al. Surface enhanced Raman scattering of Ag or Au nanoparticle-decorated reduced graphene oxide for detection of aromatic molecules. **Chemical Science**, v. 2, n. 9, p. 1817, 2011.

MA, Y. et al. Rapid and sensitive on-site detection of pesticide residues in fruits and vegetables using screen-printed paper-based SERS swabs. **Analytical Methods**, v. 10, n. 38, p. 4655–4664, 2018.

MAIER, S. A. **Plasmonics: Fundamentals and Applications**. New York, NY: Springer US, 2007.

MALARD, L. M. et al. Raman spectroscopy in graphene. **Physics Reports**, v. 473, n. 5–6, p. 51–87, abr. 2009.

MEHL, H. et al. THE EFFECT OF VARIATION OF REACTIONAL PARAMETERS IN THE PREPARATION OF GRAPHENE BY OXIDATION AND REDUCTION OF GRAPHITE. **Química Nova**, 2014.

MEHL, H.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. Thin and transparent films of graphene/silver nanoparticles obtained at liquid–liquid interfaces: Preparation,

characterization and application as SERS substrates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 438, p. 29–38, jan. 2015.

MNYANDU, H. M.; MAHLAMBI, P. N. Optimization and application of QuEChERS and SPE methods followed by LC-PDA for the determination of triazines residues in fruits and vegetables from Pietermaritzburg local supermarkets. **Food Chemistry**, v. 360, p. 129818, out. 2021.

MOTA, A. L. C. et al. Exposição a agrotóxicos e o risco de tumores do Sistema Nervoso Central em crianças: revisão sistemática com metanálise. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 28, n. 9, p. 2583–2594, set. 2023.

NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. v. 1, 2016.

ONOKWAI, A. O. et al. Application of Response Surface Methodology (RSM) for the optimization of energy generation from Jebba hydro-power plant, Nigeria. **ISH Journal of Hydraulic Engineering**, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2 jan. 2022.

ORENDORFF, C. J. et al. Aspect ratio dependence on surface enhanced Raman scattering using silver and gold nanorod substrates. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 8, n. 1, p. 165–170, 2006.

OSAWA, M. et al. Charge transfer resonance Raman process in surface-enhanced Raman scattering from p-aminothiophenol adsorbed on silver: Herzberg-Teller contribution. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 98, n. 48, p. 12702–12707, dez. 1994.

OTTO, A. The ‘chemical’ (electronic) contribution to surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 36, n. 6–7, p. 497–509, jun. 2005.

OTTO, M. **Chemometrics: Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2016.

PANG, S.; YANG, T.; HE, L. Review of surface enhanced Raman spectroscopic (SERS) detection of synthetic chemical pesticides. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 73–82, dez. 2016.

PAREDES, J. I. et al. Graphene Oxide Dispersions in Organic Solvents. **Langmuir**, v. 24, n. 19, p. 10560–10564, 7 out. 2008.

PARK, S.; LEE, J.; KO, H. Transparent and Flexible Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Sensors Based on Gold Nanostar Arrays Embedded in Silicon Rubber Film. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 50, p. 44088–44095, 20 dez. 2017.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. (EDS.). **E veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Fiocruz, 2003.

PROCHAZKA, M. **Surface-Enhanced Raman Spectroscopy**. Cham: Springer International Publishing, 2016.

PUSTOVIT, V. N.; SHAHBAZYAN, T. V. Quantum-size effects in SERS from noble-metal nanoparticles. **Microelectronics Journal**, v. 36, n. 3–6, p. 559–563, mar. 2005.

QU, J. et al. Facile synthesis of multifunctional graphene oxide/AgNPs-Fe₃O₄ nanocomposite: A highly integrated catalysts. **Chemical Engineering Journal**, v. 211–212, p. 412–420, nov. 2012.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A New Type of Secondary Radiation. **Nature**, v. 121, n. 3048, p. 501–502, mar. 1928.

RAMOS, M. K.; ZARBIN, A. J. G. Graphene/copper oxide nanoparticles thin films as precursor for graphene/copper hexacyanoferrate nanocomposites. **Applied Surface Science**, v. 515, p. 146000, jun. 2020.

RODRIGUES, A. D. G. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. [s.d.].

SALLUM, L. F. et al. Optimization of SERS scattering by Ag-NPs-coated filter paper for quantification of nicotinamide in a cosmetic formulation. **Talanta**, v. 118, p. 353–358, jan. 2014a.

SALLUM, L. F. et al. Determination of acetylsalicylic acid in commercial tablets by SERS using silver nanoparticle-coated filter paper. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 107–111, dez. 2014b.

SANTOS COSTA, J. C. et al. High performance gold nanorods and silver nanocubes in surface-enhanced Raman spectroscopy of pesticides. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 34, p. 7491, 2009.

SCHATZ, G. C.; VAN DUYN, R. P. Electromagnetic Mechanism of Surface-Enhanced Spectroscopy. Em: CHALMERS, J. M.; GRIFFITHS, P. R. (Eds.). **Handbook of Vibrational Spectroscopy**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2001.

SCHLÜCKER, S. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Concepts and Chemical Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 19, p. 4756–4795, 5 maio 2014.

SHARMA, S. et al. Raman Spectroscopy-Based Chemometrics for Pesticide Residue Detection: Current Approaches and Future Challenges. **ACS Agricultural Science & Technology**, v. 4, n. 4, p. 389–404, 15 abr. 2024.

SOUZA, V. H. R. et al. Flexible, Transparent and Thin Films of Carbon Nanomaterials as Electrodes for Electrochemical Applications. **Electrochimica Acta**, v. 197, p. 200–209, abr. 2016.

SU, C.-Y. et al. Electrical and Spectroscopic Characterizations of Ultra-Large Reduced Graphene Oxide Monolayers. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 23, p. 5674–5680, 8 dez. 2009.

SUN, L. et al. Ethanol-Induced Formation of Silver Nanoparticle Aggregates for Highly Active SERS Substrates and Application in DNA Detection. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 5, p. 1415–1422, 1 fev. 2008.

TONG, Q. et al. Recent progressive preparations and applications of silver-based SERS substrates. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 106, p. 246–258, set. 2018.

UETSUKI, K. et al. Experimental Identification of Chemical Effects in Surface Enhanced Raman Scattering of 4-Aminothiophenol. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 16, p. 7515–7520, 29 abr. 2010.

WANG, H. et al. Nanocrystal Growth on Graphene with Various Degrees of Oxidation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 10, p. 3270–3271, 17 mar. 2010.

WANG, S.-Y. et al. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy using silver and gold nanoparticles for the detection of pesticides in fruit and fruit juice. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 583–602, out. 2021a.

WANG, S.-Y. et al. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy using silver and gold nanoparticles for the detection of pesticides in fruit and fruit juice. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 583–602, out. 2021b.

WANG, T.; HU, X.; DONG, S. Surfactantless Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanostructures and Their Shape-Dependent SERS Spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 34, p. 16930–16936, 1 ago. 2006.

WANG, Y. et al. Surface enhanced Raman scattering of p-aminothiophenol self-assembled monolayers in sandwich structure fabricated on glass. **The Journal of Chemical Physics**, v. 124, n. 7, p. 074709, 21 fev. 2006.

XU, W. et al. Graphene-Veiled Gold Substrate for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **Advanced Materials**, v. 25, n. 6, p. 928–933, 13 fev. 2013.

YADAV, A. K.; SINGH, P. A review of the structures of oxide glasses by Raman spectroscopy. **RSC Advances**, v. 5, n. 83, p. 67583–67609, 2015.

YANG, Y. et al. Insights into interaction of triazine herbicides with three kinds of different alkyl groups (simetryne, ametryn and terbutryn) with human serum albumin via multi-spectral analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 201, p. 105895, maio 2024.

YASEEN, T.; SUN, D.-W.; CHENG, J.-H. Raman imaging for food quality and safety evaluation: Fundamentals and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 177–189, abr. 2017.

ZARBIN, A. J. G. Liquid–liquid interfaces: a unique and advantageous environment to prepare and process thin films of complex materials. **Materials Horizons**, v. 8, n. 5, p. 1409–1432, 2021.

ZHANG, Z. et al. A facile one-pot method to high-quality Ag-graphene composite nanosheets for efficient surface-enhanced Raman scattering. **Chemical Communications**, v. 47, n. 22, p. 6440, 2011.