

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**Explorando o potencial da Espectroscopia de Absorção no Infravermelho
Intensificada por Superfície (SEIRA) com quantum dots**

FELIPE CUNHA DA SILVA TRINDADE

RECIFE

2024

FELIPE CUNHA DA SILVA TRINDADE

Explorando o potencial da Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Intensificada por Superfície (SEIRA) com quantum dots

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Prof. Dra. Claudete Fernandes Pereira.

RECIFE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Trindade, Felipe Cunha da Silva.

Explorando o potencial da espectroscopia de absorção no infravermelho intensificada por superfície (SEIRA) com quantum dots / Felipe Cunha da Silva Trindade. - Recife, 2024.

105 f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.

Orientação: Claudete Fernandes Pereira.

Inclui referências e apêndices.

1. SEIRA; 2. Pontos quânticos; 3. Atrazina; 4. Infravermelho;
5. PCA. I. Pereira, Claudete Fernandes. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

FELIPE CUNHA DA SILVA TRINDADE

***“EXPLORANDO O POTENCIAL DA ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO
INFRAVERMELHO INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE (SEIRA) COM QUANTUM
DOTS”***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 27/08/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Claudete Fernandes Pereira (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof.^a. Dr.^a. Laís Araújo Souza (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Javier Erick Lobatón Villa (Examinador Externo)

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Prof.^a. Dr.^a. Livia Paulia Dias Ribeiro (Examinadora Externa)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro - Brasileira - UNILAB

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar a Deus pela saúde e resiliência neste período de doutorado;
- À família, em especial minha esposa Eunice Freitas e aos meus pais, Flávio da Silva Trindade e Maria do Socorro Cunha;
- Ao meu avô, João da Silva Trindade;
- À minha orientadora Claudete. F. Pereira;
- Às agências de fomento:
 - CNPq pela bolsa e outros recursos financeiros concedidos;
 - INCTAA pela bolsa ao final do doutorado e recursos financeiros diversos;
 - CAPES e FACEPE;
 - UFPE, DQF, LITPEG, LAC;
- Aos meus amigos e colegas de laboratório ao longo desses anos, não citarei nomes pois seria injusto com alguém.

RESUMO

Métodos analíticos de monitoramento e quantificação de poluentes ambientais, como pesticidas, corantes ou fármacos descartados inadequadamente, possuem bastante relevância para a sociedade contemporânea devido aos problemas de saúde ocasionados por contaminações na água. Assim, técnicas com potencial de serem rápidas, não destrutivas e robustas são excelentes para esses propósitos. A espectroscopia de absorção no infravermelho intensificada por superfície (SEIRA), é uma técnica promissora, a qual permite estudos analíticos envolvendo diversos tipos de substâncias, além do monitoramento de fenômenos químicos e bioquímicos. No presente trabalho se utilizou pontos quânticos (QDs) de cobre ($\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$) e prata ($\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$), sintetizados em meio aquoso em síntese *one-pot* (com intuito de diminuir o custo de produção e minimizar danos ambientais), para estudar os efeitos de intensificação de sinal de absorção no infravermelho (IR) de moléculas de corantes orgânicos e do herbicida atrazina (ATZ), o qual é utilizado para controle de pragas em plantações de cana de açúcar podendo causar sérios riscos ao ser humano, como câncer no sistema linfático e problemas no sistema reprodutor, se mal administrado (superdosagem). Para tal, utilizou-se um equipamento infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e módulo de reflectância total atenuada (ATR) com 1 (uma) reflexão interna. Foram obtidos resultados promissores para o corante cristal violeta (CV) a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com intensificações de até 2,4 e 3,8 vezes, utilizando-se $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ e $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$, respectivamente. Em seguida, os estudos com ATZ foram realizados apenas com $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ em duas abordagens, na univariada foi possível obter intensificações de aproximadamente 90 vezes para uma concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Enquanto na multivariada, utilizou-se Análise de Componentes Principais (PCA) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS). Através da PCA, foram calculados os fatores de intensificação multivariados (MEFs) e com PLS, determinou-se o limite de detecção de até 1,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por fim, por meio de uma abordagem qualitativa, medidas SEIRA permitiram detecção de atrazina em concentração tão baixa quanto 0,001 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o que demonstra a capacidade da técnica de obter limites de detecção tão baixos quanto os exigidos pela legislação brasileira atual.

Palavras-chave: SEIRA, Pontos quânticos (QDs), atrazina, infravermelho, PCA.

ABSTRACT

Analytical methods for monitoring and quantifying environmental pollutants, such as pesticides, dyes, or improperly discarded pharmaceuticals, are highly relevant to contemporary society due to the health problems caused by water contamination. Therefore, techniques that are potentially rapid, non-destructive, and robust are excellent for these purposes. Surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (SEIRA) is a promising technique that allows analytical studies involving various types of substances, as well as the monitoring of chemical and biochemical phenomena. In the present work, copper ($\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$) and silver ($\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$) quantum dots (QDs), synthesized in an aqueous medium via one-pot synthesis (aiming to reduce production costs and minimize environmental damage), were used to study the effects of infrared (IR) absorption signal enhancement of organic dye molecules and the herbicide atrazine (ATZ), which is used for pest control in sugarcane plantations and can pose serious risks to humans, such as lymphatic system cancer and reproductive system problems, if mismanaged (overdosage). For this purpose, a Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometer with an attenuated total reflectance (ATR) module with one internal reflection was used. Promising results were obtained for the crystal violet (CV) dye at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with enhancements of up to 2.4 and 3.8 times, using $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ and $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$, respectively. Subsequently, studies with ATZ were conducted only with $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ in two approaches: in the univariate approach, enhancements of approximately 90 times were achieved for a concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the multivariate approach, Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares Regression (PLS) were used. Through PCA, multivariate enhancement factors (MEFs) were calculated, and with PLS, a detection limit of up to 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was determined. Finally, through a qualitative approach, SEIRA measurements allowed the detection of atrazine at concentrations as low as 0.001 $\mu\text{g}/\text{mL}$, demonstrating the technique's ability to achieve detection limits as low as those required by current Brazilian legislation.

Keywords: SEIRA, Quantum Dots (QDs), atrazine, infrared, PCA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Espectro eletromagnético reduzido do ultravioleta até o infravermelho.	18
Figura 2	Linha do tempo da evolução das espectroscopias Raman e de Infravermelho.	21
Figura 3	Varição da absorção de acordo com o aumento da espessura do filme de prata até 6 nm.	25
Figura 4	Modelo exemplificando uma medida de reflectância total atenuada (ATR).	26
Figura 5	Ilustração do efeito da Ressonância de Superfície Plasmônica.	29
Figura 6	Oscilação plasmônica em partículas esféricas demonstrando o deslocamento da nuvem eletrônica em relação ao núcleo.	30
Figura 7	Ilustração de um esquema para validação cruzada total.	38
Figura 8	Equipamento de FT-IR utilizado nas medições.	43
Figura 9	Método 1 para análise de SEIRA.	44
Figura 10	Método 2 para análise de SEIRA.	45
Figura 11	Espectro FT-IR do QD de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$.	48
Figura 12	a) Microscopia eletrônica de transmissão (HRTEM) de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ e b) Histograma com distribuição de diâmetros dos pontos quânticos $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$.	49
Figura 13	Espectro FT-IR do QD de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ diluído 2 vezes.	50
Figura 14	a,b) HRTEM do QD de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$, c) Histograma com distribuição de diâmetros dos QDs de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$.	51
Figura 15	Comparação entre os espectros de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ antes (azul) e depois (preto) de procedimento para retirar excesso de estabilizante.	53
Figura 16	Espectros de soluções aquosas de corantes testados com melhor relação sinal-ruído obtidos inicialmente.	54
Figura 17	Espectros das melhores condições encontradas no estudo de otimização dos parâmetros de análise ((a) cristal violeta e (b) rodamina 6G).	56
Figura 18	Exemplos de espectros obtidos a partir do Método 1.	57
Figura 19	Comparação dos espectros médios (3 medidas) obtidos com os mesmos parâmetros entre o Método 1 (a) e Método 2 (b).	58

Figura 20	– Diluições estudadas para o QD de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$.	59
Figura 21	– Espectros SEIRA do corante cristal violeta 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ variando a diluição de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$.	60
Figura 22	– Espectros SEIRA do corante cristal violeta com concentrações variadas e concentração de NPs de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ fixa.	61
Figura 23	– Espectros SEIRA do corante CV relativos ao planejamento realizado.	63
Figura 24	– Espectros FT-IR da faixa de impressão digital das diluições feitas com QD de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$.	64
Figura 25	– Comparação entre diluições de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ mantendo-se a concentração do CV constante em 125 $\mu\text{g} / \text{mL}$	65
Figura 26	– Comparação entre diluições de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ mantendo-se a concentração do CV constante em 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$	66
Figura 27	– Espectros SEIRA do corante Cristal Violeta variando a concentração de 75 até 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e fixando o $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ em 1:1	67
Figura 28	– Espectros SEIRA do corante Cristal Violeta variando a concentração de 50 até 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e fixando o $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ em 1:3	68
Figura 29	– Estrutura dos analitos utilizados no presente trabalho. (A = Cristal ou Metil Violeta; B = Rodamina B; C = Fucsina Ácida; D = Rodamina 6G). Circulados em vermelho estão os grupos eletrofílicos.	69
Figura 30	– Fórmula estrutural da Atrazina	70
Figura 31	– Espectro de ATR/FT-IR da Atrazina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	71
Figura 32	– Espectros SEIRA da Atrazina de 25 até 150 $\mu\text{g} / \text{mL}$ com $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:3	72
Figura 33	– Espectros SEIRA da Atrazina 150 $\mu\text{g} / \text{mL}$ com $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:1 até 1:5	73
Figura 34	– Comparação entre o perfil espectral do etanol (verde) e dos pontos quânticos (azul) em relação à ATZ (vermelho).	74
Figura 35	– Espectros médios SEIRA para otimização dos fatores de diluição das nanopartículas e número de processos de pré-concentração com atrazina 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$; (a) Diluição 1:6, pré-concentrado uma vez; (b) Diluição 1:6, pré-concentrado duas vezes; (c) Diluição 1:8, pré-concentrado uma vez; (d) Diluição 1:8, pré-concentrado duas vezes	76

Figura 36 –	a) Acessórios utilizados para minimizar a interferência no processo de secagem do solvente; P1 e P2 são ponteiras de micropipeta de 1 mL e P3 tampa de vial; b,c) Modo de utilização dos acessórios na análise por ATR	77
Figura 37 –	Análise de componentes principais para avaliar a dispersão das amostras com os acessórios (P1, P2 e P3) e sem os acessórios (M0); a) gráfico de escores e b) gráfico de pesos	78
Figura 38 –	Gráfico de absorvância vs. da concentração de ATZ	80
Figura 39 –	Relação entre o fator de intensificação e a concentração de atrazina para um mesmo volume de nanopartículas no cristal de ATR.	80
Figura 40 –	Espectros IR-ATR, corrigidos por linha de base, para atrazina, Ag ₂ Se/MPA como branco e espectro SEIRA da atrazina; (a) 0,1 µg/mL, (b) 0,5 µg/mL, (c) 5 µg/mL and (d) 50 µg/mL	81
Figura 41 –	Análise de componentes principais (PCA) com amostras de ATZ com e sem Ag ₂ Se/MPA para a faixa de concentração de 0,1 µg/mL até 50 µg/mL; a) espectros utilizados na PCA na região de 1800-650 cm ⁻¹ , b) escores, c) pesos, d) MEF calculados	83
Figura 42 –	a,c) Espectros médios corrigidos com linha de base e primeira derivada com filtro SG 11 pontos, respectivamente; b,d) gráfico com dados preditos <i>versus</i> referência para o modelo de regressão por PLS para as soluções de ATZ	85
Figura 43 –	Análise exploratória com PCA para amostras SEIRA da ATZ em concentrações de 0,001 µg/mL até 0,1 µg/mL; a) escores; b) pesos	89
Figura 44 –	Espectro FT-IR/ATR da Atrazina, nanopartículas Ag ₂ Se/MPA registradas como branco e espectro SEIRA da Atrazina 0,001 µg/mL	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Comparação entre NPs utilizadas em trabalhos da literatura.	52
Tabela 2 –	Fatores de intensificação para estudo com CV e diferentes concentrações de QDs de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$.	61
Tabela 3 –	Fatores de intensificação para planejamento com CV e QDs de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$.	62
Tabela 4 –	Fatores de intensificação para estudos envolvendo CV e $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$.	68
Tabela 5 –	Fatores de intensificação relativos ao estudo inicial com atrazina e $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$.	72
Tabela 6 –	Fatores de intensificação relativos ao estudo com atrazina variando-se a diluição do ponto quântico.	73
Tabela 7 –	Configuração dos ensaios para otimização da diluição dos pontos quânticos.	75
Tabela 8 –	Novos fatores de intensificação calculados na faixa de 0.1 até 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ diluídos 7 vezes e pré-concentrados duas vezes.	79
Tabela 9 –	Síntese dos EFs obtidos no presente trabalho para CV e ATZ com os diferentes semicondutores.	81
Tabela 10 –	Fatores de intensificação multivariados (MEF) na faixa de 0,1 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.	84
Tabela 11 –	Principais métricas de avaliação dos modelos de regressão por PLS para ATZ na faixa de 0,1 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando pré-processamentos de correção de linha de base e primeira derivada	86
Tabela 12 –	Principais métricas de avaliação do modelo de regressão por PLS para ATZ na faixa de 0,001 a 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ utilizando pré-processamento de primeira derivada.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato, do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>
ATR	Reflectância Total Atenuada, do inglês <i>Attenuated Total Reflectance</i>
ATZ	Atrazina
CND	<i>Carbon Nanodots</i>
CV	Cristal Violeta
EF	Fator de Intensificação, do inglês <i>Enhancement Factor</i>
FTIR	Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-Transform Infrared</i>
FUC	Fucsina
IV	Infravermelho
LOD	Limite de Detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i>
LOQ	Limite de Quantificação, do inglês <i>Limit of Quantification</i>
LSPR	Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada, do inglês <i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
MPA	Ácido mercaptopropiônico, do inglês <i>Mercaptopropionic Acid</i>
MSA	Ácido mercaptossuccínico, do inglês <i>Mercaptosuccinic Acid</i>
NC	Nanocristal
NP	Nanopartícula
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
PCs	Componentes Principais, do inglês <i>Principal Component</i>
PFIR	<i>Peak Force Infrared Microscopy</i>
PIR	Reflexão Plasmônica Interna, do inglês <i>Plasmonic Internal Reflection</i>
QDs	<i>Quantum Dots</i>
R6G	Rodamina 6G
RB	Rodamina B
SEIRA	Absorção no Infravermelho Intensificada por Superfície, do inglês <i>Surface-enhanced Infrared Absorption</i>

SES	Espectroscopia Intensificada por Superfície, do inglês <i>Surface-enhanced Spectroscopy</i>
SERS	Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície, do inglês <i>Surface-enhanced Raman Spectroscopy</i>
SEVS	Espectroscopia Vibracional Intensificada por Superfície, do inglês <i>Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL	18
2.2	ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE (SEVS)	20
2.2.1	Efeito Eletromagnético	22
2.2.2	Efeito Químico	23
2.3	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE (SEIRA OU SEIRAS)	24
2.3.1	Uso de nanomateriais em SEIRA	28
2.3.2	Moléculas alvo em SEIRA	33
2.4	QUIMIOMETRIA	35
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVO GERAL	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4	PARTE EXPERIMENTAL	41
4.1	MATERIAIS E REAGENTES	41
4.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	41
4.3	INSTRUMENTAÇÃO	42
4.4	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO INFRAVERMELHO	43
4.5	PROCEDIMENTO PARA ANÁLISES SEIRA	44
4.6	ANÁLISE E MODELAGEM DOS DADOS ...	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO INFRAVERMELHO	48
5.1.1	Caracterização dos pontos quânticos	48
5.1.2	Avaliação espectral dos corantes e avaliação das melhores condições de análise	54

5.2	ANÁLISES SEIRA DOS CORANTES COM Cu_{2-x}Se /MSA	56
5.3	ANÁLISE SEIRA DOS CORANTES COM Ag_2Se /MPA	64
5.4	ESTUDOS COM ATRAZINA e Ag_2Se /MPA	70
5.5	ABORDAGEM MULTIVARIADA NA ANÁLISE DE ATRAZINA COM Ag_2Se /MPA	82
6	CONCLUSÃO	91
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	93
	REFERÊNCIAS	94
	APÊNDICE A – Gráfico de corantes para estudo da concentração ...	99
	APÊNDICE B – Espectros relativos ao estudo sobre resolução e número de varreduras	103
	APÊNDICE C – Nota à imprensa	107

1 INTRODUÇÃO

O monitoramento de substâncias lesivas ao ser humano e ao meio ambiente vem se tornando um fator crucial para a segurança da sociedade contemporânea. No Brasil em particular, percebe-se um crescimento vertiginoso na liberação de novos defensivos agrícolas e o surgimento de pequenas e médias indústrias que carecem de um maior controle sobre o lançamento de efluentes (XIE, M. *et al.*, 2022). Concomitante a isso, ainda segundo os mesmos autores, pesquisadores têm buscado novos métodos para serem utilizados nessa questão, os quais possam substituir ou mesmo serem alternativas confiáveis às técnicas de referência, as quais correspondem majoritariamente a métodos cromatográficos que de modo geral exigem técnico com treinamento específico, grande quantidade de reagentes e possuem um custo elevado de análise.

Dentre as técnicas alternativas, pode-se destacar as espectroscopias vibracionais, as quais possuem grande relevância na elucidação de estruturas químicas e identificação de amostras, apresentando ótima seletividade, porém ainda carecendo de uma maior sensibilidade e reprodutibilidade para serem utilizadas como ferramentas de quantificação e monitoramento de espécies químicas (YANG, X. *et al.*, 2018). Além disso, em alguns casos faz-se necessário uma interpretação dos dados multivariados obtidos em espectrômetros e para tal, métodos quimiométricos são ótimas alternativas para extrair o máximo de informação desses dados espectrais.

A partir da exploração de alternativas visando melhorar a sensibilidade das técnicas, em meados do século XX surgiu uma nova abordagem explorando os efeitos de plasmon de superfície observados em certos metais nobres como ouro e prata (WANG, H. *et al.*, 2021). Esse efeito consiste no movimento ordenado dos elétrons livres presentes na superfície de um filme metálico depositado sobre um substrato, o qual provoca uma intensificação no campo elétrico na vizinhança das nanopartículas metálicas e por consequência, uma intensificação do sinal característico de determinada molécula que esteja em contato estreito com o metal (AROCA, 2016).

No presente trabalho propõe-se a utilização de pontos quânticos de cobre e prata para intensificação de sinal de corantes e um herbicida chamado atrazina (ATZ) por espectroscopia de absorção no infravermelho intensificada por superfície (SEIRA).

A escolha desse herbicida se dá pela relevância, devido a sua utilização em plantações de milho e cana de açúcar, sendo um dos mais utilizados no Brasil até

2022 (IBAMA, 2024) e tendo seu uso regulado pela agência brasileira e europeia em um limite máximo permitido em água superficial de até 2 µg/mL (BRASIL, 2005; UNIÃO EUROPEIA, 2008). A exposição à ATZ pode causar problemas severos ao ser humano em órgãos do sistema reprodutor, causando danos a produção de certas enzimas que influenciam na fertilidade, evidências de possíveis danos ao sistema linfático e estudos ligados a potencial surgimento de câncer nos seios e pâncreas, por exemplo (PANUWET, P. *et al.*, 2008; ESKANDARI, V. *et al.*, 2022).

Quanto ao substrato utilizado, os pontos quânticos selecionados possuem aplicações com efeito SEIRA em trabalhos anteriores que demonstram seu bom desempenho e praticidade de síntese (PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020; DA SILVA, J. J. *et al.* 2021).

Para realização dos experimentos utilizou-se um equipamento de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) e módulo de reflectância total atenuada universal (UATR) com apenas uma reflexão interna no cristal de diamante, único equipamento que estava disponível no momento.

Por fim, no presente trabalho, buscou-se desenvolver um método inovador para detecção de espécies químicas baseado em SEIRA, no qual foi empregada uma abordagem multivariada com o auxílio da análise de componentes principais (PCA), a qual se constitui como uma metodologia atual para estudos envolvendo SEIRA (PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020). Essa estratégia, permite a construção de modelos para investigação de sistemas químicos (processos adsortivos, interações bioquímicas, entre outros) por meio da espectroscopia SEIRA que aliam as qualidades da espectroscopia de infravermelho como rapidez, análise não destrutiva e versatilidade para ser uma alternativa aos métodos convencionais amplamente utilizados atualmente (ADATO, R.; ALTUG, H., 2013; CAMPU, A. *et al.*, 2021; HAJAB, H. *et al.*, 2024).

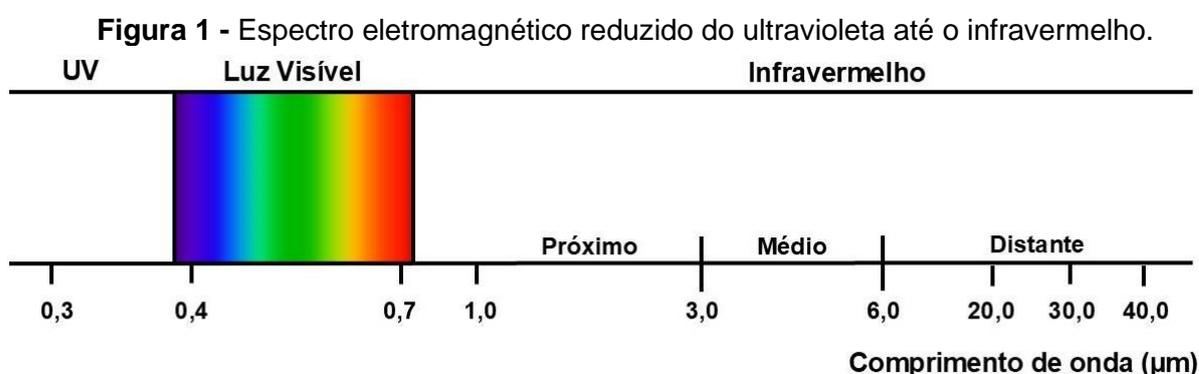
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

As moléculas não são estruturas estáticas no espaço, elas realizam certos movimentos rotacionais e vibracionais que são próprios de cada estrutura molecular e com isso possuem campos eletromagnéticos locais próprios bastante específicos (PAVIA D. L. *et al.*, 2001).

A radiação eletromagnética na região do infravermelho (IV) é capaz de interagir com as ligações presentes em moléculas que apresentem variação no momento de dipolo de mesma frequência que a radiação incidente, fornecendo espectros moleculares com alto grau de informações estruturais acerca da espécie química determinada (SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T., 2002).

A radiação IV possui baixa frequência, comparando-se, por exemplo, à radiação ultravioleta e visível (Figura 1), não sendo, em geral, capaz de promover transições eletrônicas, com exceção de alguns metais de transição que possuem subcamada F. Ela apresenta características próprias, sendo dividida em três regiões denominadas: Infravermelho próximo, médio e distante. Para cada sub-região, existem equipamentos específicos, em termos de tipos de lasers, fontes, detectores e materiais ópticos que constituem os instrumentos, e métodos de análise que podem ser empregados para análises *in-situ*, análises de materiais em estados físicos diferentes, entre outras características (SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T., 2002).



Fonte: shorturl.at/jtwS6 Acessado em: 22/02/21

Entre as faixas do infravermelho, a mais difundida é a do infravermelho médio, compreendendo a região do espectro de 4000 cm^{-1} até 400 cm^{-1} . Essa região possibilita análises conformacionais, estruturais e composicionais e, portanto, é aplicada em diversas áreas como medicina, biotecnologia, meio ambiente e materiais.

A possibilidade de se analisar amostras complexas se deve à existência da chamada região de impressão digital (em torno de 1000 cm^{-1} até 400 cm^{-1}), que permite uma boa seletividade na diferenciação de constituintes orgânicos e inorgânicos das amostras (HAAS, J.; MIZAIKOFF, B., 2016). Assim, a espectroscopia no infravermelho se desenvolveu ao longo do tempo, principalmente, em termos de análise qualitativa, área na qual se mostrou muito versátil devido, por exemplo, à identificação de grupos funcionais característicos, quantidade reduzida de amostra necessária para análise e à possibilidade para se trabalhar com sólidos, líquidos e gases (SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T., 2002).

A partir dos anos 1980, surgiram os primeiros instrumentos empregando transformada de Fourier, o que viabilizou um grande avanço também no campo quantitativo de análises na região do infravermelho no espectro. Esses instrumentos possibilitaram uma melhoria na sensibilidade da técnica, maior velocidade de análise, alta resolução espectral e uma reprodutibilidade aceitável quando comparado às obtidas anteriormente nas análises, porém ainda muito abaixo de técnicas cromatográficas (MEIER, R., 2003).

Além da espectroscopia de absorção no infravermelho, existe a Espectroscopia Raman, que fundamentalmente analisa o espalhamento da radiação, particularmente na faixa do visível e infravermelho próximo. Essa técnica pode ser um complemento à espectroscopia de absorção no IV, pois é sensível a mudanças na polarizabilidade das ligações, o que permite investigar modos de vibração que são inativos no infravermelho e alguns modos de vibração simétricos (SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T., 2002).

Mesmo com todas essas vantagens, a sensibilidade na espectroscopia no infravermelho não é tão boa quando se trata de analisar amostras em concentrações mais baixas. Isso se deve à própria característica da onda eletromagnética na região do infravermelho que tem um comprimento de onda maior que os tamanhos das seções transversais das moléculas em geral, diminuindo bastante a relação dos sinais de absorção das vibrações em relação ao ruído (razão sinal-ruído, S/N) (YANG, X. *et al.*, 2018). Portanto, pesquisadores têm buscado novas formas de aprimorar a técnica por meio do desenvolvimento de novas fontes, detectores e “guias de onda” (do inglês, “waveguides”) a fim de possibilitar análises quantitativas mais reprodutíveis, com maior razão sinal-ruído, atingindo limites de detecção (LOD) menores (HAAS, J.; MIZAIKOFF, B., 2016; SUN, H. *et al.*, 2021).

Concomitante ao avanço instrumental, de meados do século XX até o presente, vem se desenvolvendo uma estratégia inovadora de estudos envolvendo a plasmônica e a espectroscopia vibracional, possibilitando intensificação dos sinais analíticos do Raman ($10^6 - 10^{12}$ vezes) e do infravermelho ($10^1 - 10^3$ vezes). A essa nova abordagem se deu o nome de espectroscopia vibracional intensificada por superfície (do inglês, Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy, SEVS) (YANG, X. *et al.*, 2018), dentre elas se destacam a Espectroscopia Raman intensificada por superfície (do inglês, Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS) e a espectroscopia de absorção no infravermelho intensificada por superfície (do inglês, surface-enhanced infrared absorption, SEIRA).

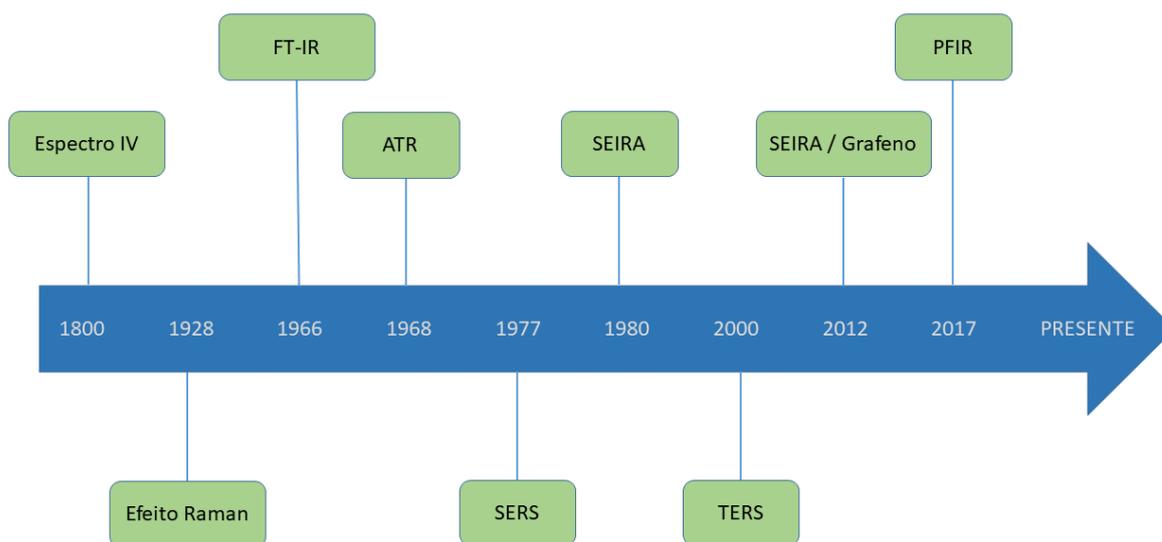
2.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE (SEVS)

Essas espectroscopias são caracterizadas pela interação de um analito com uma superfície, ou seja, o analito deve estar sobre a superfície, sendo esse um fator crucial para o método (OSAWA, M., 1997). Essa superfície, em geral, é constituída por nanopartículas de metais nobres como o ouro e a prata e as características dela serão tratadas em tópico posterior.

O princípio da técnica se baseia na intensificação de sinal produzida pelo aumento da interação entre a radiação incidente e a matéria (nesse caso uma superfície metálica nanoestruturada), amplificando o campo eletromagnético produzido pelo movimento de elétrons livres. Esse fenômeno de intensificação por superfície foi primeiro observado na espectroscopia Raman (Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS), em meados do século XX (WANG, H. *et al.*, 2021).

Logo depois da SERS, surgiu a espectroscopia de absorção no infravermelho intensificada por superfície (SEIRA) que junto com outras técnicas relacionadas criaram um campo de pesquisa na área de nanomateriais e análises espectroscópicas, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Linha do tempo da evolução das espectroscopias Raman e de Infravermelho.



Fonte: Wang, H. *et al.*, 2021 (Adaptado).

Na Figura 2 ainda pode ser observado que por volta de 2012 houve a introdução de nanomateriais à base de grafeno para utilização com efeito SEIRA e, por último, em 2017 surgiu a PFIR (*Peak Force Infrared Microscopy*) que é mais um avanço dessa vez na parte de imagem espectral. Por fim, no início do século surge a espectroscopia baseada em *Tip-Enhanced Raman Scattering* (TERS), a qual pode ser utilizada para obter informações moleculares em um local específico da amostra (PIENPINIJTHAM, P.; KITAHAMA, Y.; e OZAKI, Y., 2021). Assim, se faz necessário entender a diferença entre a abordagem convencional e as SEVS.

Nas espectroscopias convencionais, têm-se dois fatores envolvidos na medida: a radiação e o analito. A radiação na região do infravermelho, ao incidir na substância alvo, interage com as vibrações moleculares, resultando em mudanças no momento dipolar e, conseqüentemente, na absorção de energia pela amostra. Essa interação está associada a mudanças na distribuição de cargas e, conseqüentemente, no momento de dipolo da molécula. A absorção de energia ocorre em determinadas frequências correspondentes às vibrações específicas das ligações químicas presentes na molécula. A quantidade de energia absorvida é medida e utilizada para obter informações sobre as ligações químicas, grupos funcionais e estrutura molecular da substância alvo. No caso de métodos envolvendo as SEVS, tem-se um terceiro fator além dos dois já citados: um conjunto de nanopartículas. Nesse caso, a radiação irá interagir primariamente com a nanopartícula (em geral nanopartículas metálicas

como será visto posteriormente), causando uma perturbação na nuvem eletrônica dessas nanopartículas e, conseqüente, intensificação no campo eletromagnético cerca de 10 vezes maior do que o descrito anteriormente (OSAWA, M., 1997).

A seguir, serão discutidos dois efeitos que envolvem a intensificação de sinal: o efeito eletromagnético, principal fator a contribuir para a espectroscopia intensificada por superfície (SEVS) e o efeito químico.

2.2.1 Efeito Eletromagnético

O efeito eletromagnético é caracterizado pela ressonância dos elétrons devido ao campo elétrico que surge devido a radiação incidente. O campo elétrico produzido é semelhante ao que foi aplicado pela radiação, e, dentro de uma certa faixa de tamanho das nanopartículas e da onda de radiação pode haver uma sobreposição em fase das ondas, o que causa um efeito intensificação na absorção. Portanto, as nanopartículas funcionam como antenas, que captam a radiação incidente e assim promovem uma interação construtiva com o campo eletromagnético local (AROCA, R., 2006).

Ainda de acordo com o mesmo autor, em um exemplo prático de uma transição vibracional, a radiação incidente irá provocar o surgimento de um campo elétrico local (E_{loc}) muito maior que o campo elétrico da onda incidente (E). Para o operador de acoplamento $\hat{H} = -\mu \cdot E$ (de um modo de vibração) relacionado a uma molécula com orientação espacial fixa, os modos vibracionais de uma dada espécie serão intensificados por um fator proporcional a $(\mu_i \cdot E)^2$, o quadrado do produto escalar, onde E é o campo óptico produzido e μ_i é o componente do dipolo dinâmico na direção i . Assim, como a razão E_{loc}/E , geralmente é maior que 1, a intensificação da absorção correspondente será diretamente proporcional ao quadrado do campo elétrico amplificado.

Alguns fatores podem influenciar a intensificação do sinal SEIRA como pode ser observado na Equação 1.

$$I_{SEIRA}^k \propto K |\mu \cdot E_0|^2 N A \Omega Q T_m T_0 \cdot G_{SEIRA} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde I_{SEIRA} é a intensidade do sinal no k-ésimo modo vibracional, N é a densidade de adsorbatos no substrato (moléculas por cm^2), A é a área superficial iluminada pelo raio do laser (cm^2), Ω é o ângulo de incidência do raio laser e QT_mT_0 é o produto relacionado a eficiência do detector do instrumento.

2.2.2 Efeito Químico

A interação nanopartícula-analito também irá contribuir com o fenômeno devido ao movimento dos elétrons entre as NPs e a própria molécula que está sendo analisada. Moléculas que possuem elétrons livres através de ligações pi, como por exemplo moléculas de corantes que possuem anéis aromáticos, são excelentes analitos para estudos envolvendo SERS ou SEIRAS (LI, D. *et al.*, 2021).

Alguns fatores relacionados à interação NP-analito devem ser considerados em uma análise de SEIRA. Em primeiro lugar, que tipo de adsorção houve entre a molécula (analito) e as nanopartículas? Se houver uma adsorção física, então tem-se ligações mais fracas do tipo Van der Waals, se há ligações mais fortes, tem-se uma adsorção química, o que leva a uma contribuição química diferente no fator de intensificação (EF), o qual se refere a uma relação direta entre a intensidade do sinal SEIRA e do sinal FT-IR (AROCA, R., 2006).

Um fator extra e fundamental para essa técnica é que se deve atentar também para o quão próximas estão as nanopartículas umas das outras para que haja uma melhor interação entre elas para uma intensificação maior do sinal, levando-se em conta que elas não podem se tocar, o que leva a uma importância grande do método empregado na deposição das mesmas (KRAJCZEWSKI, J.; KOŁAŁAJ, K.; KUDELSKI, A., 2017). Além disso, uma deposição que leve à formação de um filme muito espesso (a depender da densidade de partículas), não será positivo para a intensificação de sinal, pois a radiação não consegue penetrar tão fundo no substrato (HU, Y. *et al.*, 2019; EID, S. M. *et al.*, 2020).

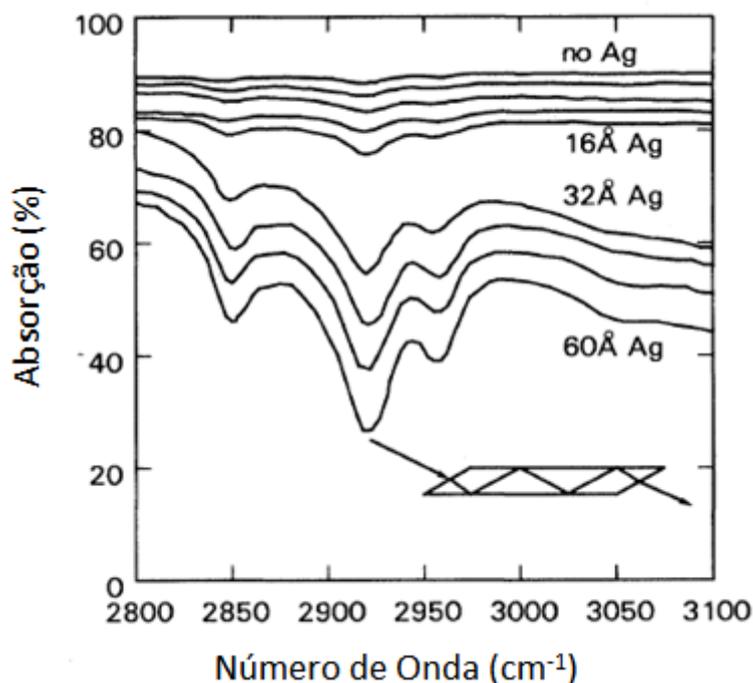
A intensificação produzida permite então a detecção de monocamadas e sub-monocamadas de filmes metálicos depositados em certas superfícies. Entretanto, até o momento, é um grande desafio detectar moléculas individuais nas regiões de *hot-spot* com a espectroscopia SEIRA como já é mais acessível na espectroscopia SERS devido a diferença entre as seções transversais (10^{-21} SEIRA e 10^{-29} SERS) que cobre as moléculas do analito (LI, J. B. *et al.*, 2017; WANG, L. X.; JIANG, X. E., 2012). Não

obstante, esse mesmo fator permite que pequenas intensificações no sinal, produzidas por SEIRA, promovam um ganho relevante de sensibilidade na região do infravermelho (KIM, D. K. *et al.*, 2010; WANG, L. X.; JIANG, X. E., 2012; ZHENG, B. *et al.*, 2017). Considerando os aspectos citados, vale evidenciar a importância do estudo dessa técnica no contexto atual, no qual se demandam análises rápidas, confiáveis e de baixo custo.

2.3 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE (SEIRAS)

Como já mencionado, a SEIRAS emergiu no final do século XX, logo após a descoberta da SERS. O primeiro trabalho que explorou a intensificação do sinal de um analito por meio de fenômenos de absorção foi realizado por Hartstein *et al.* em 1980. Neste estudo, os autores utilizaram filmes de prata e ouro depositados em suporte de sílica e observaram bandas em regiões entre 3100 e 2800 cm^{-1} . Eles verificaram que, com o aumento na espessura do filme de prata até 6 nm, havia um aumento correspondente do sinal analítico (Figura 3) (HARTSTEIN, A.; KIRTLEY, J. R.; TSANG, J. C., 1980).

Figura 3 - Variação da absorção de acordo com o aumento da espessura do filme de prata até 6 nm.



Fonte: Adaptado de HARTSTEIN; KIRTLEY; TSANG, 1980.

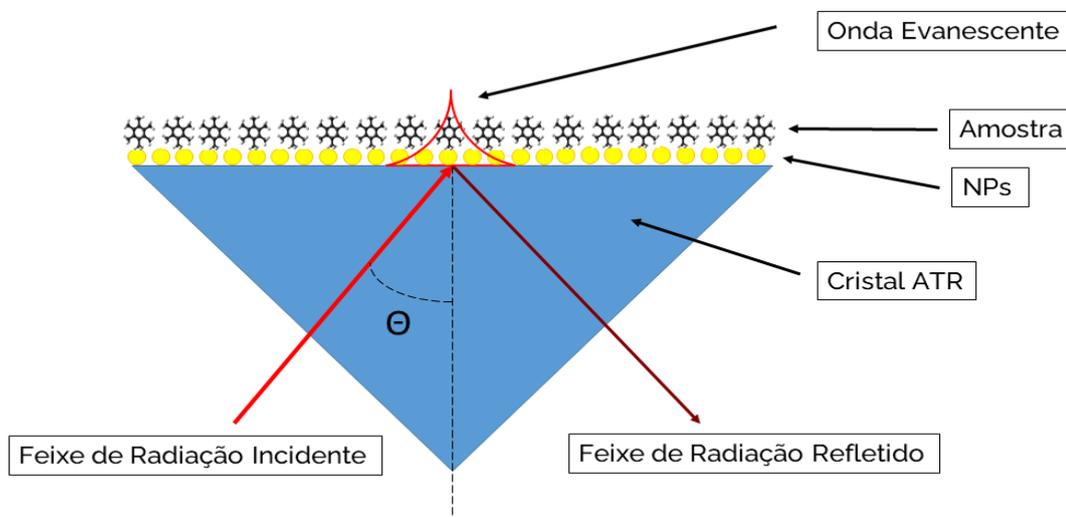
Desde então, a SEIRAS tem sido empregada como uma técnica complementar para diversas análises. Isso inclui estudos de cinéticas de adsorção (SAHA, A. *et al.*, 2021), mecanismos de interações biológicas envolvendo proteínas (LIU, Y. *et al.*, 2018) e determinação de moléculas orgânicas (PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020; SUN, H. *et al.*, 2021), entre outros.

Um aspecto crucial em SEIRA é que os modos vibracionais perpendiculares aos momentos de dipolo são preferencialmente intensificados. Isso significa que a técnica permite identificar qual grupo funcional está se ligando preferencialmente à superfície metálica e, conseqüentemente, qual é a orientação espacial que está ocorrendo essa vibração da interação analito-NP (OSAWA, M., 1997).

É importante notar que a SEIRAS sempre esteve relacionada às medidas de ATR, com muitos autores se referindo à técnica como ATR-SEIRAS. As medidas de reflectância se baseiam no princípio de que um feixe de radiação emitido em um determinado ângulo, ao colidir com um meio mais denso, penetra um pouco no meio e depois sofre reflexão total (Figura 4). A onda que penetra o meio mais denso é chamada de onda evanescente e carrega informações sobre esse meio. O grau de

penetração varia de acordo com o comprimento de onda da radiação, os índices de refração dos meios e o ângulo de incidência (SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T., 2002).

Figura 4 – Modelo exemplificando uma medida de reflectância total atenuada (ATR).



Fonte: Autoria própria.

Através do método que envolve ATR-SEIRAS, pesquisadores têm alcançado sensibilidades e limites de detecção (LOD) cada vez menores. Esses avanços permitem o monitoramento *in-situ* de sistemas biológicos e a análise da estrutura conformacional de moléculas orgânicas complexas, conforme já descrito anteriormente.

Em 2018, Bao e colaboradores imobilizaram um filme de nanopartículas de ouro sobre um sensor de ATR de ZnSe. Eles constataram que era possível monitorar processos biomoleculares utilizando moléculas de hemoglobina bovina (Bhb) e reações imunológicas. Ambos os processos apresentaram intensificação de sinal na região de impressão digital. Além disso, verificou-se a possibilidade de monitorar a reação desses processos em tempo real, o que possibilitou o estudo cinético e termodinâmico desses sistemas (BAO, W. J. *et al.*, 2018).

É sabido que a água pode ser um fator limitante em análises no infravermelho devido às suas intensas bandas de absorção por volta de 3400 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} (estiramento da ligação O-H e deformação angular H-O-H, respectivamente). Um dos primeiros trabalhos a utilizar a água como sonda para criar uma metodologia de reflexão plasmônica interna (PIR) foi o desenvolvido por Adato e Altug em 2013. Nesse

estudo, os autores investigaram as mudanças de conformação de proteínas em eventos que envolvem algumas interações químicas. Este sensor apresentou alta sensibilidade e uma melhor relação sinal/ruído em comparação às técnicas tradicionais.

Avançando nessa temática, Liu e colaboradores, em 2018, desenvolveram um sensor com nanopartículas de ouro capaz de realizar bioanálises com moléculas de DNA, também utilizando a água como uma espécie de sonda. O sensor mostrou-se até 34 vezes mais sensível e apresentou um LOD de 0,2 nM, sendo até 200 vezes menor que utilizando a espectroscopia de infravermelho tradicional (LIU, Y. *et al.*, 2018).

Em uma aplicação diferente de ATR-SEIRAS, Sun e colaboradores, em 2021, estudaram a molécula de atrazina, um herbicida já citado anteriormente. Através de estudos cinéticos de adsorção em aptâmeros, juntamente com estudos termodinâmicos, conseguiram um LOD de 30 pM (SUN, H. *et al.*, 2021).

Apesar dos grandes avanços, a espectroscopia SEIRA ainda carece de melhor reprodutibilidade e entendimento teórico de como ocorrem certos fenômenos intrínsecos à técnica. Em relação aos fatores que afetam a reprodutibilidade da técnica, é possível citar algumas como a pequena alíquota de amostra que é utilizada nas análises, a heterogeneidade dos filmes formados nos substratos e a própria interação do analito com o substrato que pode ocorrer em conformações diferentes a cada medida.

Para vencer as limitações impostas e explorar novas possibilidades, métodos têm sido desenvolvidos, como a possibilidade de análises com Nano-FTIR, que utiliza equipamentos com resolução menor, medições “on-chip” que podem aprimorar as aplicações em termos de sensores e a criação de sistemas portáteis (Yang *et al.*, 2018). Por fim, percebe-se que é preciso que ocorra um avanço na síntese de nanomateriais que possuam ressonância nessa região do espectro assim como nanomateriais que respondam a outras regiões do infravermelho, como o infravermelho próximo e o distante (LE, F. *et al.*, 2008).

Com a necessidade de avanço na síntese de nanomateriais, surge a discussão sobre o uso de nanomateriais em SEIRA.

2.3.1 Uso de nanomateriais em SEIRA

A discussão sobre os efeitos de coloração de metais remonta a séculos atrás, quando se começou a trabalhar com materiais feitos de ouro e prata, metais nobres que possuem uma coloração intensa e característica. Apesar do desconhecimento acerca de materiais nanoparticulados, percebeu-se que, quando se trabalhava com esses materiais em forma coloidal, por exemplo, eles apresentavam colorações diferentes das originais, variando inclusive com a incidência de luz. Assim, esses materiais foram amplamente utilizados na fabricação de vidros coloridos e de materiais cerâmicos (KRAJCZEWSKI, J.; KOŁAŁAJ, K.; KUDELSKI, A., 2017).

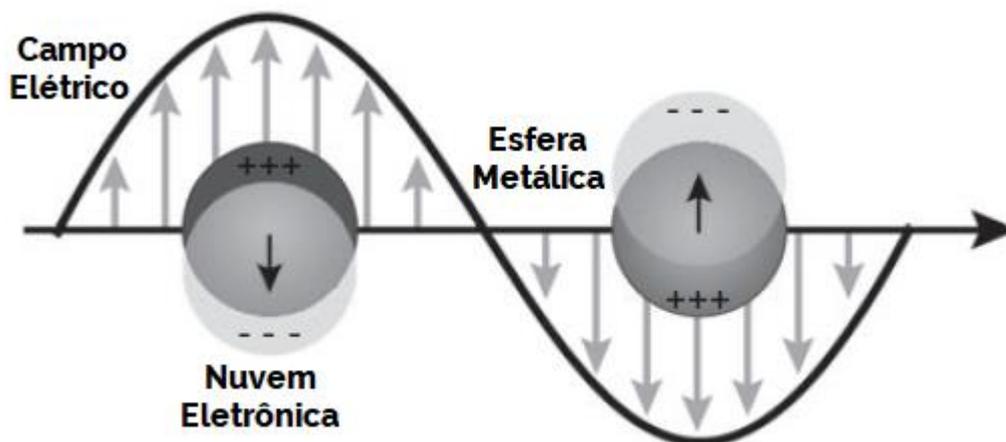
A radiação eletromagnética é o vetor que possibilita os efeitos de ressonância de elétrons, íons ou outras partículas carregadas, os quais são apresentados por nanopartículas plasmônicas. Esses efeitos ocorrem devido à presença dessas partículas livres na superfície desses materiais, geralmente nanopartículas metálicas, que são excitadas, promovendo assim uma oscilação conjunta delas, o que amplifica o campo eletromagnético no local. Esse efeito é chamado de plasmon de superfície ou ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR) (AROCA, R., 2006). Essa teoria foi explicada por Mie no início do século XX e se aplicava a nanopartículas esféricas isoladas menores que o comprimento de onda da radiação incidente (HORVATH, H., 2009). Assim, chega-se a uma questão pertinente: o que são plasmons?

Plasmons derivam de plasmônico(a), que é um ramo da física que investiga o comportamento das ondas eletromagnéticas na faixa do visível em materiais nanoestruturados. Esse termo aparentemente começou a ser utilizado a partir do conceito de plasma, que é um estado da matéria em que se tem um gás ionizado. O termo vem sendo utilizado para designar misturas de partículas em movimento, como elétrons ou mesmo íons, eletricamente carregadas e com diferentes densidades energéticas (ZHONG, Y. *et al.*, 2015). Uma definição mais simples é que plasmons são modos ressonantes que envolvem a interação entre a luz e cargas livres (MURRAY, W. A.; BARNES, W. L., 2007).

O fenômeno descrito por Mie envolve a criação de pólos magnéticos devido à força aplicada pela radiação aos elétrons livres da banda de condução do metal. O movimento aplicado às cargas gera uma força de restauração no ambiente, que é o que promove o efeito de ressonância obtido em materiais plasmônicos (Figura 5). No

infravermelho, é importante ressaltar, o efeito dominante é chamado de ressonância de fônons (interação entre a radiação infravermelha e as vibrações coletivas dos átomos), que é análoga à ressonância plasmônica, esta última observada nas regiões visível e do infravermelho próximo (OSAWA, M., 1997).

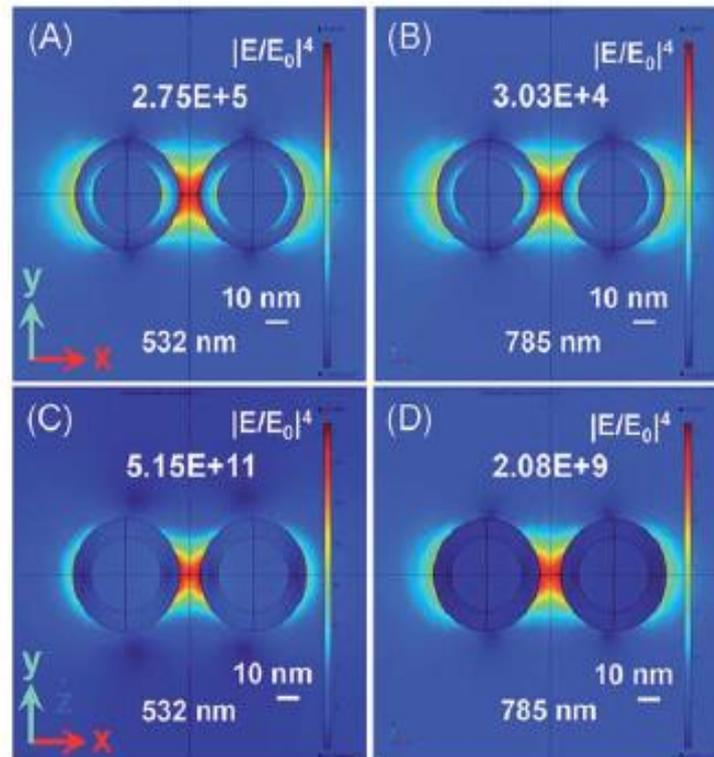
Figura 5 - Ilustração do efeito da Ressonância de Superfície Plasmônica.



Fonte: Adaptada de (STILES, P. L. *et al.*, 2008).

Como consequência desse fenômeno, surgiu uma classe de materiais que promove a intensificação do campo eletromagnético em certas regiões. Quando existe uma grande proximidade entre as partículas metálicas, essas regiões são então chamadas de “*hot spots*” (Figura 6). Pesquisadores têm desenvolvido materiais de diversos tipos com o objetivo de obter intensificações eletromagnéticas cada vez maiores. Esses avanços contribuem para o desenvolvimento de técnicas espectroscópicas que se beneficiam desse fenômeno, como a SEIRA (KRAJCZEWSKI, J.; KOŁĄTAJ, K.; KUDELSKI, A., 2017).

Figura 6 - Oscilação plasmônica em partículas esféricas demonstrando o deslocamento da nuvem eletrônica em relação ao núcleo.



Fonte: Adaptado de KRAJCZEWSKI, J.; KOŁATAJ, K.; KUDELSKI, A., 2017.

Um dos primeiros materiais utilizados para tal finalidade, foi o ouro, especialmente o ouro coloidal, o qual consistia em nanopartículas de ouro em solução, obtido por Faraday em meados do século XIX. A partir daí, surgiram diversos materiais utilizando-se métodos cada vez menos laboriosos com a variação, basicamente, do agente redutor e do meio em que a síntese é realizada. Outro fator importante foi a utilização de outros metais para a fabricação desses materiais (YANG, X. *et al.*, 2018). Assim, entre os principais metais utilizados na fabricação dos materiais plasmônicos estão o ouro (Au), cobre (Cu), prata (Ag), alumínio (Al), platina (Pt) e paládio (Pd). Isso se deve, entre outros fatores, à estrutura eletrônica desses metais que não permite uma grande competição entre as transições eletrônicas internas e o plasmon de superfície, e às possíveis formas e tamanhos em que nanomateriais à base desses metais podem ser produzidos, possibilitando que suas cores variem desde o violeta até o vermelho no espectro. Portanto, o material deve ser escolhido de acordo com a resposta que irá promover (MURRAY, W. A.; BARNES, W. L., 2007).

Em relação à sua forma, o material pode ser sintetizado na forma de uma esfera ou mesmo em formato de bastões (PONLAMUANGDEE K. *et al.*, 2020), nanoantenas

(NOVOTNY, L.; VAN HULST, N., 2011; ADATO, R.; ALTUG, H., 2013) e materiais que possuem cavidades, como uma esfera oca (LAL, S. *et al.*, 2008). Essa variedade deriva do fato de que o formato da nanopartícula influencia diretamente no tipo de modo plasmônico. Assim, partículas esféricas (isotrópicas) só possuem um modo dipolo, enquanto partículas de diferentes formatos (anisotrópicas) conseguem excitar diferentes modos de mais alto nível devido aos diferentes planos que podem existir na estrutura.

Outros dois fatores importantes que devem ser considerados são: a permissividade elétrica do material, que é responsável pela resposta à interação do material com um campo elétrico externo e, conseqüentemente, a sua capacidade de armazenar energia quando sujeita a esse campo, e a permissividade relativa do ambiente em que o material está confinado, que irá ditar sua capacidade de interação com outras espécies no ambiente, como o próprio analito (YANG, X. *et al.*, 2018). Por conseguinte, materiais com essas características podem ser aplicados em diversas áreas, sendo os mais utilizados o ouro e a prata. Como exemplo de aplicação, tem-se a utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) para formar uma camada sobre um cristal de silício a fim de produzir um sensor para detecção de moléculas de poluentes ambientais comumente usados na agricultura (SUN, H. *et al.*, 2021).

Hu e colaboradores em 2019 utilizaram Carbon-nanodots (CNDs) para estudo de moléculas como a adenina e a guanina, em soluções aquosas, atingindo limites de detecção (LOD) de 0,003 mg/mL para a adenina, por exemplo, o que atesta a possibilidade de estudos quantitativos desse tipo de molécula em ambientes aquosos (HU, Y. *et al.*, 2019).

Adicionalmente, não são apenas materiais metálicos que promovem intensificações de sinal na região do infravermelho. Estudos indicam que o grafeno é um material promissor em SEIRA, devido às suas excelentes propriedades ópticas e eletromagnéticas, tais como o efeito plasmônico e absorção óptica em uma faixa ampla do espectro, desde o ultravioleta até o infravermelho, condutividade eletrônica, transparência óptica na região do visível e possibilidade de sofrer dopagens com outros elementos. Além disso, os autores consideram a possibilidade de se chegar a níveis de detecção ainda maiores do que os já reportados explorando materiais derivados do grafeno (YANG, X. *et al.*, 2018).

Baseado nessas características, Zheng e colaboradores em 2018 construíram um sensor à base de grafeno para detecção *in-situ* de fenômenos biológicos em

ambiente aquoso. Os autores obtiveram um LOD de 0,5 nM na detecção de uma proteína chamada L-selectina, além de realizar estudos cinéticos e termodinâmicos (ZHENG, B. *et al.*, 2018).

Outro gênero de material utilizado são os pontos quânticos, do inglês *quantum-dots* (QD), os quais são definidos como nanocristais de semicondutores, caracterizados por terem dimensões que variam de 2 a 10 nm. Dentre os QD, destacam-se para aplicação SEIRA os calcogenetos de prata e cobre, pois estes podem ter seu tamanho e fotoluminescência ajustados para emitir no infravermelho, além de possuírem boa estabilidade coloidal e baixa toxicidade (SANTOS, C. *et al.*, 2020; PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020). Além disso, já foram desenvolvidas sínteses desses materiais em meio aquoso, livres de metais pesados como cádmio e mercúrio, o que os torna não apenas ambientalmente amigáveis como também mais biocompatíveis (DA SILVA, J. J. *et al.*, 2021).

Esses semicondutores já foram aplicados em Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Intensificada por Superfície (SEIRA) por Pereira e colaboradores em 2020, mais especificamente os QDs de seleneto de prata ($\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$), estabilizados com ácido mercaptosuccínico (MSA), para intensificação de sinais de corantes como cristal violeta, rodamina 6G e auramina, atingindo fatores de intensificação de aproximadamente 11 vezes (PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020).

Da Silva e colaboradores, em 2021, utilizaram pontos quânticos de seleneto de cobre ($\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$), estabilizados com ácido mercaptosuccínico (MSA), para intensificação de sinal dos corantes cristal violeta, fucsina, rodamina B e rodamina 6G, obtendo EF de até 9,1 vezes para rodamina 6G (DA SILVA, J. J. *et al.*, 2021).

Por fim, verifica-se que existem poucos trabalhos disponíveis na literatura explorando a utilização de pontos quânticos em espectroscopia SEIRA (DA SILVA, J. J. *et al.*, 2021; PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020). Essas inovações encontradas na fabricação desses semicondutores, em sínteses em meio aquoso utilizando prata e cobre, são grandes avanços que permitem uma perspectiva otimista para aplicação desses materiais em SEIRA (DA SILVA, J. J. *et al.*, 2021). Outro fator que os tornam materiais promissores é a possibilidade de sintonizar o tipo de radiação que será emitida por eles, ajustando-se parâmetros da síntese como temperatura, razão molar entre o estabilizante e as partículas metálicas, tempo de reação, pH, entre outros (SANTOS, C. *et al.*, 2020).

2.3.2 Moléculas alvo em SEIRA

A seleção da molécula alvo em SEIRA está associada, por exemplo, ao desenvolvimento de métodos analíticos comparáveis a técnicas de referência, como cromatografias, ou que necessitam que a amostra não seja destruída durante a análise. Além disso, a técnica é relevante para o monitoramento de processos químicos e bioquímicos, como a adsorção de corantes e as interações entre enzimas e substratos específicos.

A grande variedade de materiais aplicados à SEIRA pode ser correlacionada a uma grande variedade de moléculas alvo já investigadas na literatura. Como discutido durante este capítulo, existem aplicações bioquímicas e biomédicas importantes (WANG, L. X.; JIANG, X. E., 2012; ZHENG, B. *et al.*, 2017; BAO, W. J. *et al.*, 2018; LIU, Y. *et al.*, 2018), aplicações relacionadas ao meio ambiente (BOBRINETSKIY, I.; KNEZEVIC, N., 2018; DING, Y. *et al.*, 2023; HU, Y. *et al.*, 2019; PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020; SUN, H. *et al.*, 2021) e aplicações químicas em geral, como o monitoramento de processos de adsorção (WANG, H. *et al.*, 2021).

Destacam-se trabalhos que envolveram aspectos bioquímicos, tem-se o monitoramento de bases nitrogenadas como guanina e adenina (HU, Y. *et al.*, 2019), estudos cinéticos e termodinâmicos com a proteína L-selectina (ZHENG, B. *et al.*, 2018), monitoramento de interações biomoleculares com a hemoglobina bovina (Bao *et al.*, 2018), realização de bioanálises com DNA (LIU, Y. *et al.*, 2018) e detecção de estreptavidina, molécula proveniente da bactéria *Escherichia Coli* (ADATO, R.; ALTUG, H., 2013).

Em relação à área ambiental, têm-se trabalhos para determinação de corantes potencialmente perigosos como cristal violeta, rodaminas e fucsina (Pereira *et al.*, 2020), além de azul de metileno (SAHA, A. *et al.*, 2021).

Para além dessas aplicações, percebe-se que nessa área existem grandes desafios, desde as matrizes onde são encontradas as amostras até mesmo para algumas necessidades de aplicações em campo (BOBRINETSKIY, I.; KNEZEVIC, N., 2018; MISHRA P. *et al.*, 2023). Isso se torna cada vez mais urgente levando-se em conta que o Brasil é um dos países que mais utiliza defensivos agrícolas no mundo sendo que um dos mais utilizados é a atrazina (ATZ), um herbicida capaz de controlar pragas em plantações de soja e milho amplamente utilizado não só no Brasil como no mundo todo (DELLA-FLORA, A. *et al.* 2018).

No momento, as análises de referência envolvendo ATZ são feitas, em sua grande maioria, por técnicas cromatográficas, as quais destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, HPLC) e a cromatografia gasosa (PANUWET, P. *et al.*, 2008; DELLA-FLORA, A. *et al.* 2018; PARK, E. *et al.*, 2022; FUENTE-BALLESTEROS, A. *et al.*, 2023). Essas técnicas possuem como vantagem a alta sensibilidade, reprodutibilidade e a detecção de substâncias em nível traço, porém, têm como desvantagens o alto custo, necessidade de pessoal especializado para manusear o equipamento, necessidade de preparo de amostra e alto custo para realização da análise no geral (ESKANDARI, V. *et al.*, 2022). Visando superar essas desvantagens, desenvolveram-se alguns métodos utilizando SERS, o que demonstra a aplicabilidade e um futuro promissor das SEVS na área ambiental (TANG, J.; CHEN, W.; JU, H., 2019; DING, Y. *et al.*, 2023).

Por fim, até o momento da publicação dessa tese existe apenas um artigo na literatura que descreve a determinação de atrazina e espectroscopia SEIRA. Sun e colaboradores, em 2021, utilizaram um substrato contendo nanopartículas de ouro ligadas a aptâmeros sensíveis à ATZ. Desse modo, eles realizaram estudos cinéticos envolvendo a interação da ATZ com os aptâmeros e obtiveram LOD de 30 pM (SUN, H. *et al.*, 2021).

Como observado, grande parte dos trabalhos analisados na literatura empregaram análises qualitativas. No entanto, a quantidade de dados gerados nessas análises e a complexidade dos sistemas estudados, sugerem uma potencial aplicação de ferramentas quimiométricas em estudos SEIRA, como já observado de forma incipiente em SERS, como descrito a seguir.

Liu e colaboradores, em 2019, utilizaram regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) para quantificar oxcarbazepina, um fármaco utilizado para tratamento de epilepsia, em amostras de água. Os autores utilizaram espectros SERS em uma faixa de concentração de 0,01 - 250 µg/mL e obtiveram um coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,9 para o conjunto de calibração (LIU, M. *et al.*, 2019).

Em outra abordagem, Adade e colaboradores, em 2022, avaliaram possíveis adulterações em óleo de palma cru utilizando análise de componentes principais (PCA), “K-vizinhos mais próximos” (KNN) e análise discriminante linear (LDA), obtendo acurácias de mais de 99% para identificação de adulterante no óleo (ADADE, S. Y. S. *et al.*, 2022).

No mesmo caminho, Hajab e colaboradores, em 2024, analisaram amostras de soro sanguíneo provenientes de pacientes com câncer de mama para diferenciar amostras de pacientes com câncer de pacientes saudáveis com PCA e análise de discriminantes por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) obtendo uma exatidão de 79% (HAJAB, H. *et al.*, 2024).

Conclui-se então, que há possibilidades de aplicações quimiométricas em SEIRA e, por conseguinte, os conceitos das principais ferramentas utilizadas no presente trabalho serão abordados no tópico seguinte.

2.4 QUIMIOMETRIA

Desde o início da utilização de técnicas espectroscópicas, os pesquisadores lidam com uma vasta quantidade de dados gerados em suas análises. Durante muito tempo, utilizou-se uma estratégia de análise univariada, na qual se escolhia um determinado comprimento de onda para se construir a curva analítica. Essa simples abordagem pode ser muito útil, porém, em certos tipos de dados, como dados obtidos na região do infravermelho, tem-se vários dados úteis a serem extraídos de determinadas faixas do espectro, ou mesmo do espectro completo, que serão traduzidos em informações qualitativas e quantitativas acerca da amostra em questão. (FERREIRA, M. M. C., 2015).

Assim, para se extrair o máximo de informações úteis desses conjuntos de dados, pode-se fazer uso de várias estratégias, como por exemplo: redução de dimensionalidade dos dados e análise exploratória, como Análise de Componentes Principais (PCA), estratégias para montar planejamentos experimentais multivariados e, por último, realizar experimentos de calibração e classificação. Esse conjunto de possibilidades está contido em uma área chamada Quimiometria, a qual engloba a parte de estatística e aprendizado de máquinas voltada para aplicações químicas.

Além de possibilitar essa extração mais eficiente de informações, o pesquisador pode utilizar as informações com mais clareza para a confirmação (ou não) de hipóteses relativas ao experimento realizado e para observar correlações entre as respostas obtidas e as variáveis independentes do sistema em questão (MASSART, D. L. *et al.*, 1997).

O presente trabalho optou por utilizar abordagens univariada e multivariada para analisar a intensificação de sinal promovida pelo efeito SEIRA, pois além de

analisar um comprimento de onda específico, o efeito SEIRA pode ocorrer em grandes faixas da região do infravermelho, assim, pode-se ter uma ideia melhor da real intensificação de sinal que ocorreu utilizando uma abordagem multivariada (PEREIRA, C. F. *et al.* 2020). Para tal, se utilizou a PCA, método de análise exploratória e redução de dimensionalidade, que busca transformar o conjunto de dados iniciais em um novo conjunto de eixos que são ortogonais entre si, ou seja, as novas variáveis possuem mínima correlação entre elas. Nesses novos eixos, chamados de componentes principais (PCs), o primeiro tem direção no sentido de maior variância entre o conjunto de variáveis, o segundo é ortogonal ao primeiro e tem direção no sentido de segunda maior variância entre as variáveis e assim por diante de acordo com a quantidade de PCs necessárias para explicar a variância total dos dados (BRO, R.; SMILDE, A. K., 2014).

Nos PCs, os *scores* (*escores*), representam as coordenadas dos dados originais nos componentes principais, ou seja, a relação entre as amostras, e os *loadings* (pesos), representam as relações entre as variáveis. Desse modo, entende-se que esses componentes estão relacionados com os dados originais de acordo com a Equação 2.

$$X = TP^T + E \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo X a matriz de dados original, com i linhas e j colunas (usualmente são as variáveis), T é a matriz dos escores, P é a matriz dos *loadings* (ou pesos) e E é a matriz dos resíduos gerados na análise.

Além da utilização de modelos não supervisionados como PCA na investigação da espectroscopia SEIRA, pode-se fazer uso de modelagem supervisionada, como por exemplo, a construção de modelos de calibração utilizando regressão por mínimos quadrados parciais (*partial least squares*, PLS). O PLS é considerado um método de calibração inverso devido a propriedade de interesse ser tratada como uma função de resposta instrumental (FERREIRA, M. M. C., 2015), conforme Equação 3.

$$c = Rb \quad (\text{Equação 3})$$

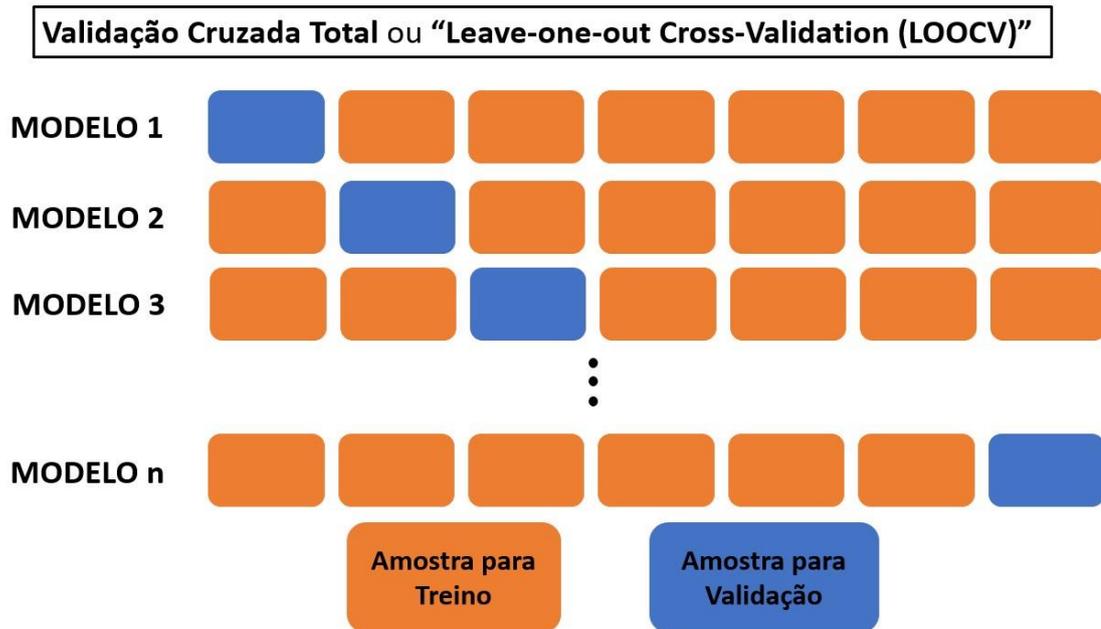
Onde, o vetor c corresponde a propriedade de interesse, R é a matriz de respostas instrumentais e o vetor b corresponde aos coeficientes do modelo.

Há casos em que R não é invertível, o que torna bastante difícil a resolução dessa equação (Eq. 3). Um exemplo é na aplicação em dados espectroscópicos. Para tal, pode-se projetar os dados da matriz R em um novo sistema de eixos (substituindo a matriz R pela matriz U) que elimina a redundância entre as variáveis, tornando a matriz R invertível. Esses novos eixos são chamados de variáveis latentes (VL) e contêm informação sobre a máxima covariância entre todas as combinações lineares da matriz R e o vetor c (Equação 4).

$$c = Ub \quad \text{(Equação 4)}$$

A escolha do número de VL que serão utilizadas na matriz U é uma etapa crucial na construção de modelos PLS para que ocorra uma estabilização do processo de inversão. Essa escolha, em geral, pode ser feita utilizando métodos de validação cruzada, a exemplo da validação cruzada total ou "*leave-one-out cross-validation*" na qual uma amostra aleatória é retirada do conjunto de treino e utilizada para validação (OTTO, M., 2017). Esse procedimento é repetido até que todas as amostras sejam utilizadas para previsão (Figura 7).

Figura 7 – Ilustração de um esquema para validação cruzada total.



Fonte: Autoria própria.

Por meio da validação cruzada também é possível minimizar o sobreajuste do modelo quando se tem um conjunto de dados relativamente pequeno como o utilizado no presente trabalho. O sobreajuste ocorre quando o modelo criado se ajusta excessivamente aos dados de treinamento, captando não apenas o padrão verdadeiro, mas também ruído e outras variações aleatórias presentes nos dados, portanto perdendo poder de generalização frente ao conjunto de testes.

Em seguida, o número ótimo de VL pode ser definido quando se é obtido o menor erro médio quadrático (do inglês, *mean squared error*, MSE). Para melhor interpretar os valores obtidos com MSE, aplica-se uma raiz quadrada ao valor obtido para se ter uma equivalência entre unidades e assim o erro passa a se chamar (RMSE, *root mean squared error*). Esse erro pode ser calculado tanto para a validação cruzada (RMSECV) para avaliar o número ótimo de VL, quanto para a previsão (RMSEP), para uma avaliação da capacidade preditiva do modelo, esses valores podem ser obtidos pelas Equações 5 e 6 (OTTO, M., 2017).

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{cal}} (y_{cal,n} - \hat{y}_{cal,n})^2}{n_{cal}}} \quad (\text{Equação 5})$$

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n_{pred}} (y_{pred,n} - \hat{y}_{pred,n})^2}{n_{cal}}} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde, $y_{cal,n}$ ou $y_{pred,n}$ corresponde a resposta (parâmetro de interesse), $\hat{y}_{cal,n}$ ou $\hat{y}_{pred,n}$ o valor dessa resposta estimada pelo modelo, n_{cal} ou n_{pred} , o número de amostras utilizadas na etapa de treinamento (calibração do modelo) ou número de amostras utilizadas na previsão.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a espectroscopia de absorção no infravermelho intensificada por superfície (SEIRA) empregando pontos quânticos de seleneto de cobre e seleneto de prata na análise dos corantes cristal violeta, rodamina B, rodamina 6G e fucsina, além do herbicida atrazina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os perfis espectrais dos corantes, do herbicida e das nanopartículas utilizadas;
- Estabelecer métodos de análise de poluentes ambientais (cristal violeta, rodamina B, rodamina 6G, fucsina e atrazina) utilizando ATR e SEIRA;
- Realizar experimentos para avaliar a influência da concentração de QDs e analitos no efeito SEIRA;
- Calcular os fatores de intensificação univariados dos sistemas em estudo;
- Estabelecer o melhor sistema (método e QDs) para realização de análises SEIRA com atrazina;
- Avaliar os sinais SEIRA utilizando análise de componentes principais (PCA);
- Desenvolver modelos de calibração multivariada para determinação de atrazina utilizando FT-IR.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Utilizou-se uma balança semi-micro (Marca: Mettler Toledo) com 5 casas decimais para pesagem dos analitos, Vórtex da marca Velp Scientifica para homogeneização das amostras, micropipetas cobrindo a faixa de 0,5 μL até 1000 μL da marca HTL.

Os analitos testados foram cristal violeta (Sigma-Aldrich), rodamina 6G (Sigma-Aldrich), rodamina B (Sigma-Aldrich), fucsina ácida e atrazina (Syngenta-Novartis). Além disso, utilizou-se acetona P.A (Dinâmica) e Etanol 99.5% (Dinâmica).

As nanopartículas empregadas foram os pontos quânticos de seleneto de cobre não estequiométricos estabilizados com ácido mercaptosuccínico (MSA), $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$, e de seleneto de prata estabilizados com ácido mercaptopropiônico (MPA), $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água ultrapura (Milli-Q) e foram preparadas soluções estoque de todos os corantes na concentração de 1 mg/mL e de atrazina de 1 mg/mL e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram sintetizadas em meio aquoso, utilizando-se um método *one-pot* no qual todos os reagentes foram adicionados em um mesmo reator. No caso dos quantum dots de seleneto de cobre (Cu_{2-x}Se), escolheu-se o ácido mercaptosuccínico (MSA) devido à estabilidade coloidal apresentada em comparação com outros estabilizantes testados. Os melhores parâmetros de síntese encontrados para esse sistema, no qual se utilizou como precursores o CuCl e $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Se}$, foram: razão molar Cu/Se 1:2, e razão molar Cu/MSA 1:6 e 1:9 e agitação por 60 minutos, sob fluxo de N_2 e pH 5, ajustado com solução de NaOH 2 mol/L.

Quanto aos QDs de seleneto de prata ($\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$) estabilizados com ácido mercaptopropiônico (MPA), utilizou-se AgNO_3 e Na_2SeO_3 como precursores de prata e selênio na proporção de 6:1 (159,2:3,0 mg) e 8:1 (42,5:5,4 mg) respectivamente, em pH 10 e temperatura de 70°C sob agitação durante 20 minutos. Essa síntese foi realizada a partir de 100 mL de uma solução de AgNO_3 preparada com água deionizada e teve seu pH ajustado com solução 2 mol/L de NaOH .

Para definir a melhor diluição das nanopartículas a ser utilizada nos experimentos SEIRA, testes foram realizados em função das intensificações de sinal obtidas para uma mesma concentração de analito. Assim, procedeu-se a testes com diluições diferentes e um ou dois processos de pré-concentração das nanopartículas, os quais foram feitos utilizando tubos de policarbonato (Vivaspin 6, com membrana de polietersulfona, 10 kDa MWCO) em um processo de filtração em centrífuga a 3500 rpm por 4 minutos.

4.3 INSTRUMENTAÇÃO

As medidas espectrais foram realizadas utilizando um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) da marca Perkin Elmer, modelo Spectrum 400 (Figura 8) localizado no Laboratório de Combustíveis da Universidade Federal de Pernambuco (LAC-UFPE). A faixa operacional do equipamento, no infravermelho médio, vai de 4000 cm^{-1} até 400 cm^{-1} e o módulo utilizado foi o de Reflectância Total Atenuada (ATR), o qual possui um cristal de diamante com uma reflexão interna. O aparelho possui um detector do tipo DTGS (*Deuterated Triglycine Sulfate*).

Figura 8 – Equipamento de FT-IR utilizado nas medições.



Fonte: Próprio Autor.

4.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO INFRAVERMELHO

Inicialmente foram realizados experimentos para encontrar a melhor faixa de concentração de leitura dos analitos, a qual correspondia a um valor que demonstrasse de forma definida as suas bandas características com uma boa relação sinal/ruído.

Em seguida foram realizadas medidas para determinar a resolução espectral e número de varreduras, que gerasse a melhor condição geral de análises no equipamento, levando-se também em conta o tempo necessário para cada análise.

Antes de todas as medidas espectrais no FT-IR, foram feitas leituras do *background* (branco) com o cristal de diamante limpo, em contato apenas com o ar. Além disso, todos os ensaios com corantes foram feitos depositando-se 1 μL de solução de corante ou suspensão de NPs sobre o cristal com auxílio de uma micropipeta e, então, foi esperado o tempo de secagem do solvente para registro do espectro. Para as medições com a atrazina foram utilizados apenas 0,5 μL devido a solução preparada ser em etanol. Para avaliar o melhor momento de iniciar a análise após a secagem do solvente, foi utilizado o modo de monitoramento do equipamento

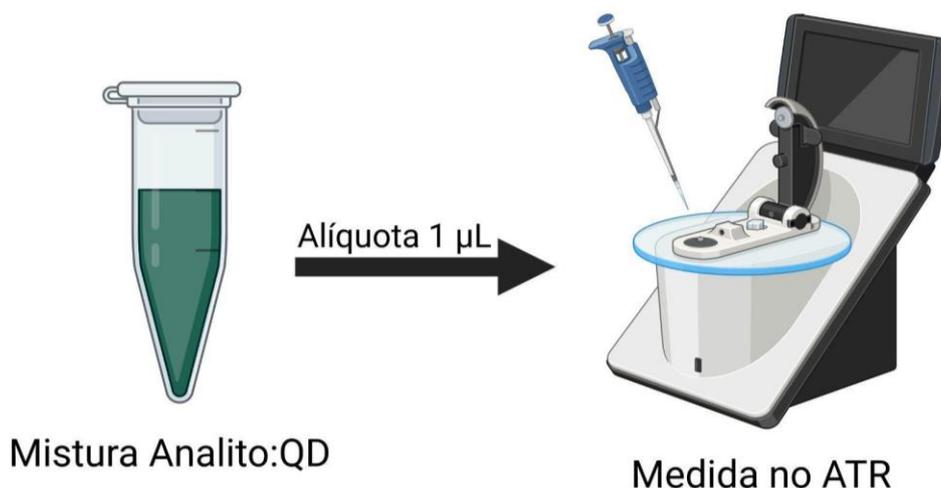
a fim de verificar o desaparecimento das bandas de absorção do solvente, neste caso a água. Após a leitura, o cristal foi limpo com água ultrapura e acetona.

4.5 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISES SEIRA

A faixa de leitura escolhida foi de $4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$ com resolução de 2 cm^{-1} e 32 varreduras por amostra. Já a faixa de trabalho para análise dos espectros foi de $1800 - 650 \text{ cm}^{-1}$, sendo esta considerada a região contendo quase a totalidade das bandas características dos analitos utilizados no trabalho.

Antes de se iniciar as medições foi feito o *background* com o cristal de ZnSe livre (apenas o ar do ambiente). A partir de então, dois métodos foram testados. O método 1 (Figura 9) consistia em se fazer misturas entre a solução do analito em diferentes concentrações e a suspensão coloidal da nanopartícula escolhida também em diferentes concentrações para verificar se havia intensificação de sinal em relação à leitura apenas do analito.

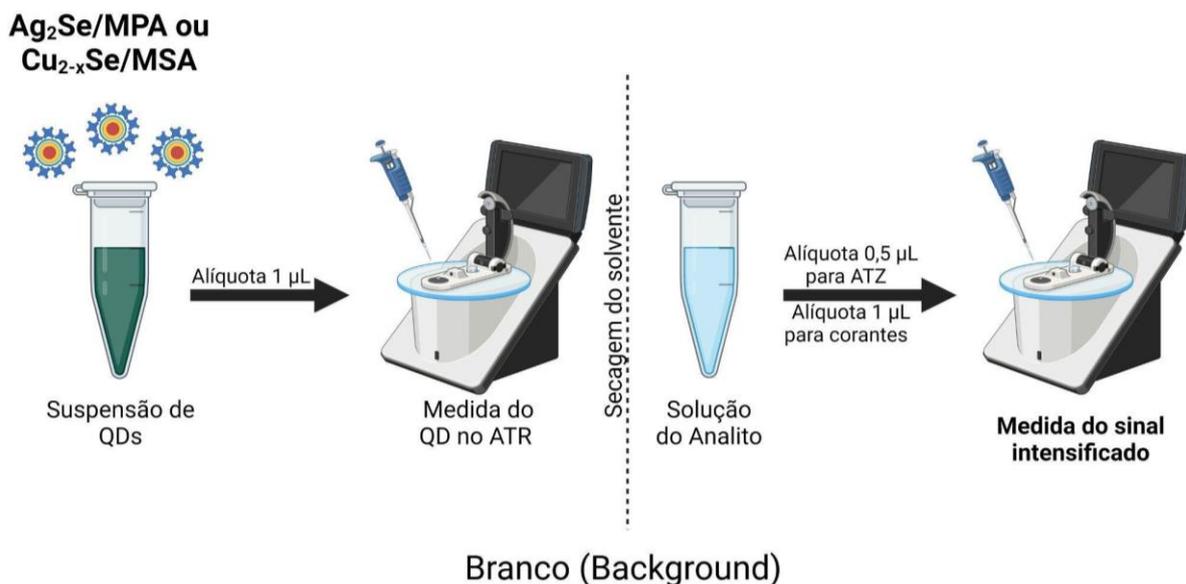
Figura 9 – Método 1 para análise de SEIRA.



Fonte: Autoria própria.

Já o método 2 (Figura 10), consistia em depositar $1 \mu\text{L}$ da suspensão de NPs no cristal, esperar o tempo para secagem do solvente e, então, fazer um *background*. Por fim, era depositado $0,5$ ou $1 \mu\text{L}$ de solução de analito sobre o cristal, esperava-se secar o solvente e, então, registrava-se o espectro intensificado.

Figura 10 – Método 2 para análise de SEIRA.



Fonte: Autoria própria.

Para se analisar o fator de intensificação dos espectros, utilizou-se o fator de intensificação (EF) de acordo com a Equação 7.

$$EF = \left(\frac{I_{SEIRA}}{I_{IR}} \right) \times \left(\frac{N_{IR}}{N_{SEIRA}} \right) \quad (\text{Equação 7})$$

Sendo I_{SEIRA} e I_{IR} as intensidades dos sinais (altura da banda) com e sem a presença das nanopartículas e N_{SEIRA} e N_{IR} o número total de moléculas de analito utilizadas nos dois experimentos. No presente trabalho o valor de N foi igual nos dois casos, levando-se em conta que foram utilizadas alíquotas de mesmo volume e da mesma solução de concentração igual, então, a Equação 7 se resumiu ao primeiro termo da multiplicação (Equação 8).

$$EF = \left(\frac{I_{SEIRA}}{I_{IR}} \right) \quad (\text{Equação 8})$$

Para uma abordagem multivariada foi utilizado o conceito de Fator de Intensificação Multivariado (em inglês, Multivariate Enhancement Factor, MEF) que propõe o cálculo da intensificação de sinal SEIRA a partir dos escores obtidos através de uma Análise por Componentes Principais (PCA).

Os MEFs foram obtidos a partir dos escores, no qual se calculou a distância euclidiana (Equação 9) entre os pontos sem intensificação de sinal e os com intensificação de sinal (PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020).

$$Dist(x, y) = \sqrt{(P_x - Q_x)^2 + (P_y - Q_y)^2} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde P e Q são pontos da matriz dos escores (**T**) em que: P = (P_x, P_y) e Q = (Q_x, Q_y) são as coordenadas do eixo X e eixo Y, correspondentes às PCs.

4.6 ANÁLISE E MODELAGEM DOS DADOS

Todos os dados foram tratados com o auxílio da linguagem de programação *Python*, versão 3.10. Os *softwares* utilizados foram o Microsoft Visual Studio Code, versão 1.78.2, *Matlab*, versão 2010a e *Unscrambler X*. Para construção dos códigos, manipulação de conjunto de dados e construção dos gráficos foram utilizadas as bibliotecas *Pandas* 2.0, *Matplotlib* 3.5 e *Seaborn* 0.12. Para a análise de componentes principais e construção dos modelos de regressão se utilizou a biblioteca *Sklearn* e o software *Matlab* versão 2010a. Além desses, para manipulação de planilhas eletrônicas foi utilizado o Microsoft Excel®, disponível com o Office 365.

Os modelos de calibração foram construídos utilizando regressão por mínimos quadrados parciais (PLSR) utilizando diferentes pré-processamentos: correção de linha de base por *offset* e primeira derivada seguido de suavização com filtro Savitzky-Golay (SG). Os modelos contendo amostras ATR-IR foram realizados com 3 amostras de cada concentração para a etapa de calibração, na qual foi realizada uma validação cruzada *leave-one-out* para determinação do melhor número de variáveis latentes (VL) e em seguida foram feitos os testes de predição com 1 amostra externa ao conjunto de calibração. Já os modelos SEIRA foram construídos com 2 amostras para calibração e 1 extra para validação.

As duas principais métricas utilizadas para escolha do melhor modelo foram o número de VL e a raiz do erro médio quadrático de previsão (RMSEP), obtida a partir do conjunto de predição. Além dessas, foram avaliados os coeficientes de determinação (R²) de calibração e previsão, a medida de tendência (*bias*) e os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ).

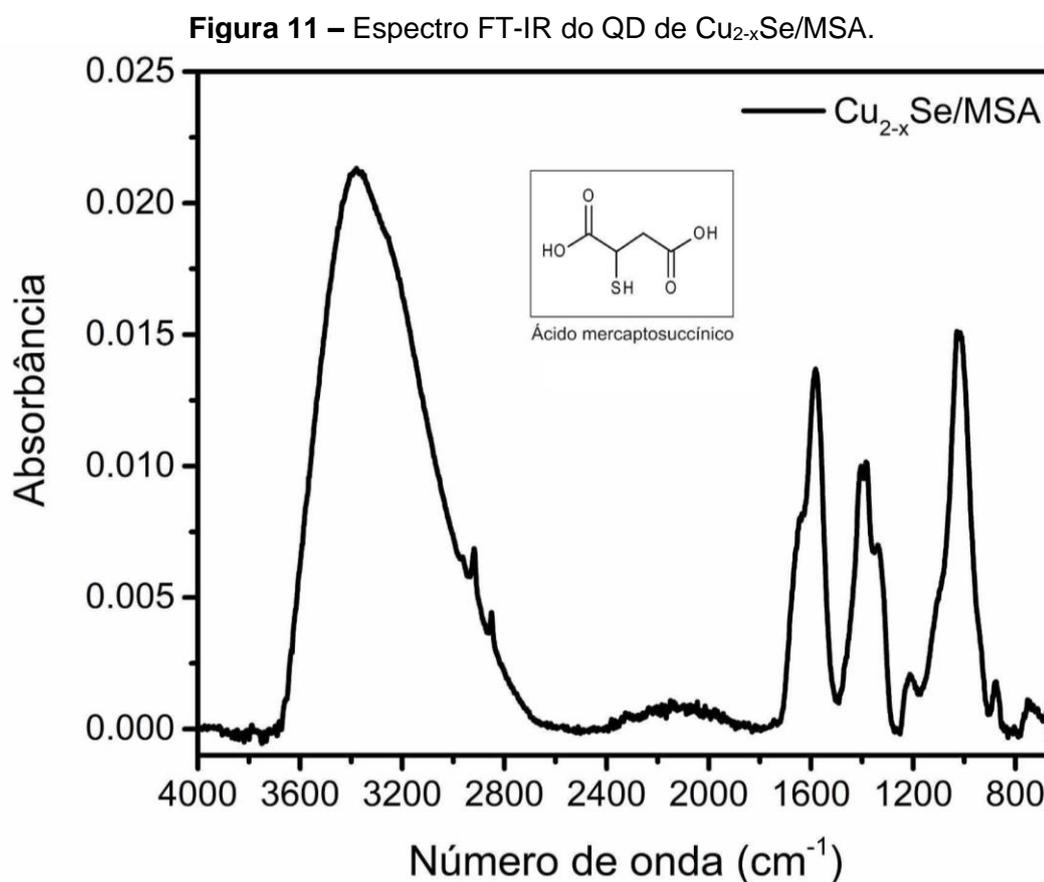
A medida de tendência (bias) foi realizada através da aplicação de um teste T a um nível de confiança de 95% (FILGUEIRAS, P. R.; ALVES, J. C. L.; POPPI, R. J., 2014). As faixas de limite de detecção e quantificação foram calculadas a partir do algoritmo MVC1, o qual está presente na “*toolbox*” para MATLAB cujos cálculos são baseados na medida do Sinal Analítico Líquido (*Net Analytical Signal*, NAS), que é definido como a parte do sinal ortogonal ao sinal dos interferentes e possui informações exclusivas sobre o analito e ainda é proporcional a concentração desse (ALLEGRIANI, F.; OLIVIERI, A. C., 2004; OLIVIERI, A. C.; GOICOECHEA, H. C.; IÑÓN, F. A., 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE NO INFRAVERMELHO

5.1.1 Caracterização dos pontos quânticos

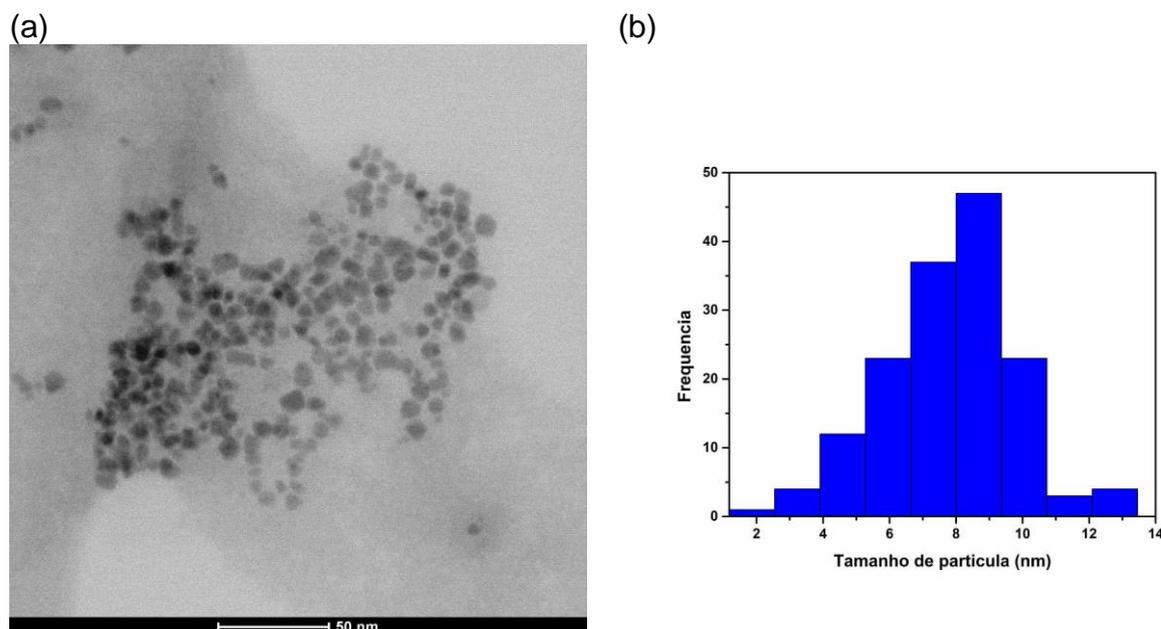
Os pontos quânticos de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ utilizados neste trabalho foram sintetizados por Da Silva (2021), armazenados à temperatura ambiente na ausência de luz e então foram caracterizados por infravermelho médio com ATR (DA SILVA, 2021). O perfil espectral apresentou bandas de absorção características por volta de 3500 cm^{-1} , referentes às bandas de OH^- e estiramentos assimétricos e simétricos da ligação $-\text{COO}^-$ por volta de 1000 cm^{-1} até 1600 cm^{-1} (Figura 11).



Fonte: Autoria própria.

Ainda segundo Da Silva (2021), as nanopartículas possuem formato esférico e percebe-se que possuem uma distribuição do tamanho dos nanocristais (NCs) relativamente estreita com tamanho médio em 8,6 nm para uma contagem de 110 nanopartículas (Figura 12).

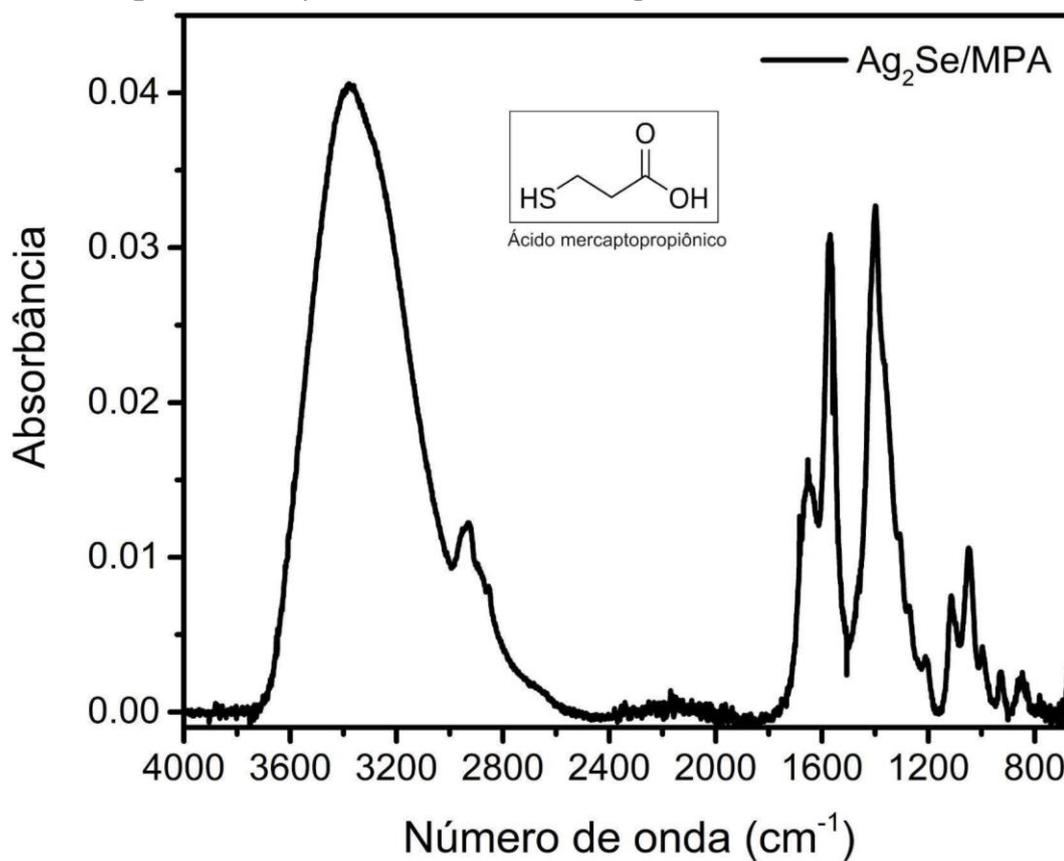
Figura 12 – a) Microscopia eletrônica de transmissão (HRTEM) de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ e b) Histograma com distribuição de diâmetros dos pontos quânticos $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$.



Fonte: Adaptado de Da Silva, 2021.

Também foram utilizados QDs de seleneto de prata ($\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$) em formato de esferóides nos estudos. Um material semelhante foi utilizado por Pereira e colaboradores em 2021, utilizando como estabilizante o ácido mercaptosuccinico (MSA) promovendo intensificações de sinal de até 4 vezes para corantes como o cristal violeta e auramina (PEREIRA, C. F. *et al.* 2020). O trabalho desenvolvido nesta tese focou na utilização de um estabilizante diferente (o MPA), o qual promoveu alterações no perfil de emissão e absorção desses pontos quânticos e, deste modo, podem levar a perfis de intensificação de sinal diferentes para esta pesquisa (DE SOUZA SOBRINHA, I. G. *et al.*, 2024). Os espectros FT-IR demonstram a presença de bandas características em posições parecidas com os de seleneto de cobre em aproximadamente 1580 e 1385 cm^{-1} , as quais estão relacionadas às bandas de -COO^- além de outras bandas de menor intensidade por volta de 1000 cm^{-1} (Figura 13).

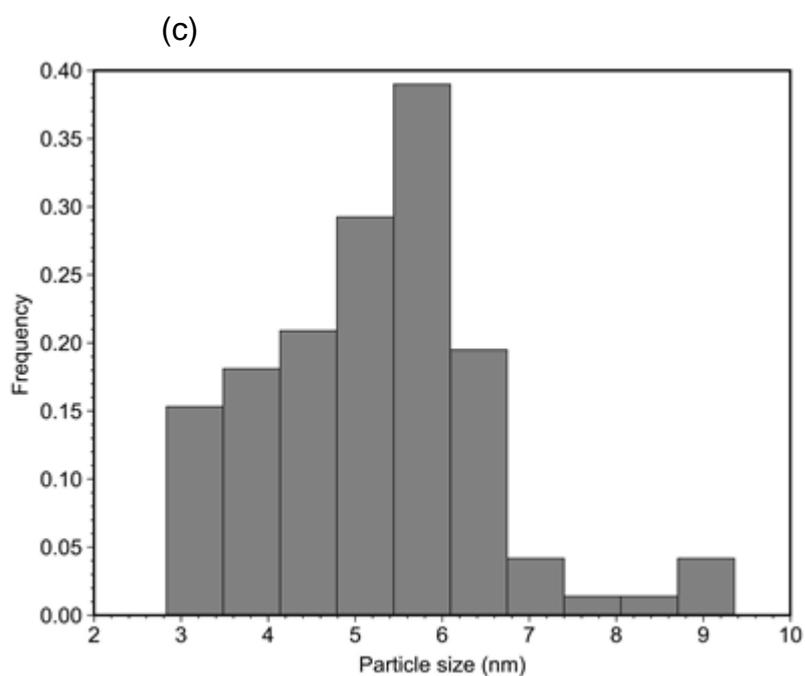
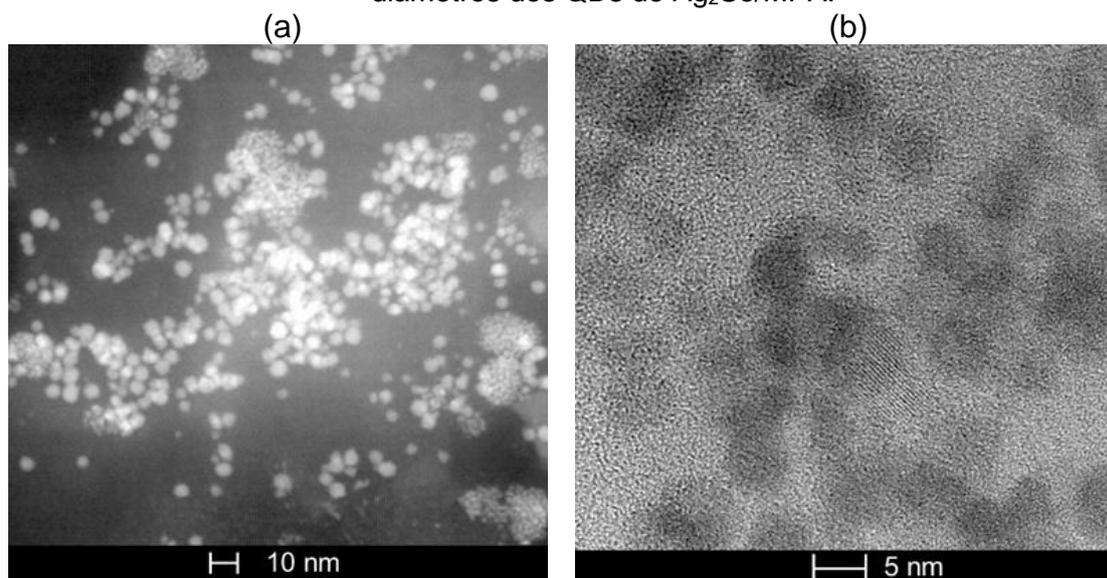
Figura 13 – Espectro FT-IR do QD de Ag₂Se/MPA diluído 2 vezes.



Fonte: Autoria própria.

Os QDs de prata (Ag₂Se/MPA), foram caracterizados com HRTEM e apresentaram tamanho médio de 6 ± 3 nm com a contagem de 110 medidas, como pode-se observar a partir da Figura 14a e 14c.

Figura 14 – a,b) HRTEM do QD de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$, c) Histograma com distribuição de diâmetros dos QDs de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$.



Fonte: Autoria própria.

Como já explicado, o tamanho da nanopartícula é fator diretamente relacionado à técnica SEIRA em si, pois os fenômenos de absorção da radiação são mais favorecidos em detrimento ao espalhamento (em geral favorece a espectroscopia SERS) quando se tem NPs de tamanho reduzido (AROCA, R., 2016).

Uma comparação pode ser feita com outros tipos de nanopartículas empregadas em trabalhos envolvendo SEIRA e SERS na literatura (Tabela 1).

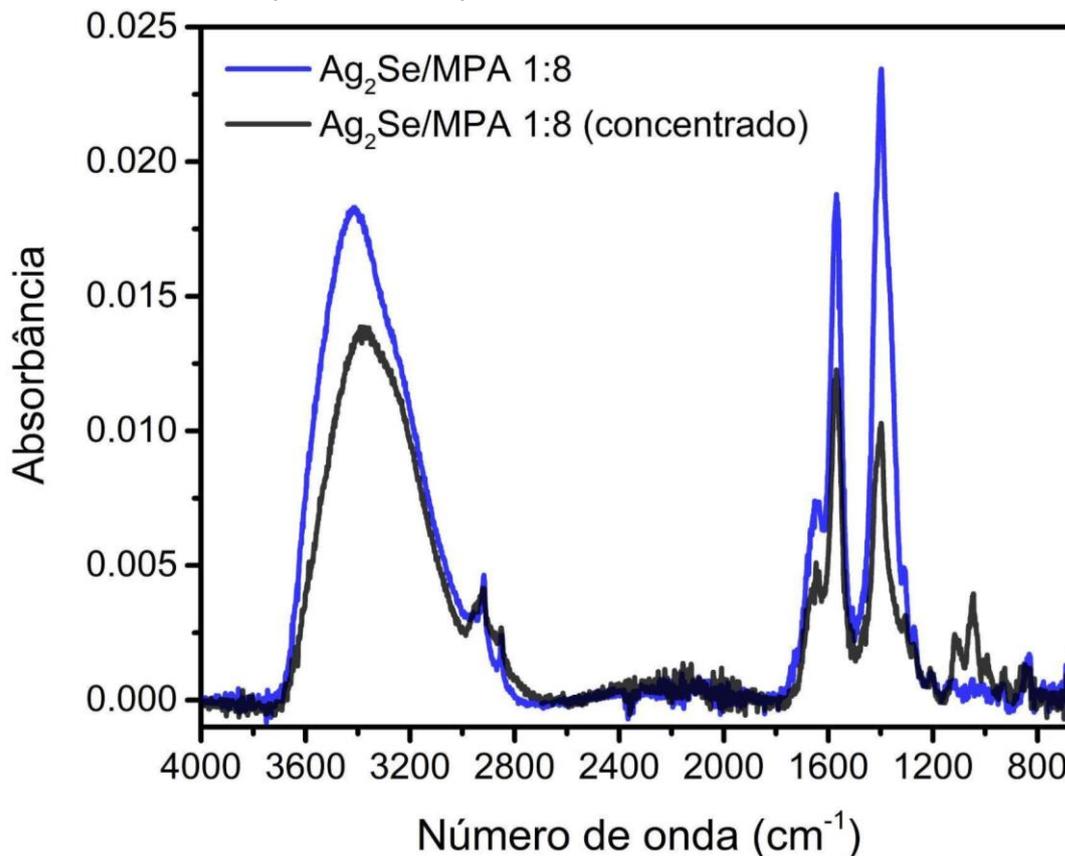
Percebe-se que os tamanhos médios das NPs utilizadas no presente estudo são próximos a outras utilizadas na literatura, porém trazendo um novo tipo de estabilizante. Além disso, sabe-se que pontos quânticos de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ com diâmetros na faixa de 2,8 - 10,4 nm se encontram em confinamento quântico e possuem picos de absorção no infravermelho ajustáveis de acordo com o tamanho da nanopartícula, variando de 1532 cm^{-1} até 7178 cm^{-1} (SAHU, A. *et al.*, 2012). Portanto, esse efeito permite uma interação entre o campo eletromagnético (EM) incidente com o campo elétrico local, o que intensifica o momento dipolar das ligações do analito.

Tabela 1 – Comparação entre NPs utilizadas em trabalhos da literatura.

Fonte	Tipo de NP - Estabilizante	Tamanho Médio (nm)
SAHA, A. <i>et al.</i> 2021	AuNP – Citrato	10,0
EID, S. M. <i>et al.</i> 2021	AgNP - Citrato	10,0
PEREIRA, C. F. <i>et al.</i> 2020	Ag_2Se QD – MSA	5,7
Este Trabalho	Cu_{2-x}Se QD – MSA	8,6
Este Trabalho	Ag_2Se QD – MPA	6,0

Durante os experimentos com os QDs de seleneto de cobre ($\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$), percebeu-se que eles formavam uma dispersão instável, tendendo a sedimentar após alguns minutos. Testes para concentrar os $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ e eliminar algum excesso de estabilizante não mostraram diferença espectral, apenas se detectou uma aceleração da sedimentação das nanopartículas. Já os QDs seleneto de prata ($\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$) apresentaram estabilidade coloidal bem melhor, se mostrando mais estáveis durante o tempo e, além disso, o procedimento para eliminar excesso de estabilizante se mostrou útil, produzindo bons resultados em etapas posteriores. A diferença espectral em relação à mesma diluição entre QDs $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ concentrados e QDs apenas diluídos da solução mãe pode ser vista na Figura 15.

Figura 15 – Comparação entre os espectros de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ antes (azul) e depois (preto) de procedimento para retirar excesso de estabilizante.



Fonte: Autoria própria.

Após as análises iniciais com as nanopartículas, trabalhou-se com QDs de cobre ($\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$) em diferentes diluições a partir da solução estoque e, no caso dos QDs de prata ($\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$), resolveu-se trabalhar com eles após procedimento para remoção do excesso de estabilizante. Não foi possível determinar a concentração das suspensões coloidais para os experimentos subsequentes devido à falta de equipamentos disponíveis e metodologias compatíveis, durante a execução do trabalho, então trabalhou-se com diferentes diluições a partir da solução estoque.

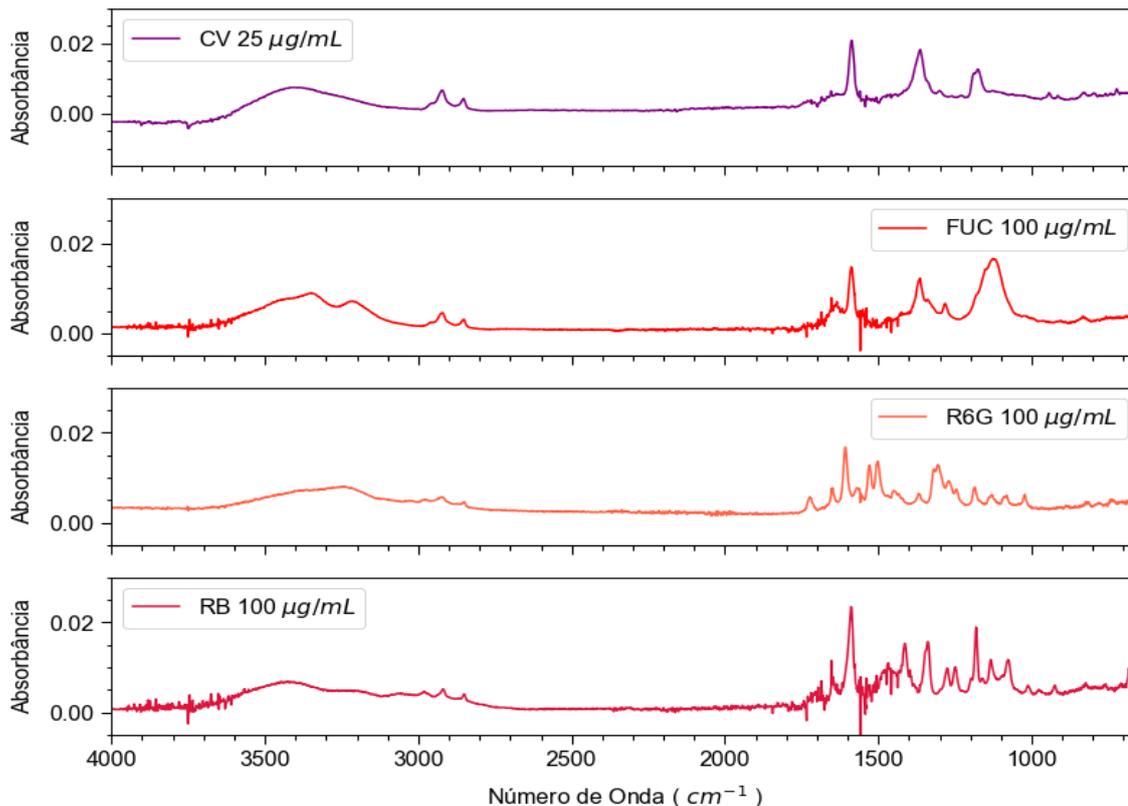
5.1.2 Avaliação espectral dos corantes e avaliação das melhores condições de análise

Em relação aos analitos, primeiro investigou-se as condições de análise para obtenção de espectros com boas resoluções e, conseqüentemente, boa relação sinal-ruído.

Nessa etapa inicial foram analisadas amostras de 4 corantes: fucsina, metil violeta, rodamina B e rodamina 6G. Primeiro, verificou-se a melhor faixa de concentração para se proceder a otimização dos demais fatores. Assim, os analitos foram submetidos a varreduras no FT-IR em concentrações que variaram de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ até 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Os melhores resultados, baseados na melhor relação sinal-ruído para identificação das bandas relevantes de cada corante, estão dispostos na Figura 16 (Todos os gráficos estão no Apêndice A).

Figura 16 – Espectros de soluções aquosas de corantes testados com melhor relação sinal-ruído obtidos inicialmente.



Fonte: Autoria própria.

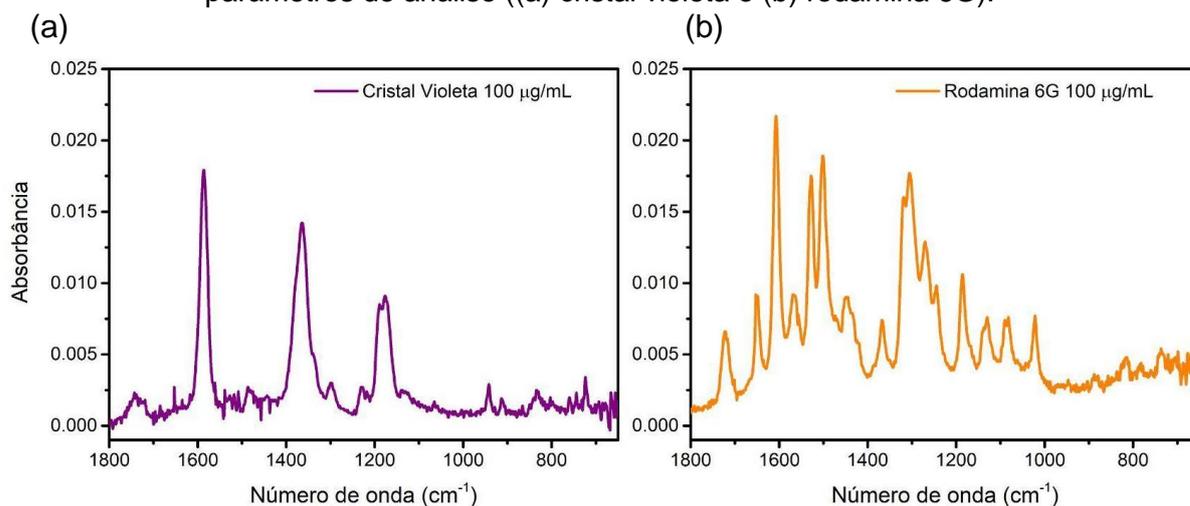
Percebe-se que a melhor concentração para trabalho foi de 100 µg/mL para os corantes, exceto o violeta cristal que mostrou melhores sinais espectrais na concentração de 25 µg/mL. Sabe-se que a sensibilidade da medida em SEIRA está diretamente relacionada ao número de reflexões no guia de ondas (cristal de ATR) (REF). Portanto, tal estudo é relevante para comparar o desempenho da medida ATR, com apenas uma reflexão, em relação aos estudos descritos na literatura com acessórios de múltiplas reflexões. Assim, quanto à concentração do analito, percebe-se que é possível se utilizar faixas de concentração adequadas na faixa de mg/L equivalentes a outros trabalhos envolvendo a mesma técnica (HU, Y. *et al.*, 2019; PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020; SAHA, A. *et al.*, 2021).

Também é possível perceber que a região mais informativa dos espectros vai de cerca de 1800 cm⁻¹ até 800 cm⁻¹. Portanto, essa região foi escolhida como faixa de trabalho.

Em seguida, analisou-se as melhores condições de análise em relação ao número de varreduras e à resolução do equipamento. Para tal estudo, essas variáveis foram analisadas sistematicamente para os corantes violeta cristal e rodamina 6G. Além do comportamento dos espectros, também se avaliou o tempo de análise em cada uma das condições.

Em primeiro lugar, foi avaliada qualitativamente a quantidade de ruído presente nos espectros e, então, percebeu-se que, de modo geral, as análises com resolução menor (4 cm⁻¹) foram melhores que as de maior resolução (2 cm⁻¹). Quanto ao número de varreduras, foi percebido uma diferença razoável de 16 para 32 varreduras, sendo melhor o resultado com mais varreduras. Quando se compara os resultados obtidos com 32 e 64 varreduras, não foi detectado uma melhora significativa que justifique o maior tempo necessário para análise. Os espectros reduzidos das melhores condições (resolução de 4 cm⁻¹ e 32 varreduras) são mostrados na Figura 17. No Apêndice B são apresentados os espectros em toda a faixa espectral obtidos.

Figura 17 – Espectros das melhores condições encontradas no estudo de otimização dos parâmetros de análise ((a) cristal violeta e (b) rodamina 6G).



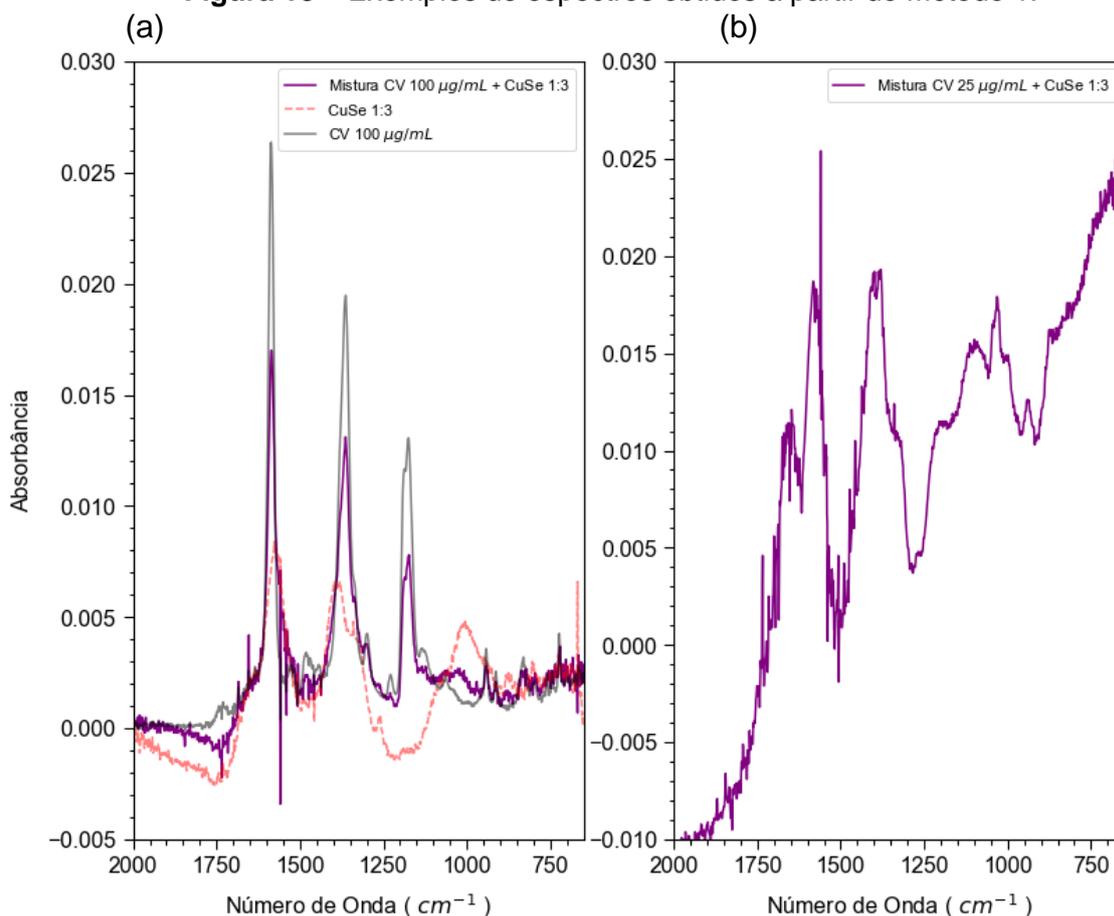
Fonte: Autoria própria.

A escolha dessas condições de análise, como já citado, foi realizada considerando-se o tempo de análise, conforme descrito a seguir. Em média, as amostras aquosas levam em torno de 9 minutos para secar no cristal ATR. Além disso, em termos de resolução, leva-se em torno de 22 minutos para se realizar uma medida com 2 cm^{-1} e 32 varreduras, enquanto para uma medida com 4 cm^{-1} e 32 varreduras leva-se em torno de 15 minutos. Já a medida com 64 varreduras requereu tempo médio em torno de 32 minutos com 2 cm^{-1} e 23 minutos com 4 cm^{-1} .

5.2 ANÁLISES SEIRA DOS CORANTES COM $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$

O efeito SEIRA foi inicialmente investigado empregando-se $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ em diferentes concentrações através de misturas entre as soluções do corante violeta cristal e a suspensão coloidal $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$, nessa etapa foram realizados ensaios em triplicata. Esse método número 1, apresentou resultados insatisfatórios, não se verificando intensificação de sinal nos testes realizados (Figura 18a). Além disso, os espectros também apresentaram inclinação linear, decorrente do espalhamento da radiação, em alguns casos como pode ser visto na Figura 18b, sem qualquer intensificação de sinal.

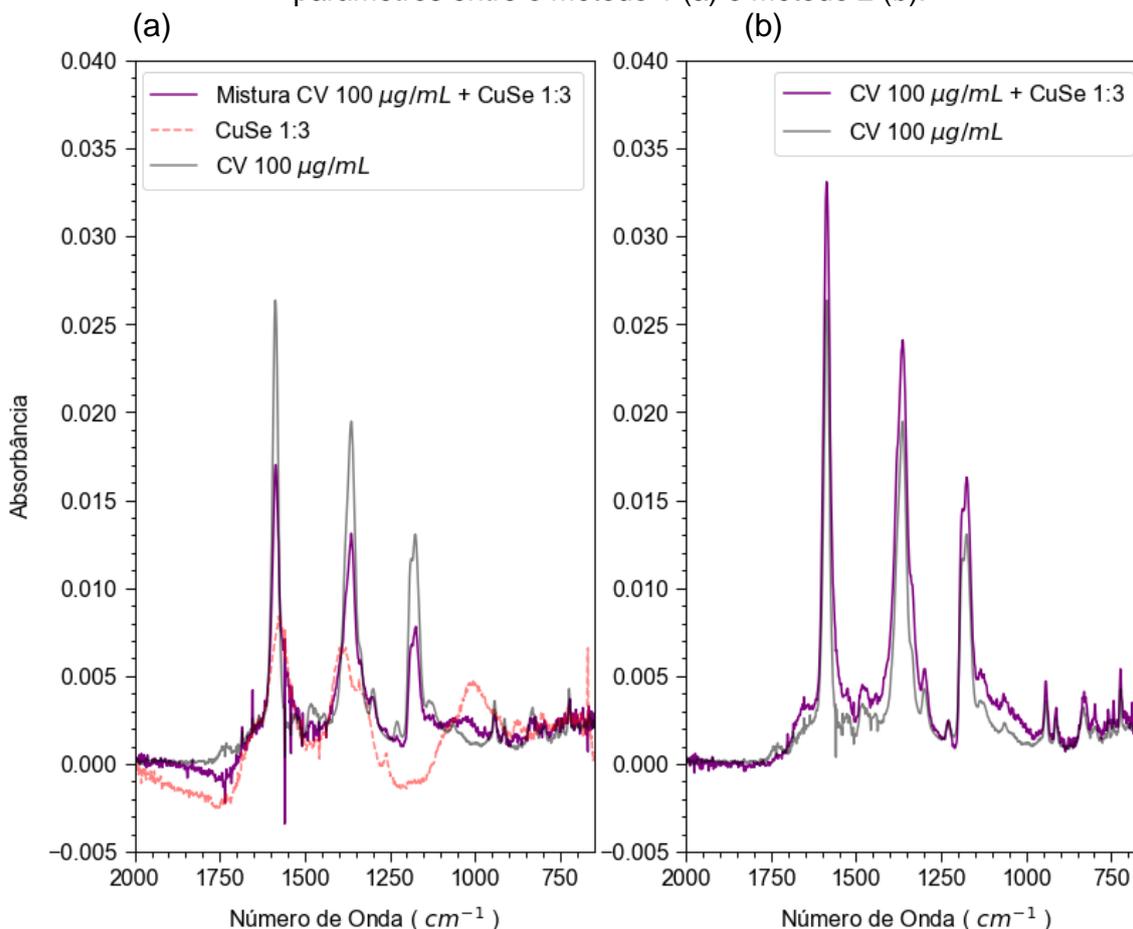
Figura 18 – Exemplos de espectros obtidos a partir do Método 1.



Fonte: Autoria própria.

Uma das causas para o insucesso desse procedimento pode ser o baixo volume utilizado (1 μL) devido ao tamanho do cristal ATR do equipamento utilizado, o qual só comporta esse pequeno volume de amostra. As fontes de incertezas são aumentadas também com a preparação das misturas com soluções muito diluídas e a utilização de uma NP que tende a se sedimentar rapidamente ao longo do tempo. Esse volume pequeno utilizado contrasta com outros trabalhos como o de Pereira *et al.* 2020, no qual se utilizou 20 μL de soluções e o de Da Silva *et al.* 2021, no qual foram utilizados 10 μL . Dessa forma, buscou-se uma nova abordagem através do método 2. Ela também foi empregada utilizando o QD de $Cu_{2-x}Se/MSA$ e o método se mostrou mais eficiente, pois além de facilitar a visualização da intensificação do sinal (já que o sinal da nanopartícula foi suprimido na realização do branco), foi observado que havia intensificação das bandas espectrais analito, violeta cristal. Uma comparação entre os métodos pode ser observada na Figura 19. Desse modo, todos os ensaios subsequentes foram realizados utilizando-se o método 2.

Figura 19 – Comparação dos espectros médios (3 medidas) obtidos com os mesmos parâmetros entre o Método 1 (a) e Método 2 (b).

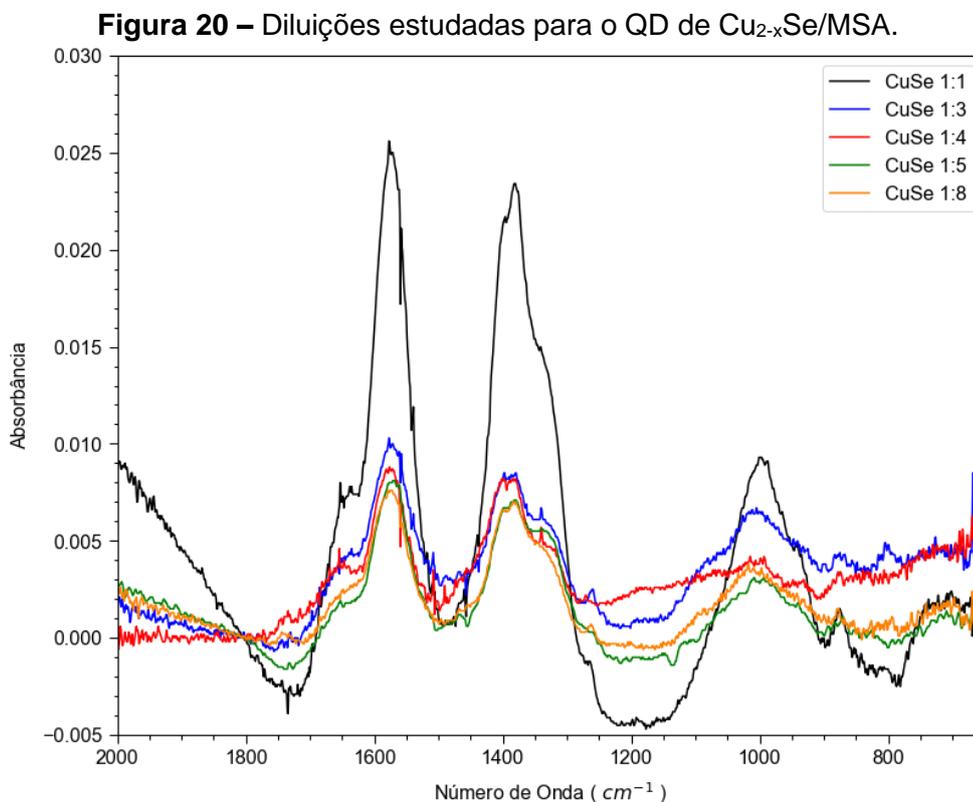


Fonte: Autoria própria.

De acordo com Hartstein; Kirtley; Tsang (1980), a intensificação de sinal evolui com o aumento da quantidade de NPs na superfície, porém a partir de certo ponto o acréscimo de mais partículas vai causando reação contrária no efeito, isso se deve ao fato da sobreposição de nanopartículas dificultar a formação de *hot-spots* formados entre as nanopartículas, os quais necessitam de máxima aproximação das NPs. Subsequentemente, avaliou-se uma diluição das NPs que apresentasse espectro com bandas de intensidade parecidas com as do analito, visto que a quantidade de NPs na superfície é um fator crucial para a ocorrência da intensificação de sinal. Essa questão da simetria entre as intensidades dos sinais foi observada no trabalho de Pereira *et al.* (2020).

Esse fator também foi observado na análise de azul de metileno com nanopartículas de ouro, em que as melhores condições foram obtidas com uma quantidade de 20 mg e ao se aumentar essa quantidade havia um decréscimo nas

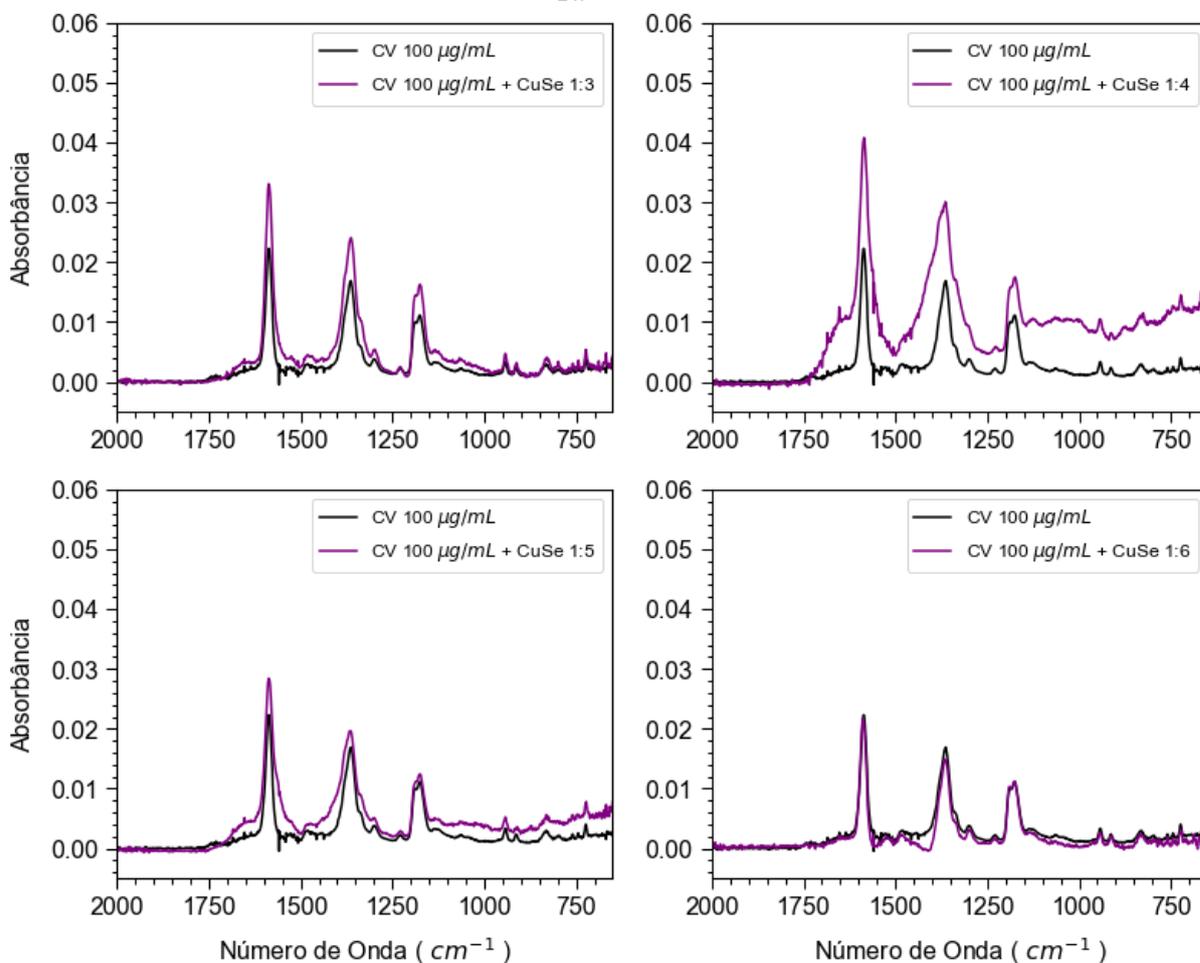
bandas de absorção do analito (SAHA, A. *et al.*, 2021). Assim, analisou-se diluições com água (de 2 vezes até 9 vezes) dos QDs $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ e verificou-se que não havia uma diferença espectral considerável após a diluição de 1 parte da suspensão para 3 partes de solvente até 1:8 (Figura 20).



Fonte: Autoria própria.

A partir da análise espectral das NPs de cobre, iniciou-se as análises de SEIRA com concentrações de violeta cristal a partir de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, as quais possuíam intensidade de sinal na mesma faixa das apresentadas pelos pontos quânticos, porém sem resultados significativos. Por conseguinte, buscou-se incrementar a concentração do analito até 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e para diluições de NP de 1:3 observou-se os primeiros resultados com intensificação de sinal. Então, estudou-se o fator diluição de NPs (iniciando de 1:3 até 1:6) em relação a uma concentração fixa de analito em que se observou uma intensificação de sinal até diluição 1:4 e depois decréscimo com diluições maiores (Figura 21).

Figura 21 – Espectros SEIRA do corante cristal violeta 100 $\mu\text{g/mL}$ variando a diluição de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se/MSA}$.



Fonte: Autoria própria.

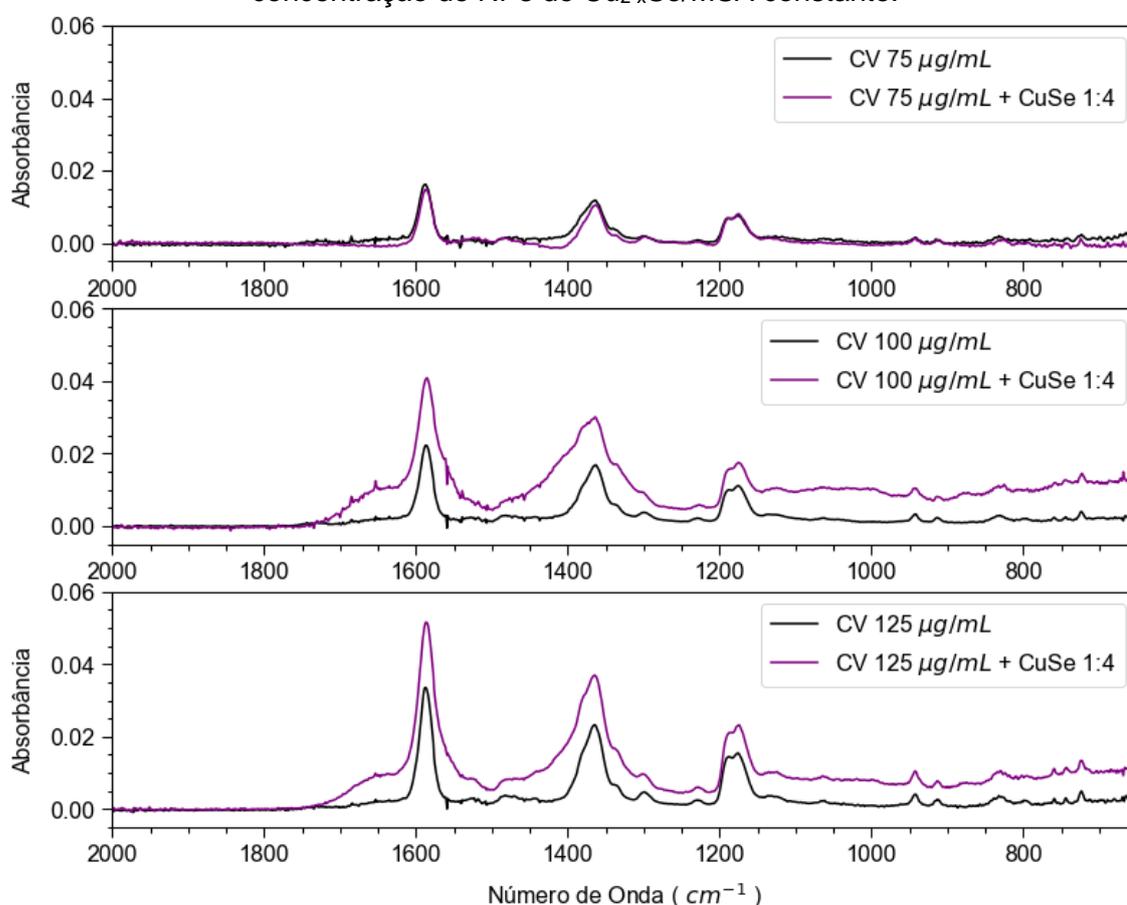
Foram calculados os fatores de intensificação referentes aos espectros da Figura 19 analisando-se os 3 principais picos nos gráficos em 1587 cm^{-1} , 1365 cm^{-1} e 1175 cm^{-1} e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2. Percebe-se que há uma proporção de intensificação entre as bandas em um mesmo espectro e que a intensificação máxima nesse caso foi de 1,54.

Tabela 2 – Fatores de intensificação para estudo com CV e diferentes concentrações de QDs de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$.

Posição banda (cm^{-1})	Fator de Intensificação (EF)		
	CV 100 $\mu\text{g} / \text{mL} + \text{CuSe } 1:3$	CV 100 $\mu\text{g} / \text{mL} + \text{CuSe } 1:4$	CV 100 $\mu\text{g} / \text{mL} + \text{CuSe } 1:5$
1587	1,26	1,54	1,08
1365	1,23	1,55	1,02
1175	1,25	1,34	0,95

Em seguida, testou-se a melhor diluição 1:4 em testes envolvendo diferentes concentrações de violeta cristal como pode ser observado na Figura 22.

Figura 22 – Espectros SEIRA do corante cristal violeta com concentrações variadas e concentração de NPs de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ constante.



Fonte: Autoria própria.

Percebe-se que a diminuição na concentração não favoreceu a intensificação de sinal e o aumento até 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou EF da ordem de 1,5, o que não foi

uma grande variação da melhor condição anterior. Por conseguinte, resolveu-se montar um planejamento experimental no sentido de se analisar diferentes diluições, próximas à diluição de 1:4, e concentrações de CV entre 100 e 150 µg/mL, visto que abaixo disso não foram obtidos resultados satisfatórios.

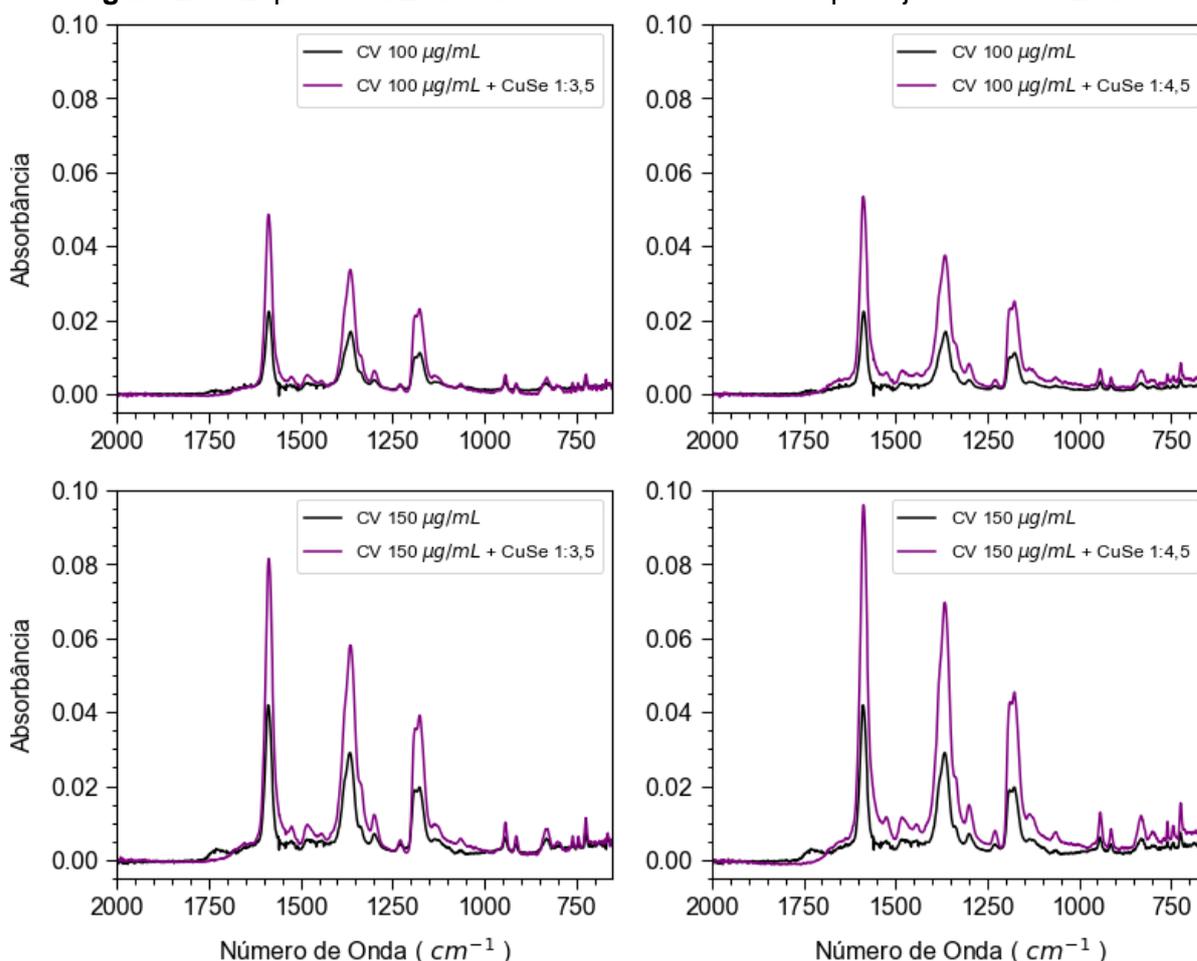
O planejamento teve seu esquema montado de acordo com a Tabela 3 e a resposta foi a média entre os fatores de intensificação para as 3 bandas características visto que nos experimentos anteriores eles se mostraram quase idênticos.

Tabela 3 – Fatores de intensificação para planejamento com CV e QDs de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$.

	A	B	[CV] µg / mL	[CuSe] 1:x	EF (médio)
1	-1	-1	100	1:3,5	1,78
2	+1	-1	150	1:3,5	1,98
3	-1	+1	100	1:4,5	1,96
4	+1	+1	150	1:4,5	2,34

Na Figura 23 são apresentados os espectros relativos a cada ponto do planejamento fatorial realizado.

Figura 23 – Espectros SEIRA do corante CV relativos ao planejamento realizado.



Fonte: Autoria própria.

Comparando-se os resultados obtidos àqueles apresentados por Pereira *et al.* (2020) utilizando-se Ag₂Se/MSA, percebe-se que o presente trabalho, utilizando Cu_{2-x}Se/MSA, apresentou um desempenho inferior com intensificação máxima de 2,34 em uma concentração de 150 µg/mL enquanto os autores obtiveram intensificações da ordem de até 4,1 para o mesmo analito a uma concentração de 30 µg/mL.

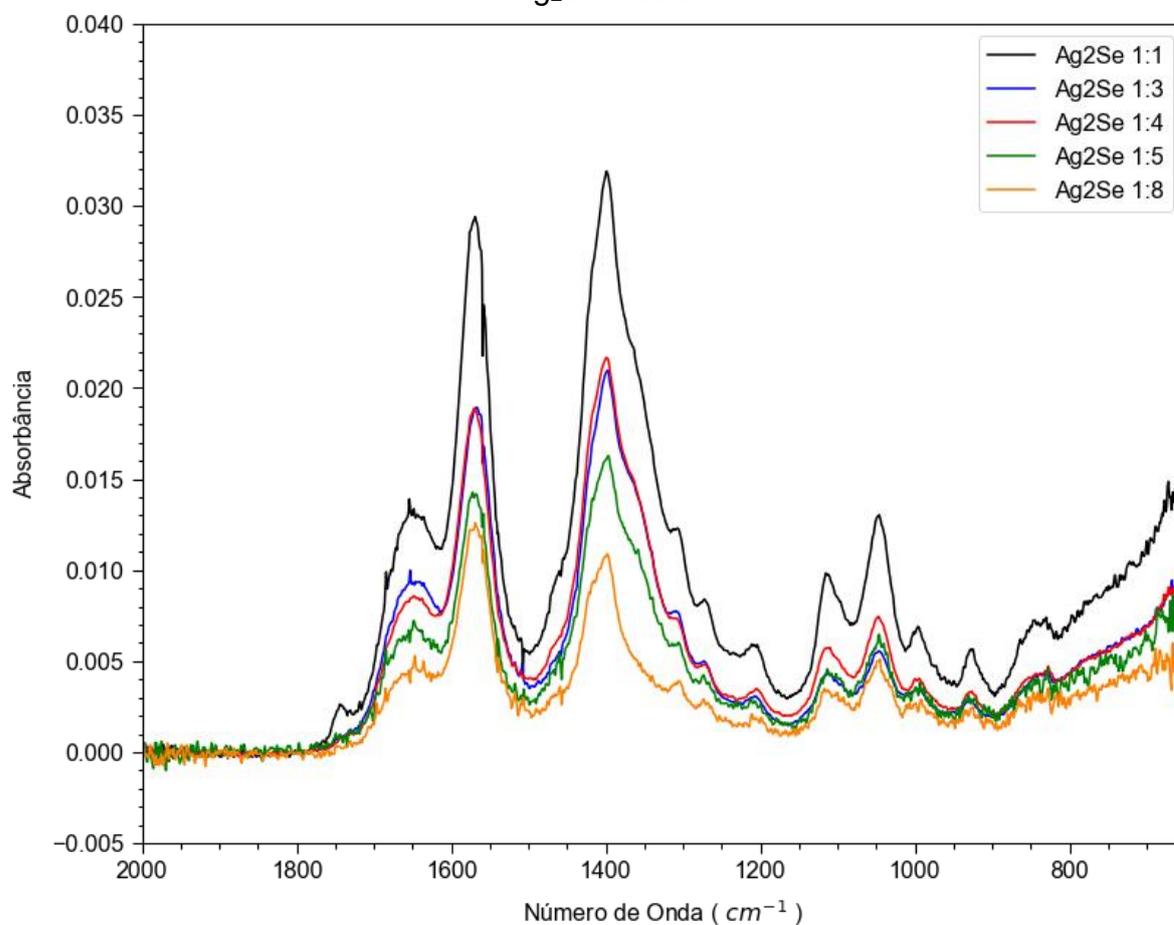
Por outro lado, os resultados aqui obtidos são comparáveis àqueles descritos por Da Silva *et al.* (2021), os quais alcançaram intensificações em torno de 1,9 para o violeta cristal em uma concentração de 30 µg/mL utilizando a mesma nanopartícula utilizada no presente trabalho. Todavia, é preciso salientar que os trabalhos citados foram realizados com equipamento cujo compartimento de amostras suportava um maior volume de analito no cristal ATR, além desse possuir maior número de reflexões internas.

Para além do violeta cristal, foram analisados outros 3 corantes (fucsina ácida, rodamina 6G e rodamina B), para os quais não se observou intensificação de sinal nas faixas de concentração utilizadas neste trabalho.

5.3 ANÁLISE SEIRA DOS CORANTES COM $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$

Em seguida aos estudos com $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ foram iniciados os estudos com $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ que seguiram o mesmo procedimento descrito no método 2. Em primeiro lugar, foram analisados os espectros de várias diluições (a partir de uma pré-concentração inicial descrita anteriormente, Figura 15) a fim de se escolher uma faixa adequada para as análises (Figura 24).

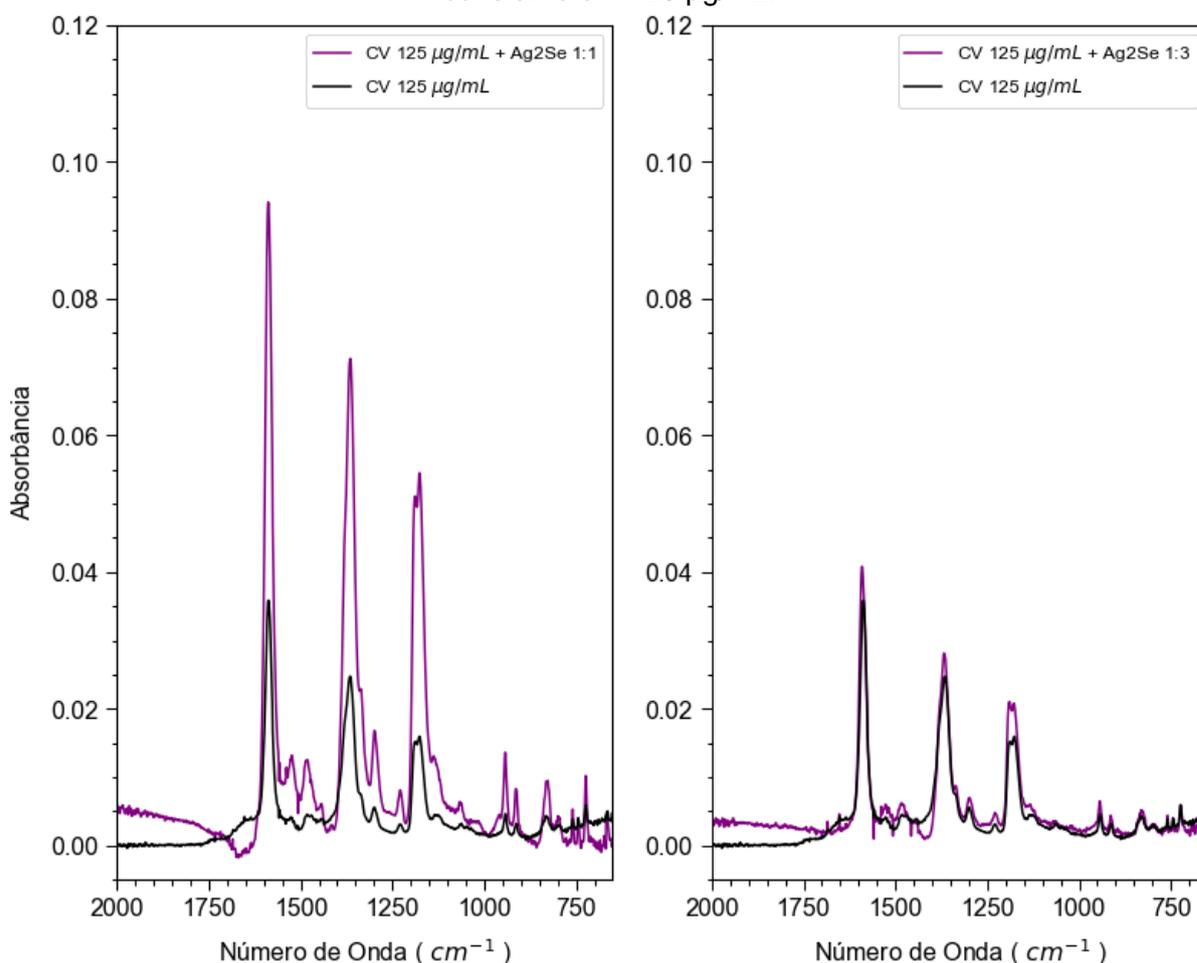
Figura 24 – Espectros FT-IR da faixa de impressão digital das diluições feitas com QD de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$.



Fonte: Autoria própria.

Através da análise da Figura 24, testou-se inicialmente a hipótese de que intensificações ocorrem quando se utiliza uma concentração de NPs com intensidades de bandas parecidas com as do analito em questão. Portanto, testou-se inicialmente condições com violeta cristal em 125 $\mu\text{g/mL}$ em relação a diluição 1:1 e para efeito de comparação diluiu-se mais a solução para verificar o comportamento do efeito (Figura 25).

Figura 25 – Comparação entre diluições de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ mantendo-se a concentração do CV constante em 125 $\mu\text{g/mL}$.

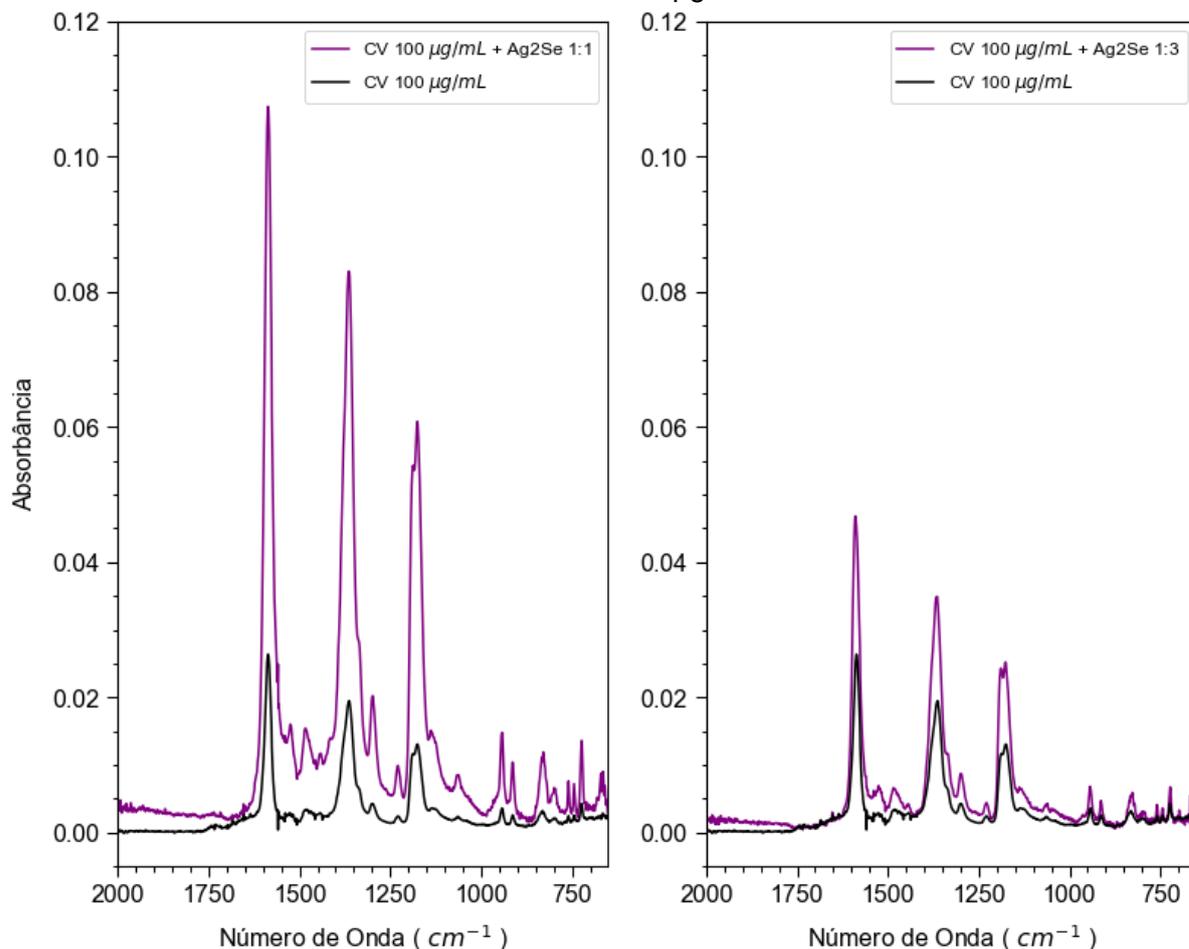


Fonte: Autoria própria.

Como esperado, utilizando a diluição de 1:1, foram obtidos fatores de intensificação (EF) maiores para o cristal violeta, os quais foram de 2,62 (1587 cm^{-1}), 2,88 (1365 cm^{-1}) e 3,42 (1175 cm^{-1}). Com base nesses resultados, diminuiu-se a concentração do analito para verificar se o efeito se manteria. Na Figura 26, percebe-se que a intensificação dos sinais para o violeta cristal foi ainda maior em uma concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os valores foram de 4,08 (1587 cm^{-1}), 4,30 (1365 cm^{-1})

e 4,65 (1175 cm^{-1}) na diluição 1:1 e de 1,74 (1587 cm^{-1}), 1,81 (1365 cm^{-1}) e 1,91 (1175 cm^{-1}) para a diluição de 1:3.

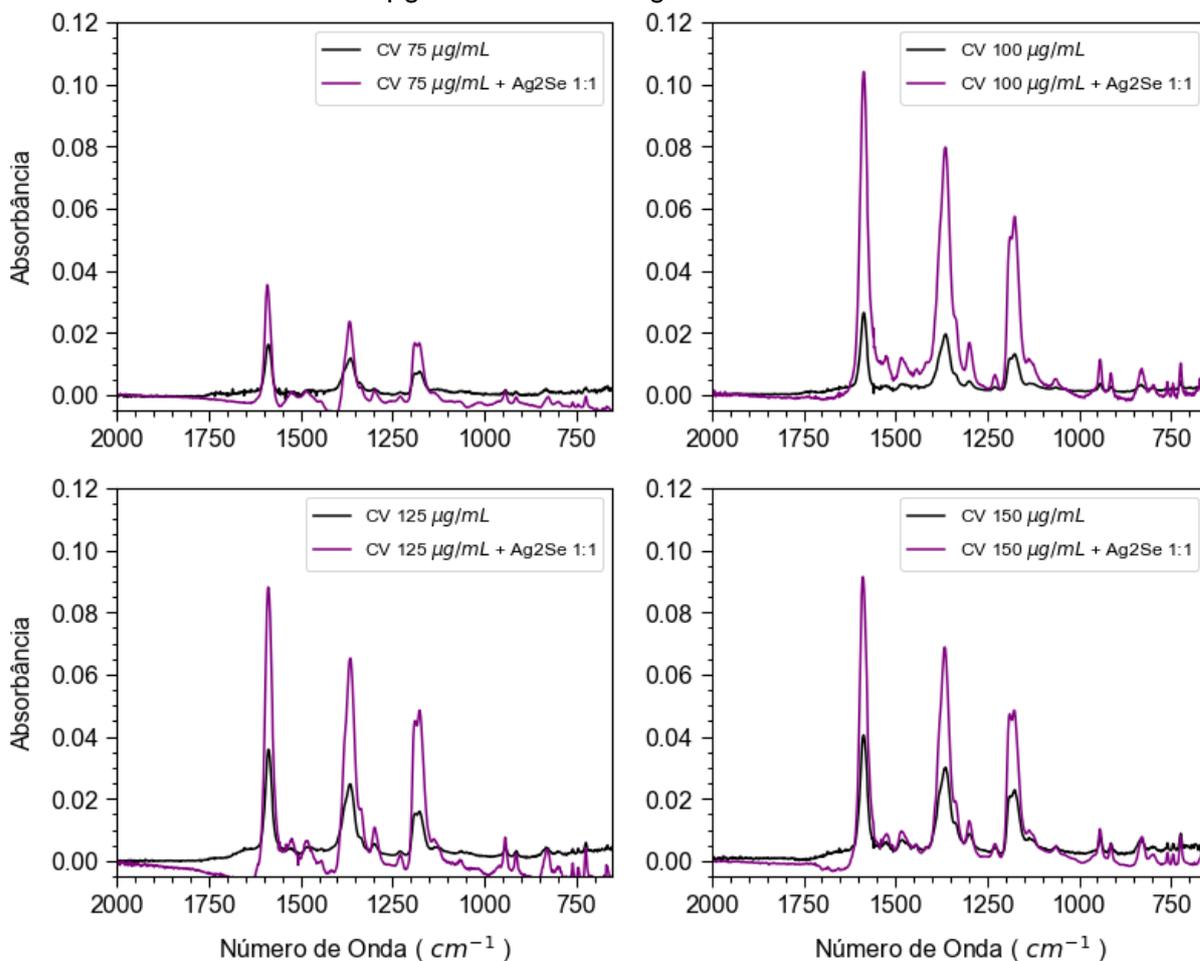
Figura 26 – Comparação entre diluições de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ mantendo-se a concentração do CV constante em $100\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$.



Fonte: Autoria própria.

Avaliando-se os resultados, resolveu-se explorar as duas concentrações de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ analisadas. Então, em primeiro lugar estudou-se o comportamento do CV em concentrações que variaram de $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ até $150\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ e os resultados obtidos mostraram que a $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ não havia intensificação de sinal. Só foi observado o efeito SEIRA a partir de $75\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ como pode ser observado na Figura 27.

Figura 27 – Espectros SEIRA do corante Cristal Violeta variando a concentração de 75 até 150 $\mu\text{g/mL}$ e fixando o $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ em 1:1.

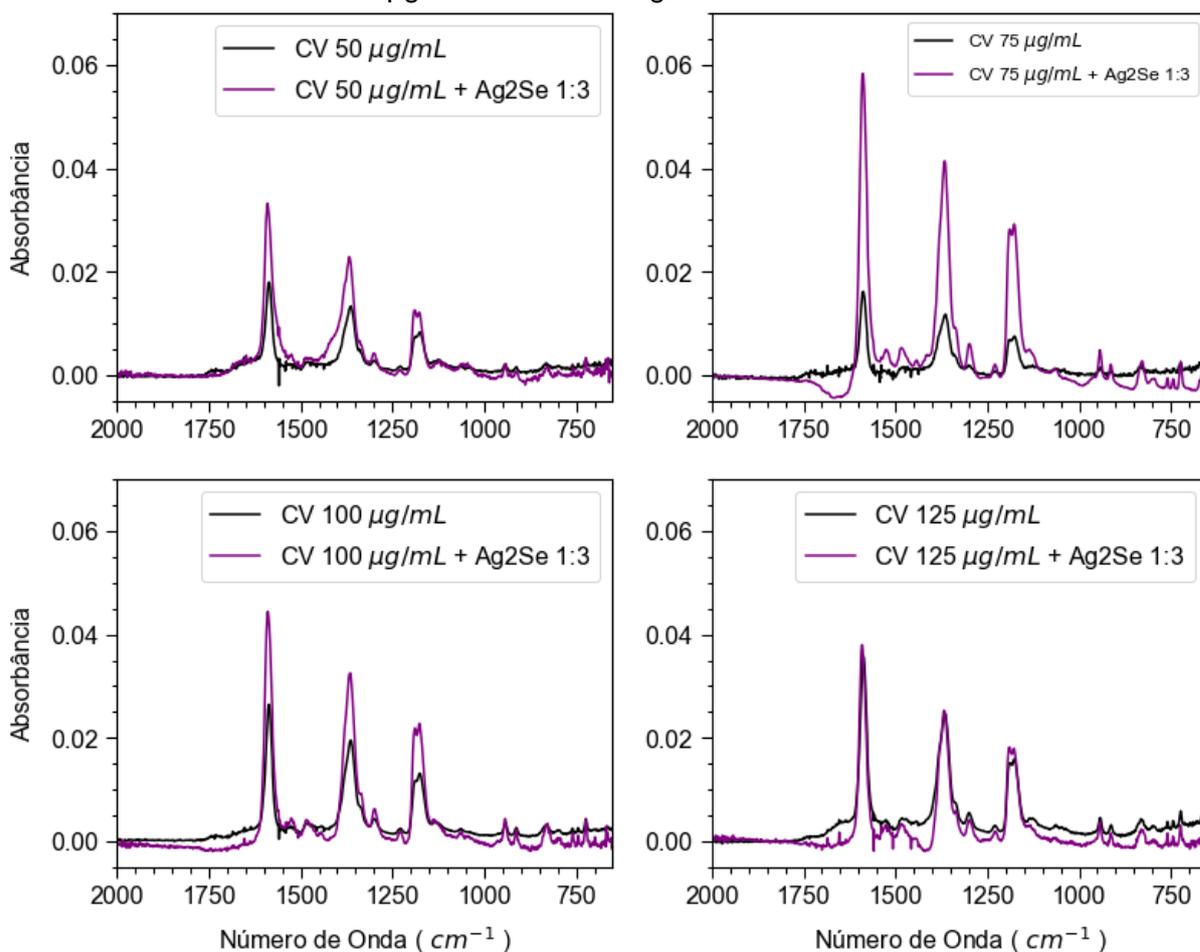


Fonte: Autoria própria.

Percebe-se que a maior intensificação continuou sendo para a concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ e apesar do efeito ser percebido em concentrações de CV maiores, verifica-se que houve uma diminuição nos EFs (Figura 27).

Em seguida buscou-se avaliar o comportamento da diluição 1:3 frente a outras concentrações do corante em questão além daquela de 100 $\mu\text{g/mL}$ como pode ser visto na Figura 28. Percebeu-se que houve uma intensificação maior diminuindo-se a concentração para 75 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 28 – Espectros SEIRA do corante Cristal Violeta variando a concentração de 50 até 125 $\mu\text{g/mL}$ e fixando o $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ em 1:3.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Fatores de intensificação para estudos envolvendo CV e $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$.

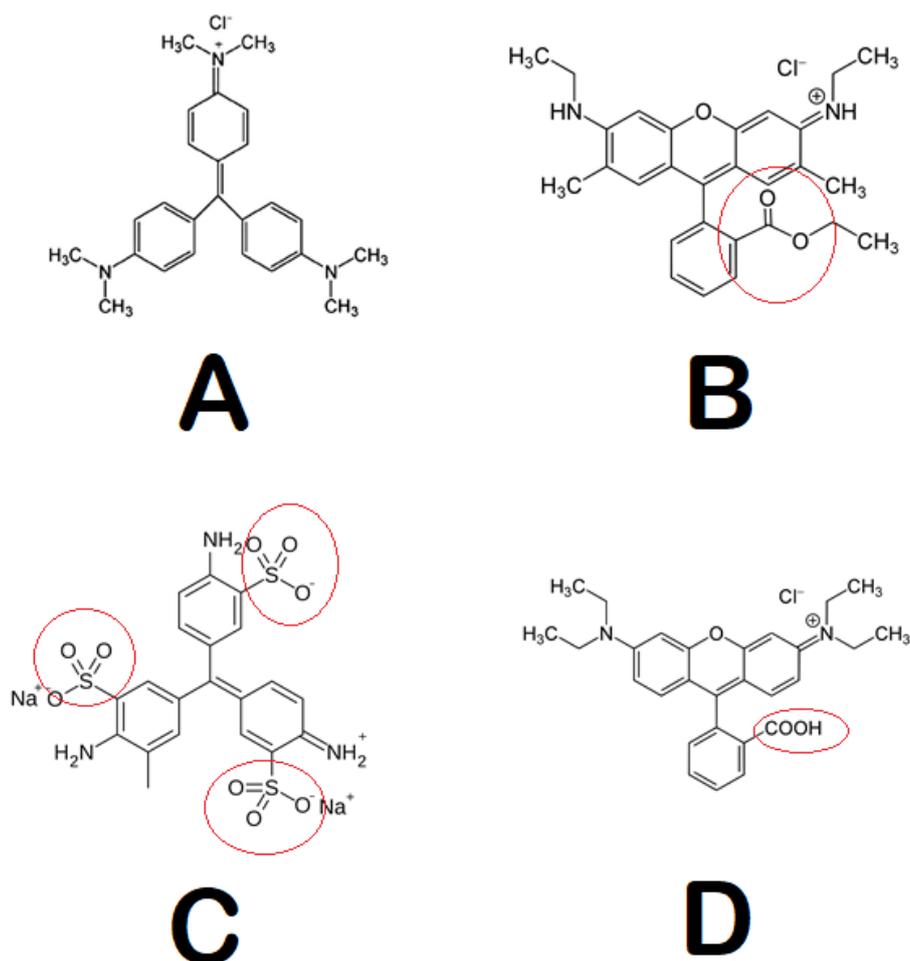
Posição da banda (cm^{-1})	Fator de Intensificação (EF) $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:3		
	CV 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$	CV 75 $\mu\text{g} / \text{mL}$	CV 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$
1587	1,76	3,56	1,74
1365	1,68	3,53	1,81
1175	1,43	3,85	1,91

Com base nos resultados obtidos (Tabela 4), percebe-se que os QDs $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ apresentaram resultados melhores para o violeta cristal comparando-se com o $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$, com intensificações de até 3,85 em uma concentração menor do que a mais bem avaliada com os QDs de cobre ($\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$).

Assim como os QDs $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$, os QDs de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ também não apresentaram resultados satisfatórios para análise com os outros corantes estudados.

Uma das hipóteses para esse comportamento é a estrutura das moléculas dos outros analitos (FUC, R6G e RB), os quais possuem grupos retiradores de elétrons que diminuem a quantidade de elétrons livres na molécula (Figura 29).

Figura 29 – Estrutura dos analitos utilizados no presente trabalho (A = Cristal ou Metil Violeta; B = Rodamina B; C = Fucsina Ácida; D = Rodamina 6G). Circulados em vermelho estão os grupos eletrofílicos.



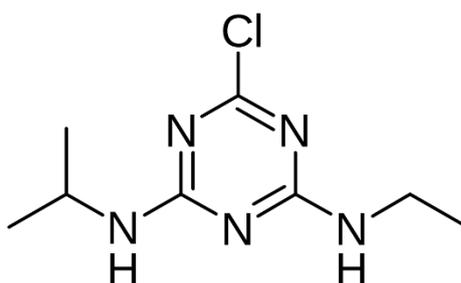
Fonte: Autoria própria.

É possível notar que apenas no cristal violeta (A) os pares de elétrons dos nitrogênios estão disponíveis, pois não há grupos eletrofílicos próximos, já nas outras estruturas (B, C e D) isso não ocorre. Isso permite que existam interações eletrostáticas entre o CV e o grupo -COO^- presente no estabilizante MPA.

5.4 ESTUDOS COM ATRAZINA e Ag₂Se/MPA

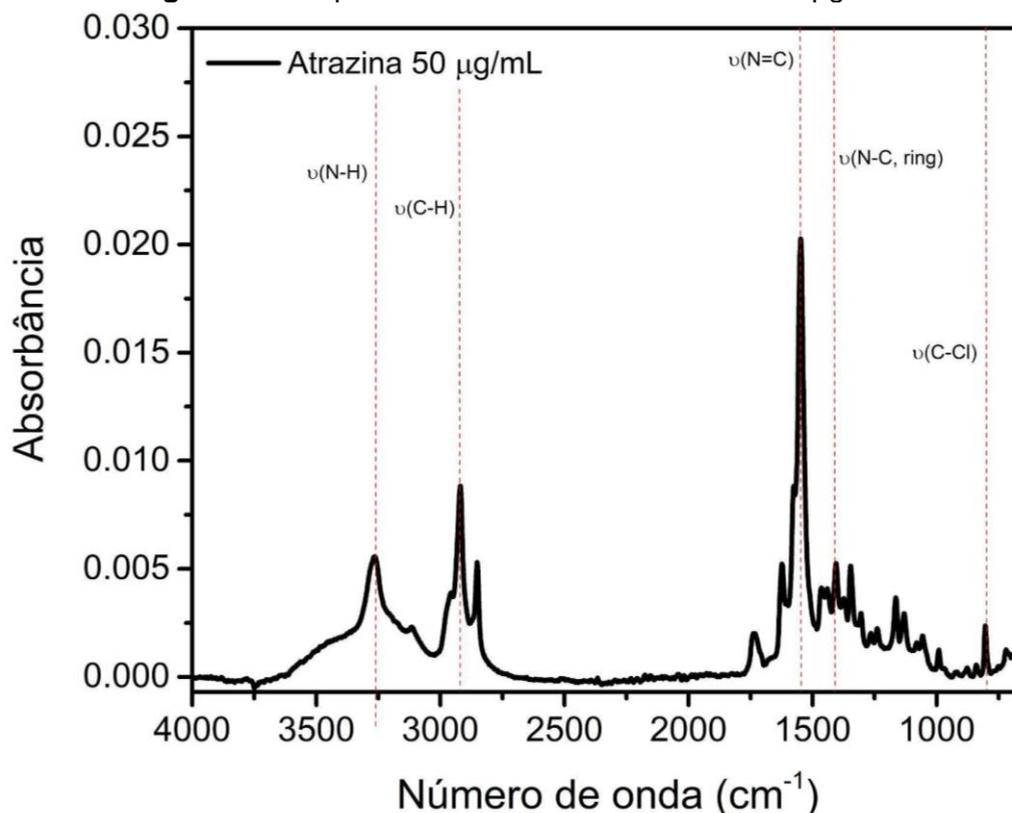
Como já discutido anteriormente, Sun *et al.* (2021) trabalharam com um herbicida chamado atrazina e obtiveram resultados promissores para o monitoramento dessa espécie química. Por se tratar de um poluente ambiental, novos métodos para estudos quantitativos envolvendo essa substância são de grande importância para os órgãos de controle ambiental e observando-se a fórmula estrutural da molécula (Figura 30), percebe-se que ela é uma possível candidata aos estudos envolvendo as nanopartículas utilizadas neste trabalho. Isso se deve ao fato de que ela não tem grupos retiradores tão fortes como as outras moléculas e ainda os pares de elétrons dos nitrogênios do anel estão em um orbital sp², ou seja, não estão em ressonância e, assim, estão disponíveis para interagir com os QDs.

Figura 30 – Fórmula estrutural da Atrazina.



Fonte: shorturl.at/pNPW2 (Acessado em 30/01/2022).

O presente tópico do trabalho foi iniciado a partir da análise do espectro de infravermelho da atrazina em uma concentração de 100 µg/mL como pode ser visto na Figura 31.

Figura 31 – Espectro de ATR/FT-IR da atrazina 50 µg/mL.

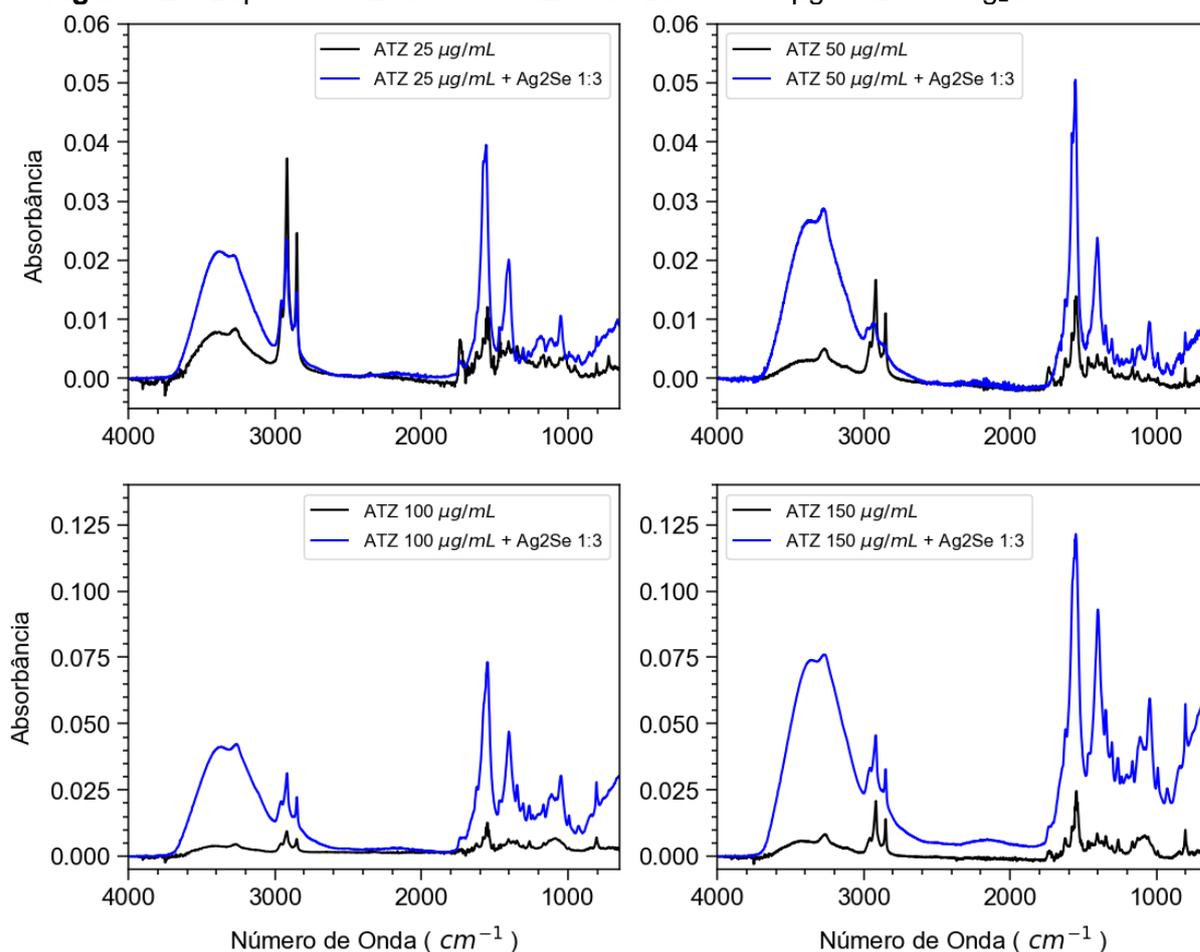
Fonte: Autoria própria.

O espectro apresenta bandas características em 3300 cm^{-1} correspondente à ligação N-H, dobramentos das ligações -CH₂ em 1465 cm^{-1} , estiramentos das ligações N=C em 1580 cm^{-1} (SUN, H. *et al.*, 2021) e estiramentos do anel entre 1400 – 1600 cm^{-1} e das ligações C-H em torno de 1000 cm^{-1} (SANCHES-VERDEJO, T. *et al.*, 2008).

Para os primeiros ensaios, utilizou-se a diluição de 1:3 dos QDs de Ag₂Se/MPA que apresentaram melhores resultados com o corante violeta cristal. A atrazina foi diluída em etanol PA, e isso se mostrou um desafio devido ao volume pequeno utilizado na análise e a tensão superficial do etanol, a qual é menor do que a da água (72,8 mN/m da água, 22,3 mN/m do etanol, a 20°C) e, por conseguinte, o etanol, se espalhava ao ser depositado no cristal de diamante do ATR.

Os resultados encontrados mostraram que o QD de Ag₂Se/MPA promove intensificações de sinal relevantes para a atrazina em faixa de concentração de 25 µg/mL até 150 µg/mL (Figura 32).

Figura 32 – Espectros SEIRA da Atrazina de 25 até 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:3.



Fonte: Autoria própria.

A seguir pode-se observar as intensificações mais expressivas nas concentrações de 100 e 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tabela 5).

Tabela 5 – Fatores de intensificação relativos ao estudo inicial com atrazina e $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$.

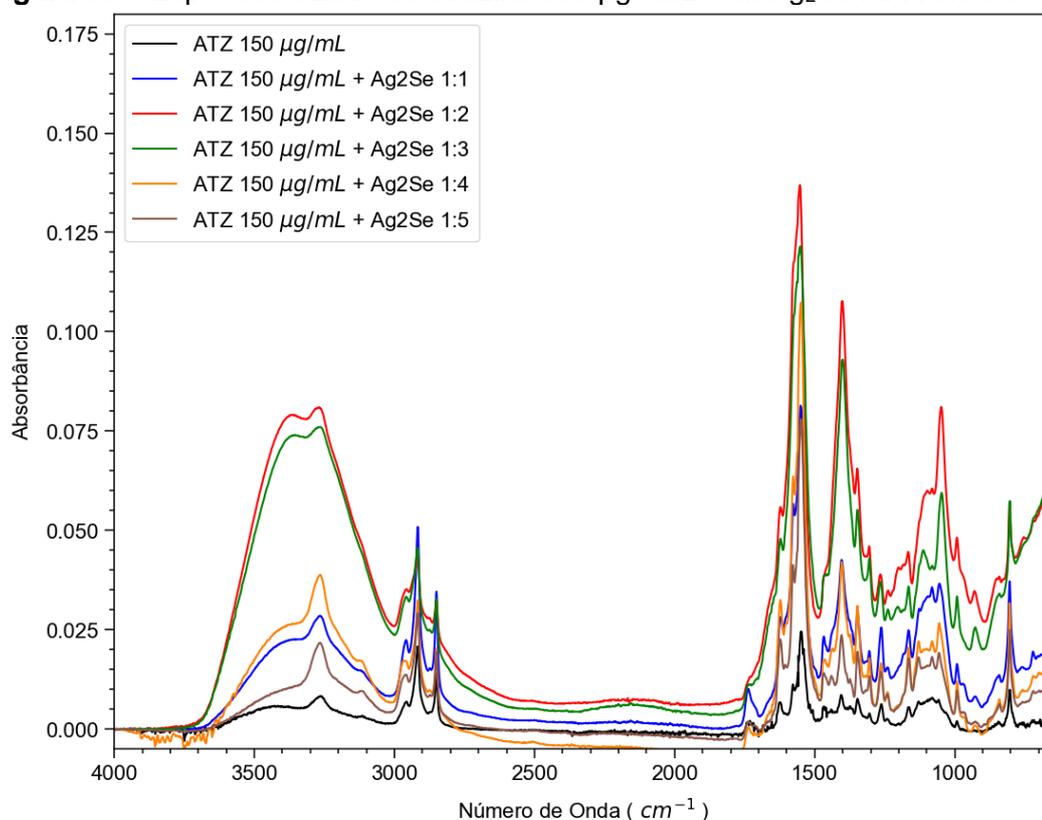
Posição da banda (cm^{-1})	Fator de Intensificação (EF) $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:3			
	ATZ 25	ATZ 50	ATZ 100	ATZ 150
3270	2,42	4,45	9,36	7,96
1551	2,94	3,16	5,86	4,96
1400	3,50	4,22	7,88	10,54
1047	3,28	3,19	5,74	8,99

Percebe-se que houve intensificação da ordem de 10 vezes em 1400 cm^{-1} , o que demonstra o potencial da técnica para estudos envolvendo moléculas pequenas

mesmo em equipamentos convencionais de infravermelho com módulo ATR universal, com apenas 1 reflexão.

Por fim, realizou-se estudos variando as concentrações de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ na melhor concentração encontrada da ATZ (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (Figura 33).

Figura 33 – Espectros SEIRA da atrazina 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:1 até 1:5.



Fonte: Autoria própria.

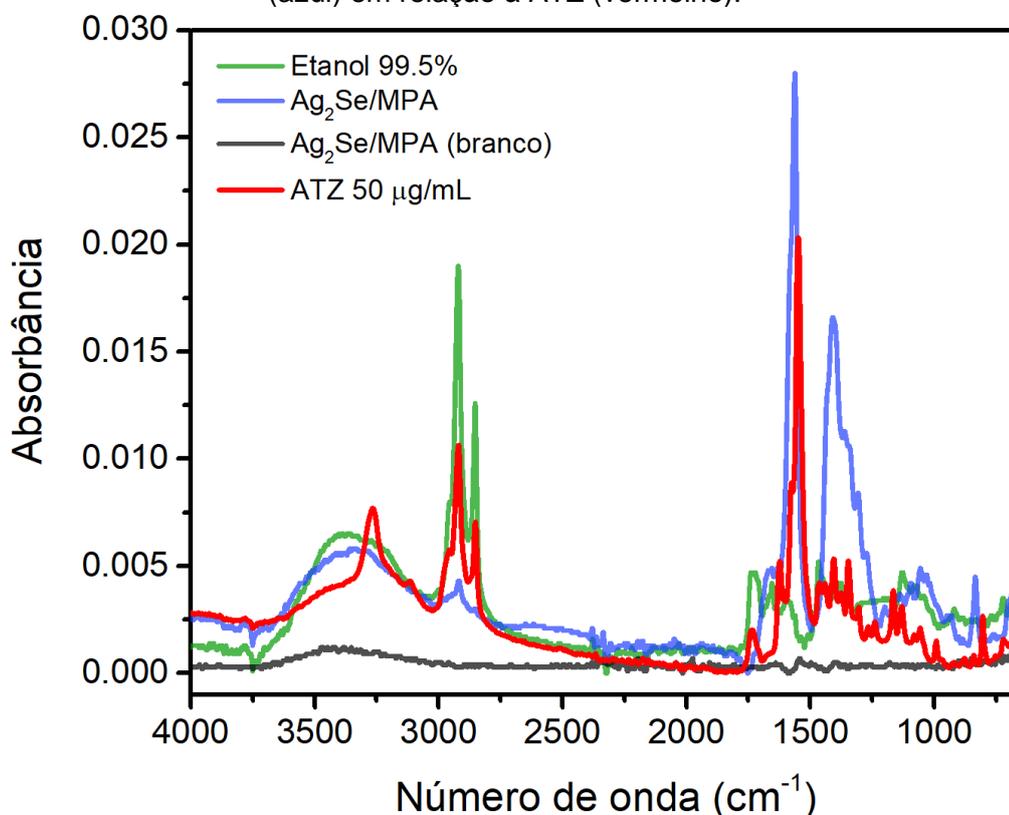
Tabela 6 – Fatores de intensificação relativos ao estudo com atrazina variando-se a diluição do ponto quântico.

Posição da banda (cm^{-1})	Fator de Intensificação (EF) ATZ 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$				
	$\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:1	$\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:2	$\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:3	$\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:4	$\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ 1:5
3270	3,46	9,91	7,96	4,71	2,63
1551	3,49	5,86	4,96	4,57	3,28
1400	5,57	14,51	10,54	5,38	2,93
1047	6,62	15,48	8,99	4,50	3,06

Percebe-se que maiores diluições da NP não favoreceram a intensificação de sinal da atrazina, na concentração estudada, como pode ser visto nos EFs contidos na Tabela 6. Além disso, uma diluição de 1:2 foi responsável pelas melhores intensificações encontradas até então, com valores chegando à ordem de 15 vezes, como pode ser visto na Tabela 6.

Para o prosseguimento dos estudos verificou-se se haveria alguma interferência do etanol nos espectros da ATZ apesar de haver a secagem do solvente antes da leitura do analito. Assim, comparou-se os dois espectros (atrazina e etanol) como pode ser visto na Figura 34, além da observação de que não há interferência das nanopartículas após a realização do background com as nanopartículas depositadas no cristal (espectro na cor preta).

Figura 34 – Comparação entre o perfil espectral do etanol (verde) e dos pontos quânticos (azul) em relação à ATZ (vermelho).



Fonte: Autoria própria.

Percebe-se que há uma interferência maior do etanol na região dos estiramentos N-H da molécula de ATZ (3200 cm^{-1}) e quase nenhuma influência na região de impressão digital que vai de 1800 cm^{-1} até 650 cm^{-1} . Assim, para o

prossequimento dos estudos, será considerada apenas essa última região do espectro.

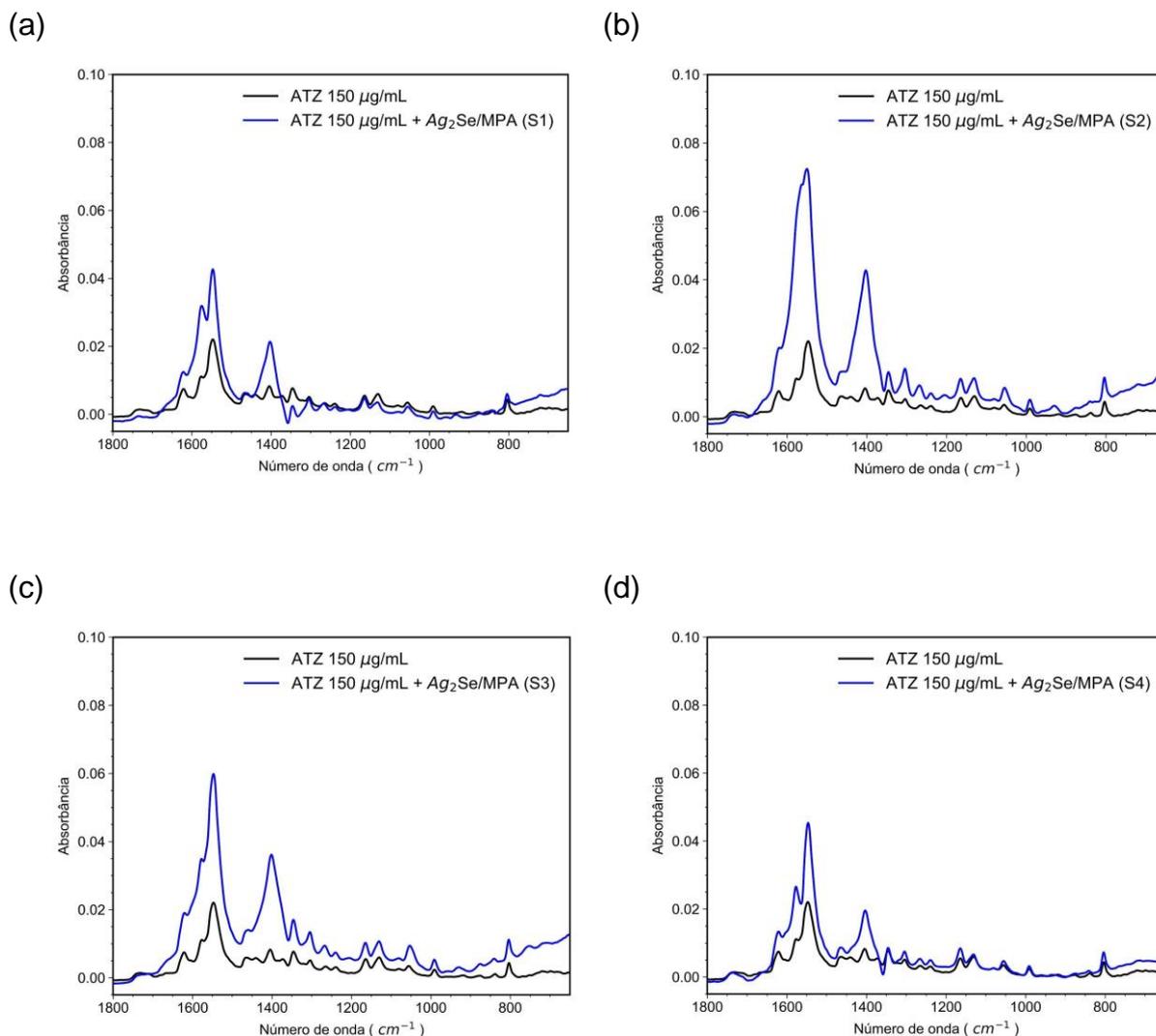
Quanto aos pontos quânticos de prata, uma nova batelada da suspensão deles foi sintetizada e foi realizado um estudo envolvendo a pré-concentração das nanopartículas (Tabela 7) e a diluição. Nesse estudo, foram realizadas pré-concentrações com tubos de policarbonato, contendo filtros próprios para pontos quânticos, em que volumes específicos de suspensão coloidal foram centrifugados e filtrados e por fim recolheu-se a parte filtrada, a qual corresponde a parte mais concentrada. Em seguida, foi escolhida uma diluição com intensidade de sinal equivalente à obtida anteriormente para a diluição de 1:2. Para tal, se fixou a concentração de ATZ em 150 µg/mL e então realizou-se os testes em triplicata.

Tabela 7 – Configuração dos ensaios para otimização da diluição dos pontos quânticos.

Ensaio	Condições (pré-concentração)	EF (1547 cm ⁻¹)	EF (1407 cm ⁻¹)
Ag ₂ Se/MPA (S1)	Diluição 1:6 (1x)	1.93	2.8
Ag ₂ Se /MPA (S2)	Diluição 1:6 (2x)	3.23	5.64
Ag ₂ Se/MPA (S3)	Diluição 1:8 (1x)	2.71	4.83
Ag ₂ Se/MPA (S4)	Diluição 1:8 (2x)	2.06	2.54

Os espectros envolvendo o estudo em questão estão contidos na Figura 35 e demonstram de forma mais clara o melhor perfil espectral SEIRA que foi obtido com a configuração S2.

Figura 35 – Espectros médios SEIRA para otimização dos fatores de diluição das nanopartículas e número de processos de pré-concentração com atrazina 150 $\mu\text{g/mL}$; (a) Diluição 1:6, pré-concentrado uma vez; (b) Diluição 1:6, pré-concentrado duas vezes; (c) Diluição 1:8, pré-concentrado uma vez; (d) Diluição 1:8, pré-concentrado duas vezes.



Fonte: Autoria própria.

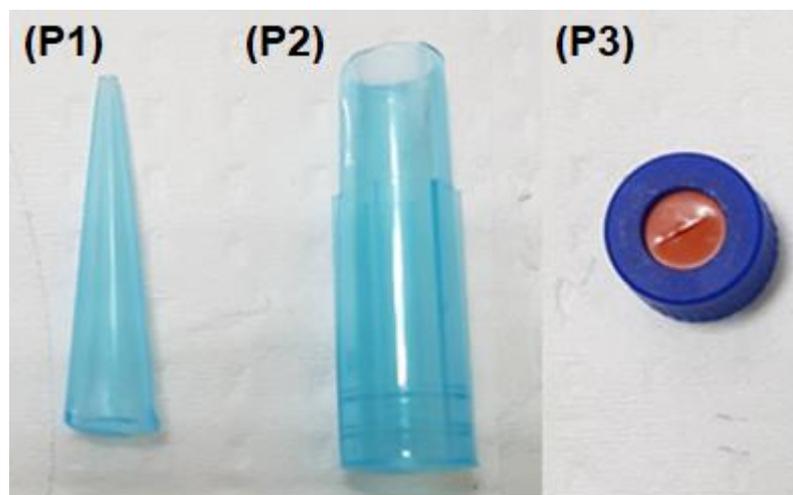
A partir desses estudos, percebeu-se que a melhor resposta encontrada foi utilizando uma suspensão de QDs que passou por dois processos de pré-concentração e foi diluída 7 vezes (Ensaio S2). Assim, utilizou-se essa estratégia para prosseguimento dos ensaios SEIRA.

Para além da otimização dos parâmetros envolvendo os pontos quânticos, buscou-se minimizar a dispersão nos resultados obtidos nos experimentos anteriores, visando melhorar a repetitividade do método. Um dos pontos abordados visava controlar o processo de vaporização do etanol PA, utilizado como solvente para a

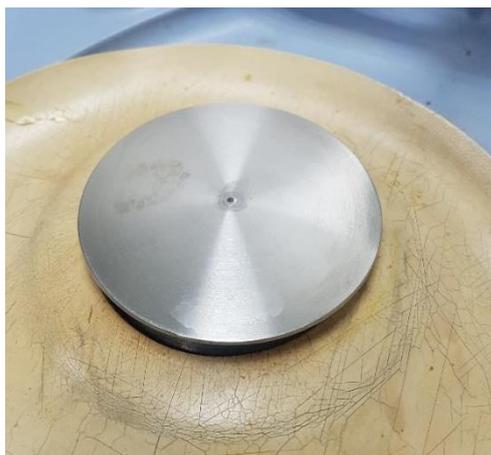
solução de atrazina, através da utilização de acessórios que limitassem a área ao redor do guia de ondas do módulo ATR (Figura 36).

Figura 36 – a) Acessórios utilizados para minimizar a interferência no processo de secagem do solvente; P1 e P2 são ponteiros de micropipeta de 1 mL e P3 tampa de *vial*; b,c) Modo de utilização dos acessórios na análise por ATR.

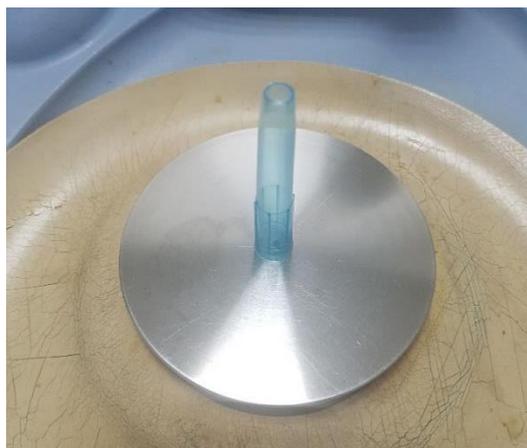
a)



b)



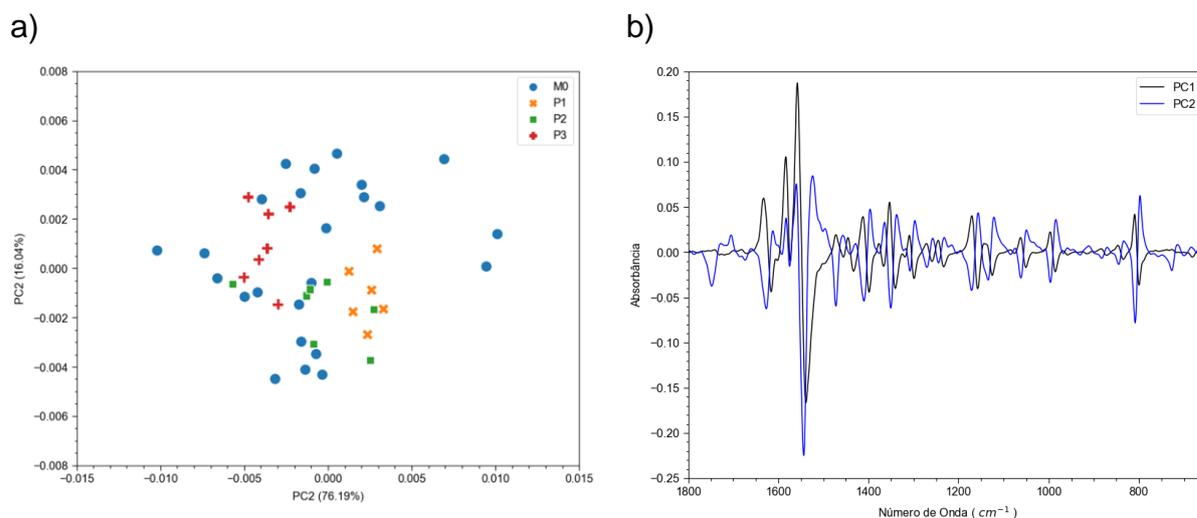
c)



Fonte: Autoria própria.

Para melhor avaliar a variância em torno das medidas sem a utilização dos acessórios e com os acessórios, foi proposta uma abordagem multivariada utilizando PCA. Os resultados são apresentados na Figura 37 para os gráficos de escores e pesos para os acessórios P1, P2 e P3, além de medidas sem os acessórios (M0).

Figura 37 – Análise de componentes principais para avaliar a dispersão das amostras com os acessórios (P1, P2 e P3) e sem os acessórios (M0); a) gráfico de escores e b) gráfico de pesos.



Fonte: Autoria própria.

Pode-se observar que as medidas utilizando algum dos acessórios possuem uma dispersão menor comparando-se com as medidas sem acessório (M0). O acessório com maior diâmetro de abertura e maior altura (P2) foi o que obteve a pior performance nos ensaios de repetitividade, levando-se em conta o desvio padrão de cada tipo de medida ($M0 = 0,0048$ e $P2 = 0,0025$). Os acessórios P1 (desvio padrão de $0,0018$) e P3 (desvio padrão de $0,0022$) apresentam resultados melhores, portanto, optou-se então por prosseguir os ensaios com o acessório P1.

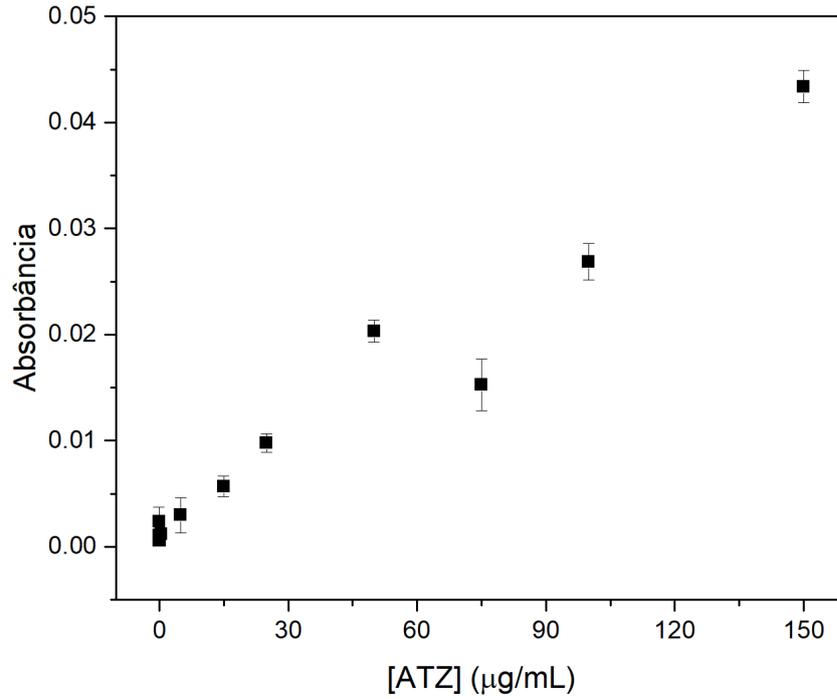
A partir dessas otimizações, buscou-se realizar os ensaios SEIRA com acessório P1, pontos quânticos pré-concentrados duas vezes e com diluição 1:6. Em seguida buscou-se repetir os ensaios na faixa de concentração utilizada anteriormente e adicionou-se um ponto a mais, o qual foi o de $15 \mu\text{g/mL}$, menor concentração observável no equipamento de FTIR sem a presença dos pontos quânticos. Como se observou que havia um perfil de aumento de intensidade com a diminuição da concentração, buscou-se intensificar amostras que não eram visíveis no FTIR. A seguir, tem-se os fatores de intensificação calculados (Tabela 8).

Tabela 8 – Novos fatores de intensificação calculados na faixa de 0.1 até 150 $\mu\text{g/mL}$ com $\text{Ag}_2\text{Se/MPA}$ diluídos 7 vezes e pré-concentrados duas vezes.

[ATZ] $\mu\text{g/mL}$	EF relativo a cada atribuição e posição de banda (cm^{-1})	
	($\nu\text{C}=\text{N}$) ₁₅₄₇	($\nu\text{C}=\text{N}$) ₁₄₀₀
0,1	86,4	23,4
0,5	22,2	12,5
5	11,2	10,4
15	6,9	19,0
25	2,8	3,5
50	2,4	7,3
75	1,7	5,7
100	3,0	4,9
150	1,5	5,2

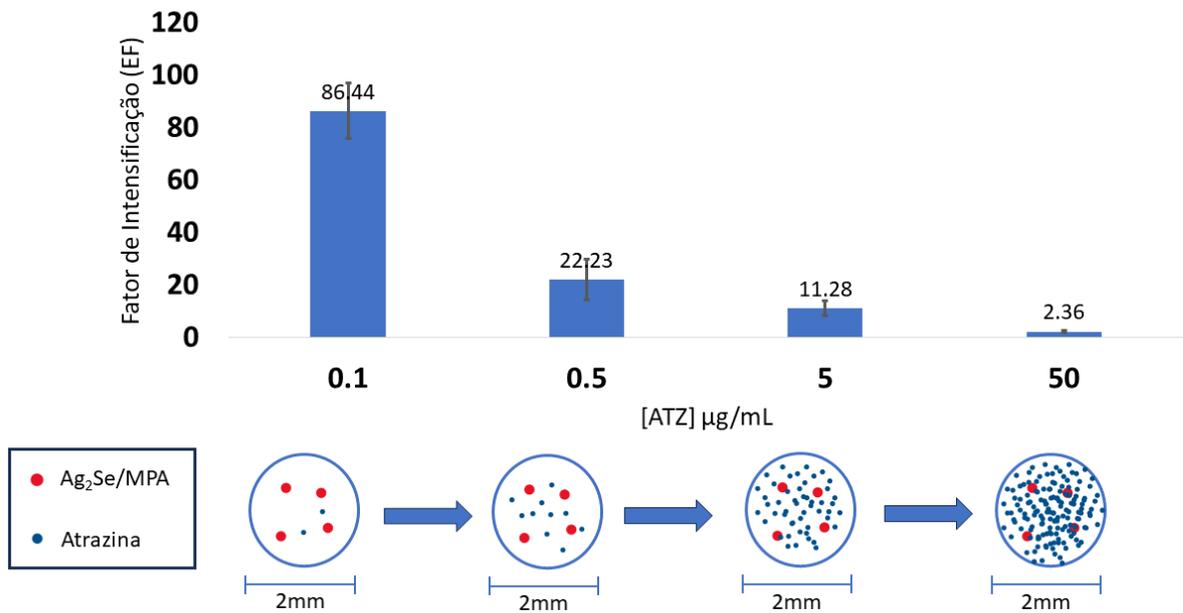
A partir dos resultados da Tabela 8, percebe-se que a amostra de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ possui o maior fator de intensificação para a banda em 1547 cm^{-1} (86 vezes o sinal sem $\text{Ag}_2\text{Se/MPA}$). Também é observado que há um perfil de intensificação de sinal crescente com a diminuição da concentração para a banda localizada em 1547 cm^{-1} , isso pode ser explicado pelo fato de haver menos analito interferindo nas interações entre os QDs, o que de fato geraria menos regiões de “*hot-spots*” entre eles. A partir de 75 $\mu\text{g/mL}$, para o número de onda de 1547 cm^{-1} , percebe-se um efeito de passivação, no qual os EF parecem ficar constantes, o que também pode ser observado na Figura 38 com a queda na absorvância a partir de 75 $\mu\text{g/mL}$. Essa questão foi representada também na Figura 39 e, a partir de então, considerou-se o limite superior da faixa de trabalho em 50 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 38 – Gráfico de absorvância vs. da concentração de ATZ.



Fonte: Autoria própria.

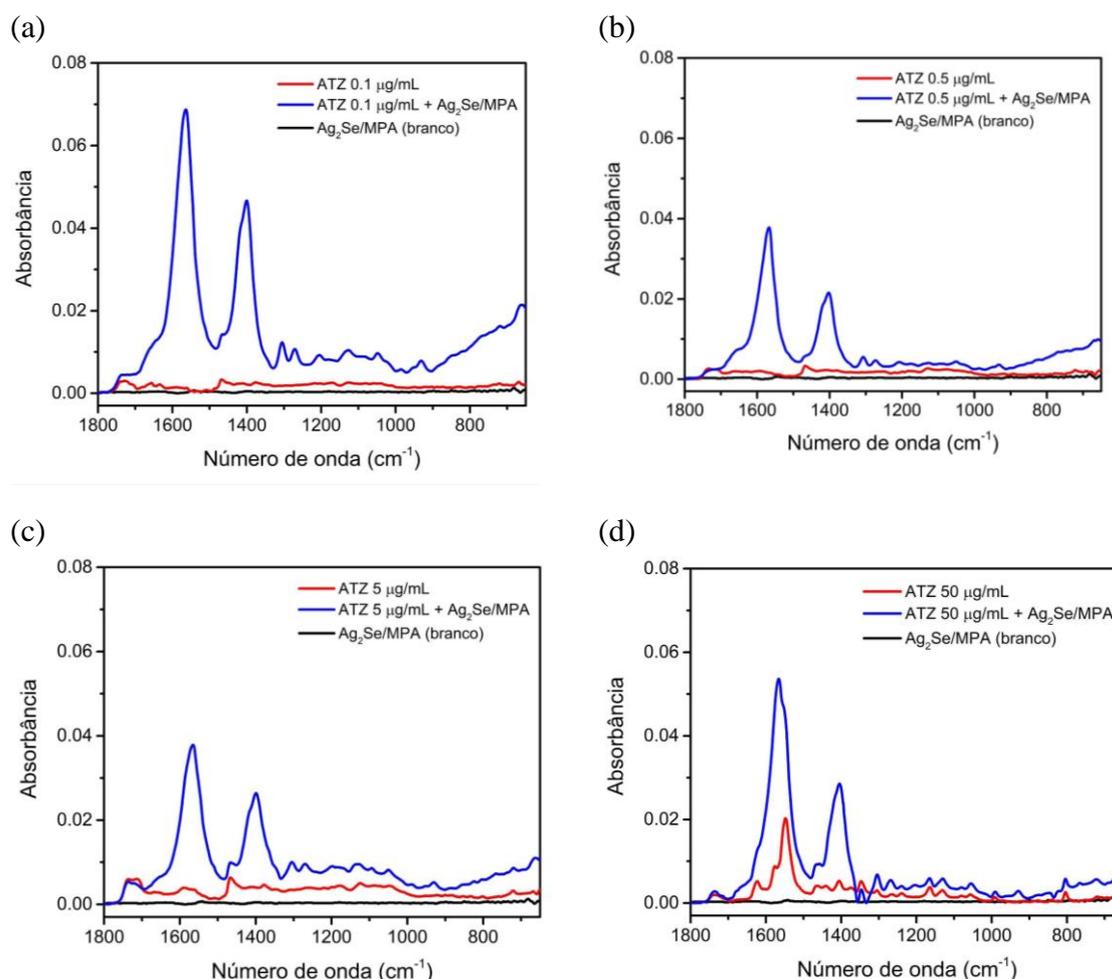
Figura 39 – Relação entre o fator de intensificação e a concentração de atrazina para um mesmo volume de nanopartículas no cristal de ATR.



Fonte: Autoria própria.

Corroborando com os dados das Figuras 38 e 39, tem-se, na Figura 40, os espectros de atrazina e espectros intensificados para as concentrações avaliadas.

Figura 40 – Espectros IR-ATR, corrigidos por linha de base, para atrazina, $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ como branco e espectro SEIRA da atrazina; (a) 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (b) 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (c) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and (d) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Fonte: Autoria própria.

Analisando-se os dados da Tabela 8 e os gráficos da Figura 40, percebe-se que esses fatores de intensificação mais elevados para as amostras menos concentradas (Fig 40a e Fig 40b) podem ser explicados pela baixíssima absorbância observada nas medidas de FT-IR (6×10^{-4} u. a. para a amostra de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em relação a absorbância da medida SEIRA (0,07 u. a.). Já para a banda em 1400 cm^{-1} os fatores de intensificação mais elevados indicam uma sobreposição das bandas dessa região nos espectros SEIRA em uma única banda maior (Fig 40). Finalmente, a média dos EFs das demais concentrações é em torno de 11 vezes, os quais são similares a outros encontrados na literatura para substratos similares (HU, Y. *et al.*, 2019; PEREIRA, C. F. *et al.*, 2020).

Na Tabela 9 apresenta-se uma síntese dos resultados obtidos com os dois analitos destacados nos estudos anteriores.

Tabela 9 – Síntese dos EFs obtidos no presente trabalho para CV e ATZ com os diferentes semicondutores.

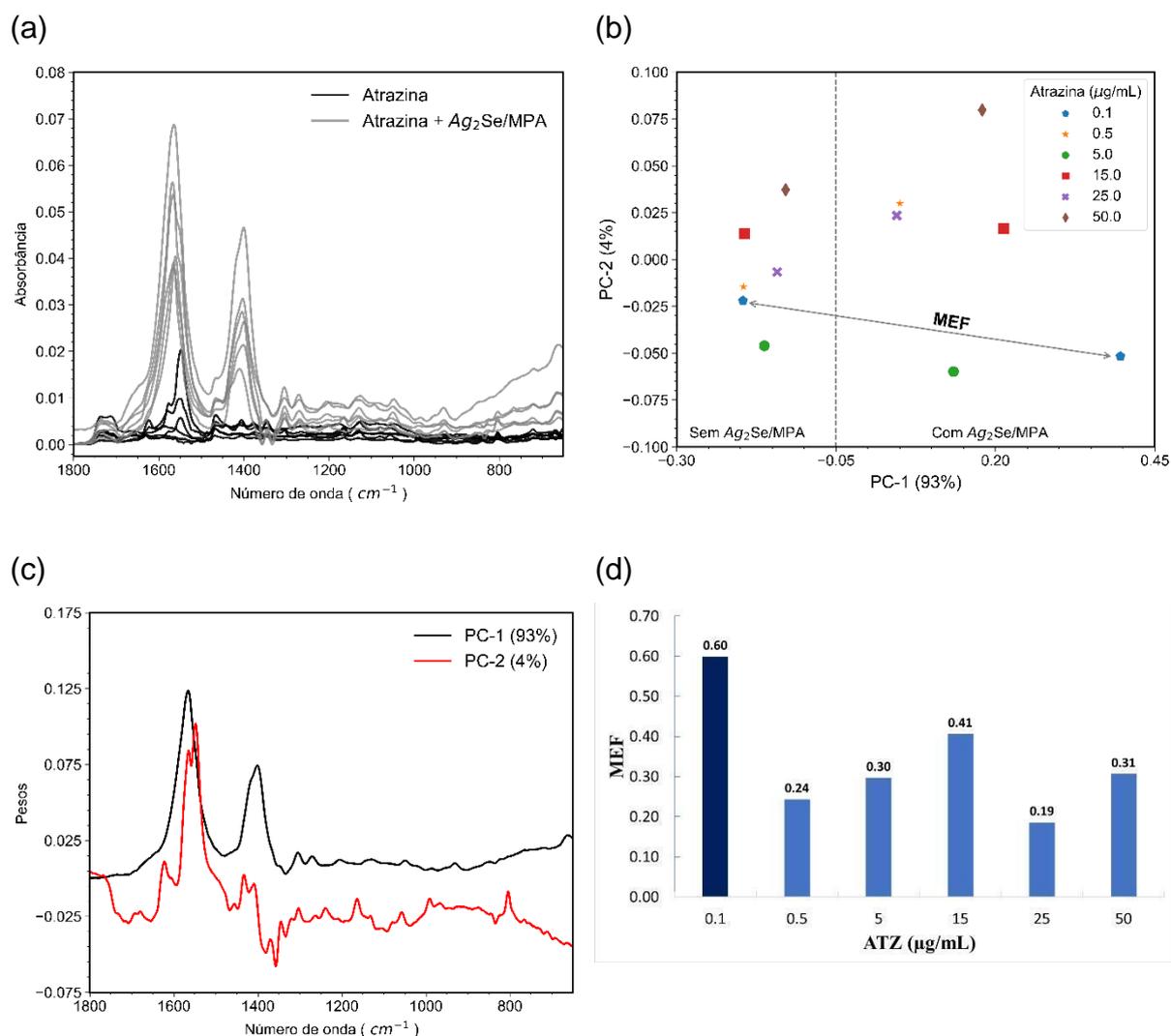
Molécula	Estrutura	$1/\lambda$ (cm ⁻¹)	Atribuição	EF	
		Cu_{2-x}Se/MSA*			
Violeta cristal		1587	v(anel)	2,30	
		1365	v(N-Ph), δ(CH ₃), v(C-N)	2,40	
		1175	δ(C-H)	2,31	
			Ag₂Se/MPA**		
		1587	v(anel)	3,56	
		1365	v(N-Ph), δ(CH ₃), v(C-N)	3,53	
1175	δ(C-H)	3,85			
		Ag₂Se/MPA**			
Atrazina		1547	v(N=C)	86,44	
		1400	δ(C-H ₂)	23,22	

v: estiramento; δ: deformação / dobramento; *: 150 µg/mL; **: 75 µg/mL; ***: 0,1 µg/mL.

5.5 ABORDAGEM MULTIVARIADA NA ANÁLISE DE ATRAZINA COM Ag₂Se/MPA

Em continuidade às investigações relativas a atrazina, foi utilizada uma abordagem multivariada para interpretar os resultados do efeito SEIRA, na qual utilizou-se a Análise de Componentes Principais (PCA) como ferramenta de análise exploratória, na faixa espectral de 1800-650 cm⁻¹ (Figura 41a). A partir dessa análise, obteve-se os fatores de intensificação multivariados (MEF) (Figura 41d) baseados no cálculo da distância euclidiana entre os escores das componentes principais (Figura 41b). Para construção dessa PCA, foi utilizada a média de três espectros para cada concentração de atrazina na faixa utilizada anteriormente (0,1 – 50 µg/mL).

Figura 41 – Análise de componentes principais (PCA) com amostras de ATZ com e sem $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ para a faixa de concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ até 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; a) espectros utilizados na PCA na região de 1800-650 cm^{-1} , b) escores, c) pesos, d) MEF calculados.



Fonte: Autoria própria.

A PCA resumiu a informação das 1151 variáveis em duas componentes, sendo que a PC-1 explicou 93% da variância dos dados e a PC-2 4%. Percebe-se pelo gráfico de pesos (Figura 41c) que a PC-1 apresenta um espectro médio das amostras intensificadas (preferencialmente em 1570 cm^{-1} e 1400 cm^{-1}) e PC-2 demonstra conter maiores informações sobre o espectro da atrazina não intensificado. Analisando-se os escores, percebe-se que as amostras de ATZ sem os pontos quânticos se localizaram ao lado esquerdo (menores valores de PC-1), enquanto as intensificadas ficaram ao lado direito (maiores valores de PC-1).

Analisando-se em conjunto os valores de MEF da Tabela 10, percebe-se que o maior valor foi para a amostra menos concentrada e para concentrações acima não há um perfil claro, o que pode indicar uma certa saturação do sistema.

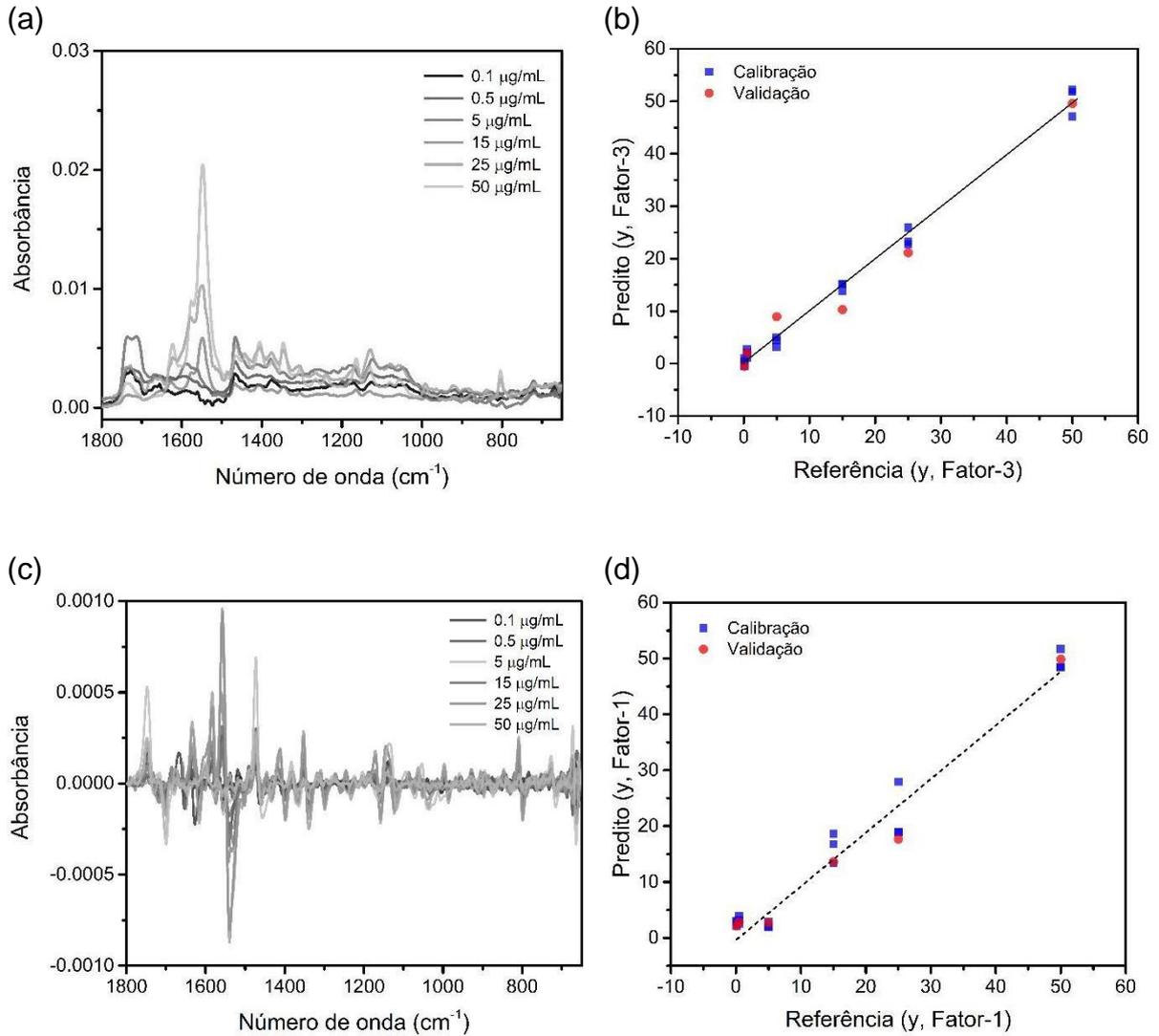
Tabela 10 – Fatores de intensificação multivariados (MEF) na faixa de 0,1 a 50 µg/mL.

ATZ (µg/mL)	MEF
0,1	0,59
0,5	0,25
5	0,30
15	0,41
25	0,19
50	0,31

Com a definição da melhor faixa de trabalho, além de concluída a análise exploratória relativo ao comportamento das amostras de ATZ com e sem a presença dos pontos quânticos de seleneto de prata, buscou-se construir um modelo multivariado (PLS) para determinação de ATZ, em primeiro lugar utilizando-se apenas os dados da análise com ATR-IR (sem Ag₂Se/MPA).

A faixa utilizada para construção dos modelos apenas com ATZ foi de 0,1- 50 µg/mL, e os espectros pré-processados com correção de linha de base e primeira derivada estão contidos nas Figuras 42a e 42c, respectivamente. Além disso, nas Figuras 42b e 42d, encontram-se os gráficos de valores preditos vs referência dos modelos, os quais demonstram a distribuição aleatória dos dados em relação à bissetriz com coeficiente de determinação (R²) de 0.99 e 0.97 para os dados de calibração e validação do modelo com correção de linha de base, e de 0,97 e 0,96 para os dados de calibração e validação do modelo com primeira derivada.

Figura 42 – a,c) Espectros médios corrigidos com linha de base e primeira derivada com filtro SG 11 pontos, respectivamente; b,d) gráfico com dados preditos *versus* referência para o modelo de regressão por PLS para as soluções de ATZ.



Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 11 são apresentados os resultados gerais contendo as principais métricas analisadas com regressão PLS.

Tabela 11 – Principais métricas de avaliação dos modelos de regressão por PLS para ATZ na faixa de 0,1 a 50 µg/mL utilizando pré-processamentos de correção de linha de base e primeira derivada.

Pré-processamento Parâmetros	Correção de linha de base		1ª Derivada (11 pontos)	
	Calibração	Predição	Calibração	Predição
R ²	0,99	0,97	0,97	0,96
Variáveis latentes	3	-	1	-
RMSE*	2,2	2,1	3,1	3,4
Bias	-0,16	-0,68	0,03	-1,12
LOD*	-	2,7 - 7,2	-	1,9 - 4,6
LOQ*	-	8,1 - 22,0	-	5,6 - 14

* unidade: µg/mL

Como pode-se perceber a partir da análise dos dados contidos na Tabela 11, os modelos possuem resultados parecidos quando se avaliam as métricas escolhidas, porém, o modelo com primeira derivada utilizou apenas uma variável latente contra três do modelo com correção de linha de base, além de apresentar menores faixas para o limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ), o que foi levado em conta para sua escolha como melhor modelo para determinação de ATZ por ATR-IR. Quanto aos valores de RMSEP, foi feito um teste F nos valores obtidos dos dois modelos para verificar se havia diferença estatística significativa entre os resultados. O teste F (descrito na seção 4.6) resultou nos seguintes valores: $F_{\text{calc}} = 2,6$ e $F_{(6, 6, 0.95)} = 4,3$, valor calculado e tabelado, respectivamente, os quais demonstram que não há diferença estatística (95 % de confiança) entre os valores de RMSEP. Dessa forma, usando o princípio da parcimônia, escolheu-se o modelo com primeira derivada.

O modelo com primeira derivada também foi avaliado quanto a presença de erros sistemáticos utilizando o teste de tendência (*bias*) e de acordo com o teste t (95% de nível de confiança): $t_{\text{cal}} = 0,77$ and $t_{\text{crit}} = 2,02$, não há evidência de erros sistemáticos.

A faixa de LOD (1,9 – 4,7 µg/mL) e de LOQ (5,6 – 14,0 µg/mL) obtidos com a análise multivariada foram similares a alguns trabalhos da literatura como o que utilizou espectroscopia NIR para determinação de ATZ em faixa de concentração de 1,2 até 19,3 mg/L (QUINTELAS, C. *et al.*, 2020), e ao trabalho que utilizou pontos quânticos de ZnS/CdSe para análise SERS que apresentou LOD de 1,1 mg/L (CARRILLO-CARRIÓN, C. *et al.*, 2012). Porém, quando comparado a trabalhos que

utilizaram técnicas de referência ou mesmo alguns trabalhos com SERS utilizando substratos diferentes, percebe-se que a faixa de detecção do presente método ainda está cerca de mil vezes acima do indicado. Por exemplo, trabalhos utilizando GC-MS e HPLC-MS/MS obtiveram LOD de 0,2 µg/L e 0,1 µg/L (PANUWET, P. *et al.*, 2008; DELLA-FLORA, A. *et al.*, 2018). Para análises SERS, a utilização de carbon dots proporcionou um LOD para determinação de ATZ de 1,1 µg/L (TANG, J.; CHEN, W.; JU, H., 2019) e com a utilização de um MIP foi obtido um LOD de 1,2 µg/L (ZHAO, B. *et al.*, 2019). Quando comparado às legislações brasileira e europeia que determinam que o limite máximo permitido de ATZ é de 0,2 µg/L, o método também apresentou um LOD acima do desejado.

Para melhorar a sensibilidade do método, foram utilizadas as amostras SEIRA para construção de um modelo de calibração multivariado com pré-processamento de correção de linha de base por *offset*. Devido à dispersão dos resultados dentro da mesma concentração, foram utilizadas apenas duas amostras na etapa de calibração do modelo, na qual se realizou uma validação cruzada *leave-one-out* e por fim foi usada uma amostra externa ao conjunto de calibração para predição. Essa dispersão nos dados pode ser oriunda de vários fatores: o fato do módulo ATR ter apenas uma reflexão interna implica diretamente no grau de intensificação, pois a área de irradiação é diretamente proporcional a amplitude do efeito SEIRA. Além disso, os pequenos volumes utilizados da suspensão coloidal de nanopartículas (1 µL) e do analito (0,5 µL) também contribuem para uma maior variabilidade nos resultados. A Tabela 12 resume os resultados obtidos.

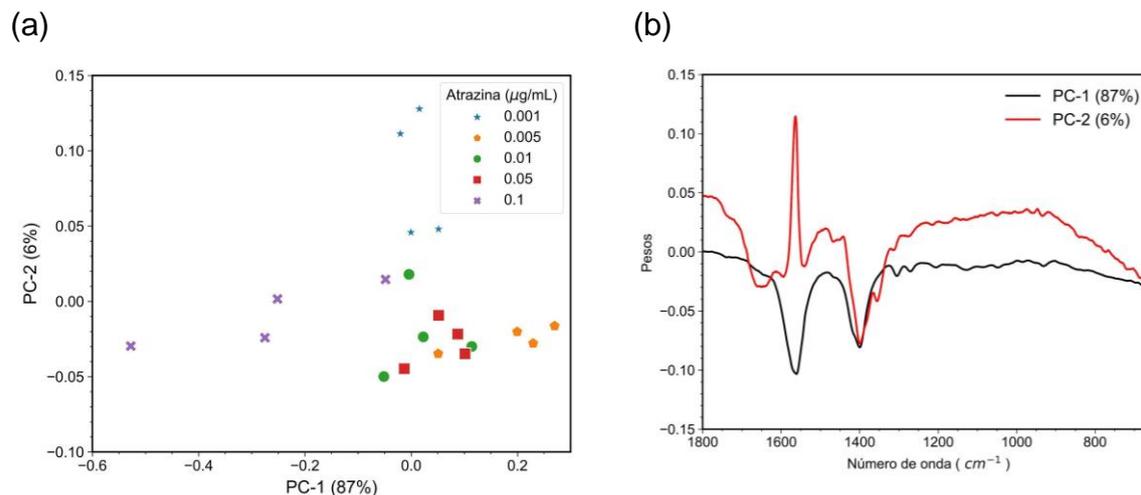
Tabela 12 - Principais métricas de avaliação do modelo de regressão por PLS para ATZ na faixa de 0,001 a 0,1 µg/mL utilizando pré-processamento de primeira derivada.

Métrica	Valores obtidos
R ²	0,91
Variáveis latentes	3
RMSECV*	0,012
RMSEP*	-
<i>Bias</i>	0,0001
LOD*	0,0095 – 0,017
LOQ*	0,029 – 0,052

* unidade: µg/mL

Os resultados demonstraram um coeficiente de determinação para a calibração de 0,91, porém não foi possível validar o modelo e obter os dados de previsão devido a alta dispersão nos dados nos conjuntos de calibração e predição. Quanto ao LOD, este ficou mais próximo dos limites dos métodos de referência e indica que o método pode ser otimizado para ser utilizado como alternativa aos métodos convencionais. A falta de reprodutibilidade nos resultados foi avaliada com uma análise exploratória por PCA na qual se observa a dispersão das amostras nos escores (Figura 43a) e os pesos (Figura 43b) mostram a média dos espectros intensificados para PC1 e PC2 demonstrando algumas bandas características da atrazina.

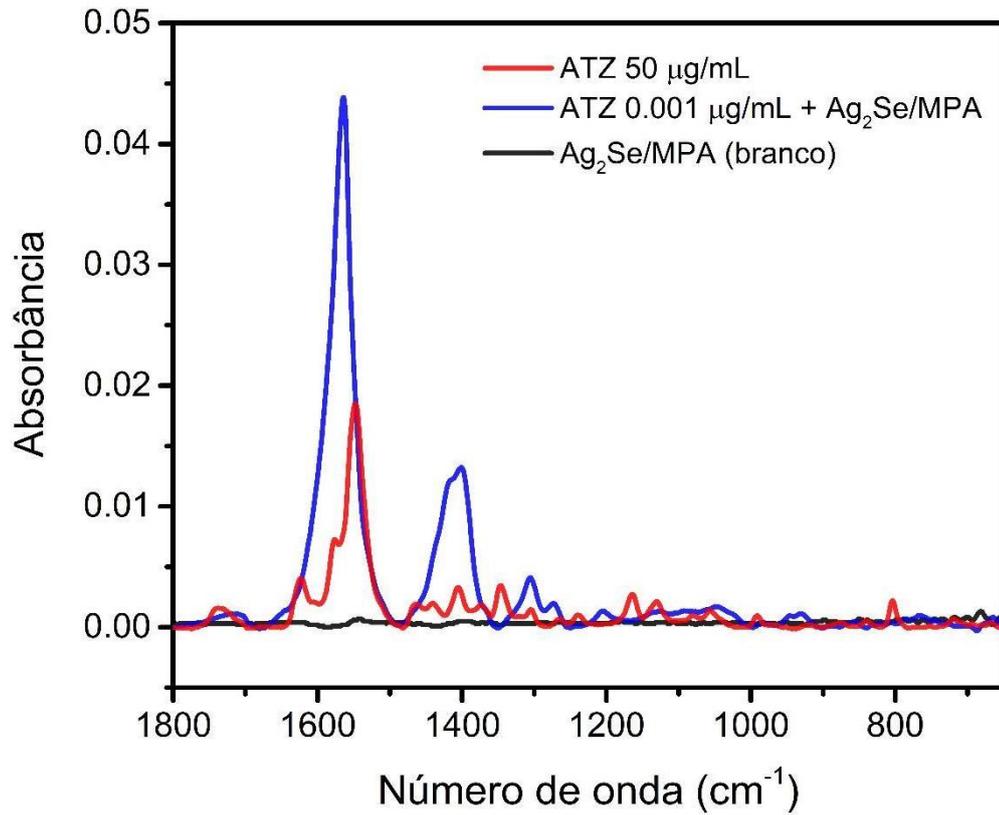
Figura 43 – Análise exploratória com PCA para amostras SEIRA da ATZ em concentrações de 0,001 $\mu\text{g/mL}$ até 0,1 $\mu\text{g/mL}$; a) escores; b) pesos.



Fonte: Autoria própria.

Os experimentos envolvendo SEIRA possibilitaram a identificação de atrazina em uma concentração de até 0,001 $\mu\text{g/mL}$, como pode ser visto na Figura 44. Esse resultado demonstra a capacidade do método de chegar a limites de detecção baixos, compatíveis com o que é demandado pelas agências reguladoras (limites máximos de 0,2 $\mu\text{g/L}$) (BRASIL, 2005; UNIÃO EUROPEIA, 2008). Além disso, também pode ser observado que há uma proximidade com os LOD de técnicas de referência (HPLC-MS/MS e GC-MS) (PANUWET, P. *et al.*, 2008; DELLA-FLORA, A. *et al.*, 2018).

Figura 44 – Espectro FT-IR/ATR da Atrazina, nanopartículas $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ registradas como branco e espectro SEIRA da Atrazina 0,001 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Fonte: Autoria própria.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho apresentou um novo procedimento para ensaios envolvendo espectroscopia SEIRA, que pode ser utilizado em qualquer equipamento de infravermelho médio com módulo de ATR com reflexão única.

Verificou-se que os QDs de cobre ($\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$) e prata ($\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$) utilizados são materiais promissores como substratos SEIRA visto que apresentaram fatores de intensificação compatíveis com outros ensaios descritos na literatura e ainda são sintetizados em meio aquoso em síntese “*one-pot*”.

Os ensaios para definição do melhor sistema SEIRA demonstraram que os fatores de intensificação observados para o violeta cristal 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ com $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$ ficaram em um patamar observado de até 2,4 vezes em comparação com o sinal analítico sem os QDs de $\text{Cu}_{2-x}\text{Se}/\text{MSA}$, demonstrando que ainda são necessários mais estudos com essa nanopartícula. Já os EFs observados para $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$, com o mesmo analito na concentração de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostraram intensificação de até 3,8.

Em relação aos estudos envolvendo a atrazina, foi desenvolvido um método que utiliza uma quantidade pequena de analito, solvente e pontos quânticos, e que permite análises rápidas de amostras. Além disso, os QDs de $\text{Ag}_2\text{Se}/\text{MPA}$ intensificaram 86 vezes o sinal da atrazina 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em 1547 cm^{-1} .

Apesar dos resultados promissores e sensíveis obtidos com a espectroscopia SEIRA, existem problemas de reprodutibilidade a serem superados como o tamanho reduzido do cristal ATR (2 mm de diâmetro) e a única reflexão interna no guia de onda do acessório UATR. Essas características dificultam a determinação de ATZ devido ao pequeno volume utilizado e conseqüentemente a amostragem ruim das suspensões de QDs e soluções de ATZ.

Foram realizados estudos multivariados com PCA que se mostraram eficientes na determinação de fatores de intensificação multivariados (MEF) levando-se em conta o espectro da atrazina de 1800 - 650 cm^{-1} , sendo o maior MEF de 0,60 para amostra de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, valor duas vezes maior comparado a amostra de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esse estudo pode melhorar a compreensão e o estabelecimento de métodos quantitativos multivariados SEIRA.

Por fim, verificou-se que o modelo de regressão com PLS envolvendo os espectros FT-IR da ATZ não se mostrou tão sensível quanto às outras determinações descritas na literatura. Modelos quantitativos envolvendo SEIRA precisam ser mais

investigados a fim de minimizar problemas de reprodutibilidade encontrados na pesquisa, como o baixo volume suportado pelo cristal ATR e a utilização de etanol como solvente para a atrazina. Assim, através de uma análise qualitativa com SEIRA foi possível identificar ATZ em uma concentração de até 0,001 $\mu\text{g/mL}$, compatível com a legislação brasileira e europeia, a qual não é possível de ser analisada apenas com a espectroscopia de infravermelho convencional.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar o método SEIRA desenvolvido para análise de atrazina com acessório ATR com múltiplas reflexões internas;
- Realizar planejamentos experimentais para otimização de parâmetros de análise da atrazina como relação substrato/analito, natureza do analito, natureza do agente estabilizante, polarização e ângulo de incidência da radiação IV;
- Investigar possíveis substratos (FTO, ITO, alumínio) para deposição dos pontos quânticos visando uma melhor reprodutibilidade;
- Aplicação do método SEIRA para detecção de ATZ em amostras reais;

REFERÊNCIAS

- ADADE, S. Y. S. *et al.* Fraud detection in crude palm oil using SERS combined with chemometrics. **Food Chemistry**. v. 388. 2022.
- ADATO, R.; ALTUG, H. In-situ ultra-sensitive infrared absorption spectroscopy of biomolecule interactions in real time with plasmonic nanoantennas. **Nature Communications**, v. 4, p. 1–10, 2013.
- ALLEGRI, F.; OLIVIERI, A. C. IUPAC-consistent approach to the limit of detection in partial least-squares calibration, **Analytical Chemistry**. V. 86 p. 7858–7866. 2014.
- AROCA, R. **Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy**. 1. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2006.
- BAO, W. J. *et al.* Au/ZnSe-Based Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy as a Universal Platform for Bioanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 6, p. 3842–3848, 2018.
- BOBRINETSKIY, I.; KNEZEVIC, N. Graphene-based biosensors for on-site detection of contaminants in food. **Analytical Methods**. V.10. p. 5061. 2018
- BRASIL, Ministro do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução N° 357**, 2005. <https://shorturl.at/AGU24> (acessado em 17 novembro 2023).
- CAMPU, A. *et al.* Ultrasensitive SEIRA detection using goldbipyramids: Toward efficient multimodal immunosensor. **Journal of Molecular Structure**. V. 1246. 2021.
- CARRILLO-CARRIÓN, C. *et al.* Determination of pesticides by capillary chromatography and SERS detection using a novel Silver-Quantum dots “sponge” nanocomposite. **Journal of Chromatography A**. v. 1225. P. 55–61. 2012
- DA SILVA, J. J. *et al.* A facile route toward hydrophilic plasmonic copper selenide nanocrystals: new perspectives for SEIRA applications. **NJC**. v. 45. p. 15753. 2021.
- DE SOUZA SOBRINHA, I. G. *et al.* Enhancing the optical properties of hydrophilic Ag₂Se NIR-II quantum dots by using chemometric approaches towards (bio)sensing applications. **NJC**. v. 48. 10653-10663. 2024.
- DELLA-FLORA, A. *et al.* Fast, cheap and easy routine quantification method for atrazine and its transformation products in water matrixes using a DLLME-GC/MS method. **Analytical Methods**. V.10. p.5447. 2018.
- DING, Y. *et al.* Rapid determination of thiram and atrazine pesticide residues in fruit and aqueous system based on surface-enhanced Raman scattering. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. V. 285. 2023.
- EID, S. M. *et al.* Surface enhanced infrared absorption spectroscopy (SEIRA) as a

green analytical chemistry approach: Coating of recycled aluminum TLC sheets with citrate capped silver nanoparticles for chemometric quantitative analysis of ternary mixtures as a green alternative to the traditional methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 1117, p. 60–73, 2020.

ESKANDARI, V. *et al.* Detection of molecular vibrations of atrazine by accumulation of silver nanoparticles on flexible glass fiber as a surface-enhanced Raman plasmonic nanosensor. **Optical Materials**. v. 128. P.112310. 2022.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - conceitos, métodos e aplicações**. Editora da Unicamp. 1^o Edição. 2015.

FILGUEIRAS, P. R.; ALVES, J. C. L.; POPPI, R. J. Quantification of animal fat biodiesel in soybean biodiesel and B20 diesel blends using near infrared spectroscopy and synergy interval support vector regression, **Talanta**. V. 119. p. 582–589. 2014.

FUENTE-BALLESTEROS, A. *et al.* Determination of acaricides in honeys from different botanical origins by gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**. V.408. p.135245. 2023.

HAAS, J.; MIZAIKOFF, B. Advances in Mid-Infrared Spectroscopy for Chemical Analysis. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 9, p. 45–68, 2016.

HAJAB, H. *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy of the filtrate portions of the blood serum samples of breast cancer patients obtained by using 30 kDa filtration device. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 311. 2024.

HARTSTEIN, A.; KIRTLEY, J. R.; TSANG, J. C. Enhancement of the infrared absorption from molecular monolayers with thin metal overlayers. **Physical Review Letters**, v. 45, n. 3, p. 201–204, 1980.

HORVATH, H. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics. **Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer**, v. 110, n. 11, p. 787–799, 2009.

HU, Y. *et al.* Surface-enhanced infrared attenuated total reflection spectroscopy via carbon nanodots for small molecules in aqueous solution. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 9, p. 1863–1871, 2019.

IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2024. <https://shorturl.at/yLjVL> (Acessado em 29 de outubro de 2024).

KRAJCZEWSKI, J.; KOŁĄTAJ, K.; KUDELSKI, A. Plasmonic nanoparticles in chemical analysis. **RSC Advances**, v. 7, n. 28, p. 17559–17576, 2017.

KIM, D. K. *et al.* Nanogap-engineerable Raman-active nanodumbbells for single-molecule detection. **Nature Materials**. v. 9. p. 60-67. 2010.

LAL, S. *et al.* Tailoring plasmonic substrates for surface enhanced spectroscopies.

Chemical Society Reviews, v. 37, n. 5, p. 898–911, 2008.

LE, F. *et al.* Metallic nanoparticle arrays: A common substrate for both surface-enhanced Raman scattering and surface-enhanced infrared absorption. **ACS Nano**, v. 2, n. 4, p. 707–718, 2008.

LI, J. B. *et al.* Attenuated Total Reflection Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy: a Powerful Technique for Bioanalysis. **J Anal Test**. 1. 2017.

LI, D. *et al.* Multifunctional chemical sensing platform based on dual-resonant infrared plasmonic perfect absorber for on-chip detection of poly(ethyl cyanoacrylate). **Advanced Science**. v. 2101879. p. 12. 2021.

LIU, Y. *et al.* Water as a Universal Infrared Probe for Bioanalysis in Aqueous Solution by Attenuated Total Reflection-Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 21, p. 12979–12985, 2018.

LIU, M. *et al.* Quantitation of Oxcarbazepine Clinically in Plasma Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Coupled with Chemometrics. **Applied Spectroscopy**. v. 73. p. 801-809. 2019.

MASSART, D. L. *et al.* **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A**. Elsevier Science. ISBN: 9780444897244. 1997.

MEIER, R. Handbook of Vibrational Spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, n. 2, p. 413–414, 2003.

MISHRA P. *et al.* A review of the determination methods of nitrate and the routes for its removal from environmental samples. **International journal of environmental analytical chemistry**. 2023.

MURRAY, W. A.; BARNES, W. L. Plasmonic materials. **Advanced Materials**, v. 19, n. 22, p. 3771–3782, 2007.

NOVOTNY, L.; VAN HULST, N. Antennas for light. **Nature Photonics**, v. 5, n. 2, p. 83–90, 2011.

OLIVIERI, A. C.; GOICOECHEA, H. C.; IÑÓN, F. A. MVC1: An integrated MatLab toolbox for first-order multivariate calibration, **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. V. 73. P. 189–197. 2004.

OSAWA, M. Dynamic Processes in Electrochemical Reactions Studied by Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy (SEIRAS). **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 1997.

OTTO, M. **Chemometrics, Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**. Wiley-VCH. 3^a Edição. P.235-238. ISBN. 978-3-527-69936-0. 2017.

PANUWET, P. *et al.* Quantification of atrazine and its metabolites in urine by on-line solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass

spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. V. 391. p. 1931-1939. 2008.

PARK, E. *et al.* Simple and rapid method for 336 multiresidual pesticide analysis in saliva, determination of their chemical stabilities and biomonitoring of farmers. **Chemosphere**. V. 309. P. 136725. 2022.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. Cengage CTP. 4ª Edição. ISBN. 970-0-495-11478-9. 2001.

PEREIRA, C. F. *et al.* Surface-enhanced infrared absorption spectroscopy using silver selenide quantum dots. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 8, n. 30, p. 10448–10455, 2020.

PIENPINIJTHAM, P.; KITAHAMA, Y.; OZAKI, Y. Electric field analysis, polarization, excitation wavelength dependence, and novel applications of tip-enhanced Raman Scattering. **Journal of Raman Spectroscopy**. V. 52. P. 1997-2017. 2021.

PONLAMUANGDEE, K. *et al.* Graphene oxide/gold nanorod plasmonic paper-a simple and cost-effective SERS substrate for anticancer drug analysis. **New Journal of Chemistry**, v. 44, n. 33, p. 14087–14094, 2020.

QUINTELAS, C. *et al.* Environmentally-friendly technology for rapid identification and quantification of emerging pollutants from wastewater using infrared spectroscopy, **Environmental Toxicology Pharmacology**. V. 80. 2020.

BRO, R.; SMILDE, A. K. Principal component analysis. **Analytical Methods**. v. 6. p. 2812-2831. 2014.

SAHA, A. *et al.* Resin immobilized gold nanocomposites assisted surface enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopy for improved surface assimilation of methylene blue from aqueous solution. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 262. p. 120-144. 2021

SAHU, A. *et al.* Quantum confinement in silver selenide semiconductor nanocrystals. **Chemical Communications**. v. 48. p.5458-5460. 2012.

SANCHES-VERDEJO, T. *et al.* Environmentally friendly formulations of alachlor and atrazine: preparation, characterization, and reduced leaching. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 56, p. 10192-10199, 2008.

SANTOS, C. *et al.* Síntese e caracterização de pontos quânticos ambientalmente amigáveis, um meio simples de exemplificar e explorar aspectos da nanociência e nanotecnologia em cursos de graduação. **Química Nova**. v. 43, p. 813-822. 2020.

SKOOG, D.; HOLLER, F.; NIEMAN, T. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Bookman, 2002.

STILES, P. L. *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 601–626, 2008.

SUN, H. *et al.* In situ monitoring of the selective adsorption mechanism of small environmental pollutant molecules on aptasensor interface by attenuated total reflection surface enhanced infrared absorption spectroscopy (ATR–SEIRAS). **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, n. August 2020, p. 123953, 2021.

TANG, J.; CHEN, W.; JU, H. Sensitive surface-enhanced Raman scattering detection of atrazine based on aggregation of silver nanoparticles modified carbon dots. **Talanta**. V. 201. P. 46–51. 2019.

UNIÃO EUROPEIA, JORNAL OFICIAL, DIRECTIVE 2008/105/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL, **Official Journal of the European Union**. 2008.

WANG, H. *et al.* Advances of surface-enhanced Raman and IR spectroscopies: from nano/microstructures to macro-optical design. **Light: Science & Applications**. v. 10. p. 1-19. 2021.

WANG, L. X.; JIANG, X. E. Bioanalytical Applications of Surface-enhanced Infrared Absorption Spectroscopy. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. v. 40. p. 975–982. 2012.

XIE, M. *et al.* Recent advances in aptamer-based optical and electrochemical biosensors for detection of pesticides and veterinary drugs. **Food Control**. v. 131. p. 108399. 2022

YANG, X. *et al.* Nanomaterial-Based Plasmon-Enhanced Infrared Spectroscopy. **Advanced Materials**, v. 30, n. 20, p. 1–23, 2018.

ZHAO, B. *et al.* Rapid determination of atrazine in apple juice using molecularly imprinted polymers coupled with gold nanoparticles-colorimetric/SERS dual chemosensor. **Food Chemistry**. V. 276. p. 366–375. 2019.

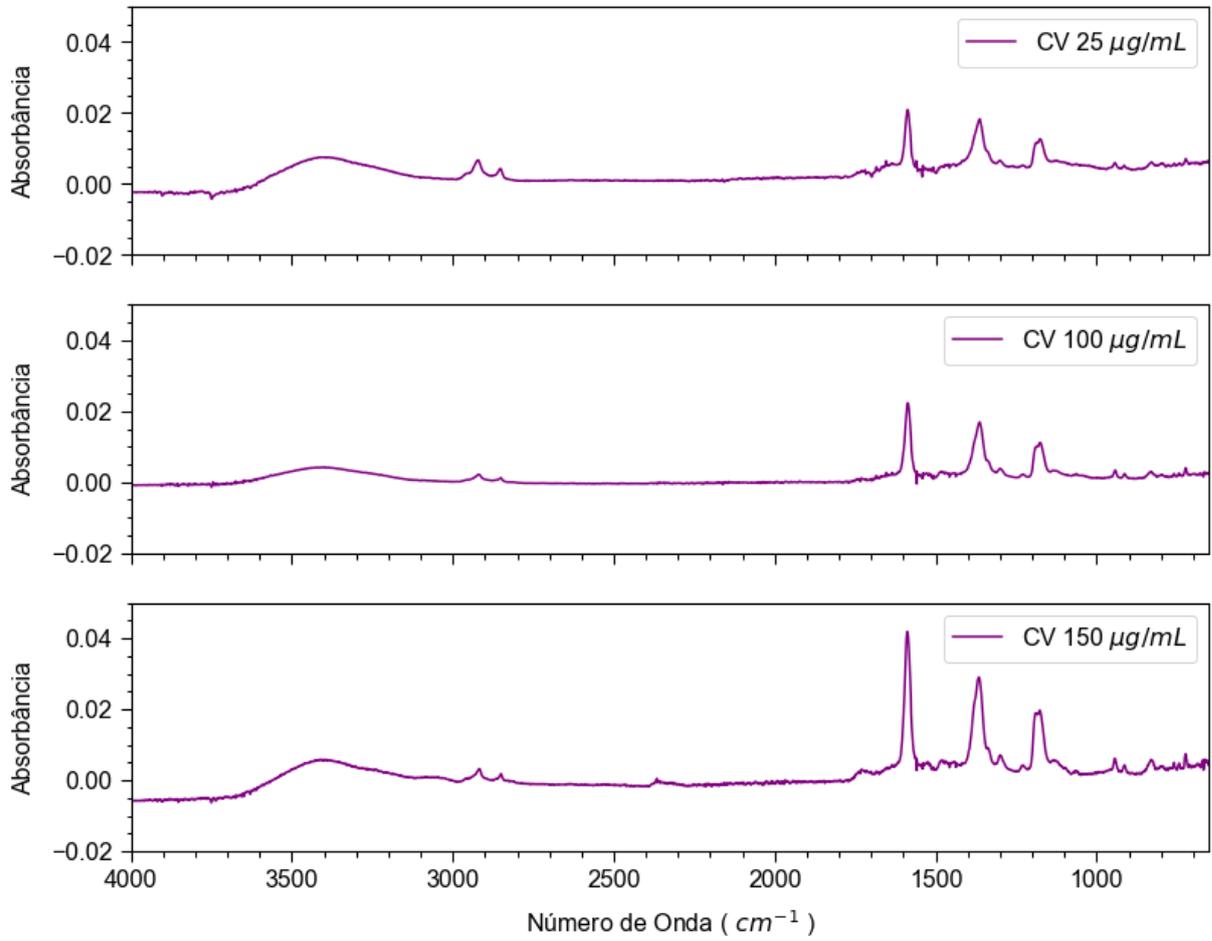
ZHENG, B. *et al.* Graphene Plasmon-Enhanced IR Biosensing for in Situ Detection of Aqueous-Phase Molecules with an Attenuated Total Reflection Mode. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 18, p. 10786–10794, 2018.

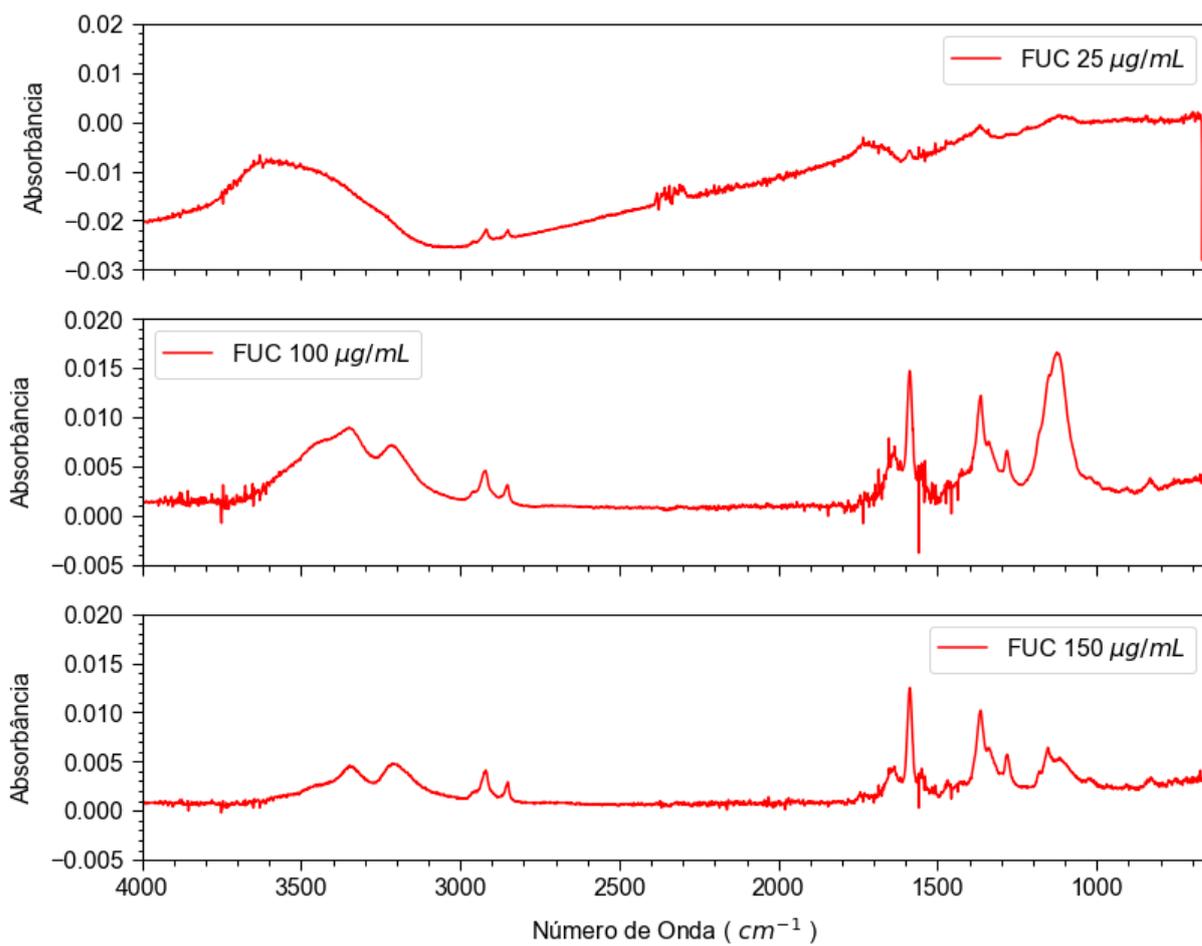
Zheng, B. *et al.* Attenuated Total Reflection Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy: a Powerful Technique for Bioanalysis. **Journal of Analysis and Testing**. v. 1. 2017.

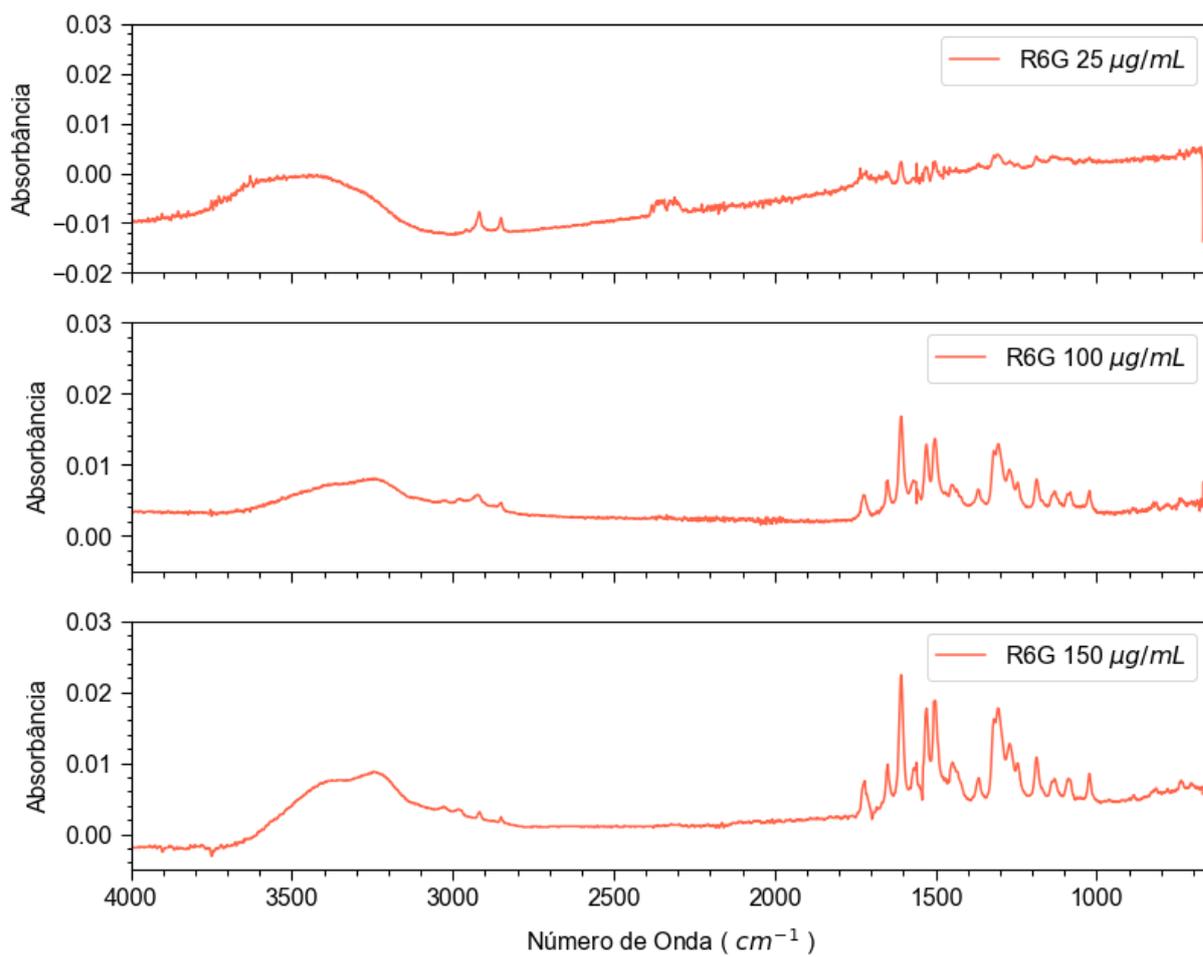
ZHONG, Y. *et al.* Review of mid-infrared plasmonic materials. **Journal of Nanophotonics**, v. 9, n. 1, p. 093791, 2015.

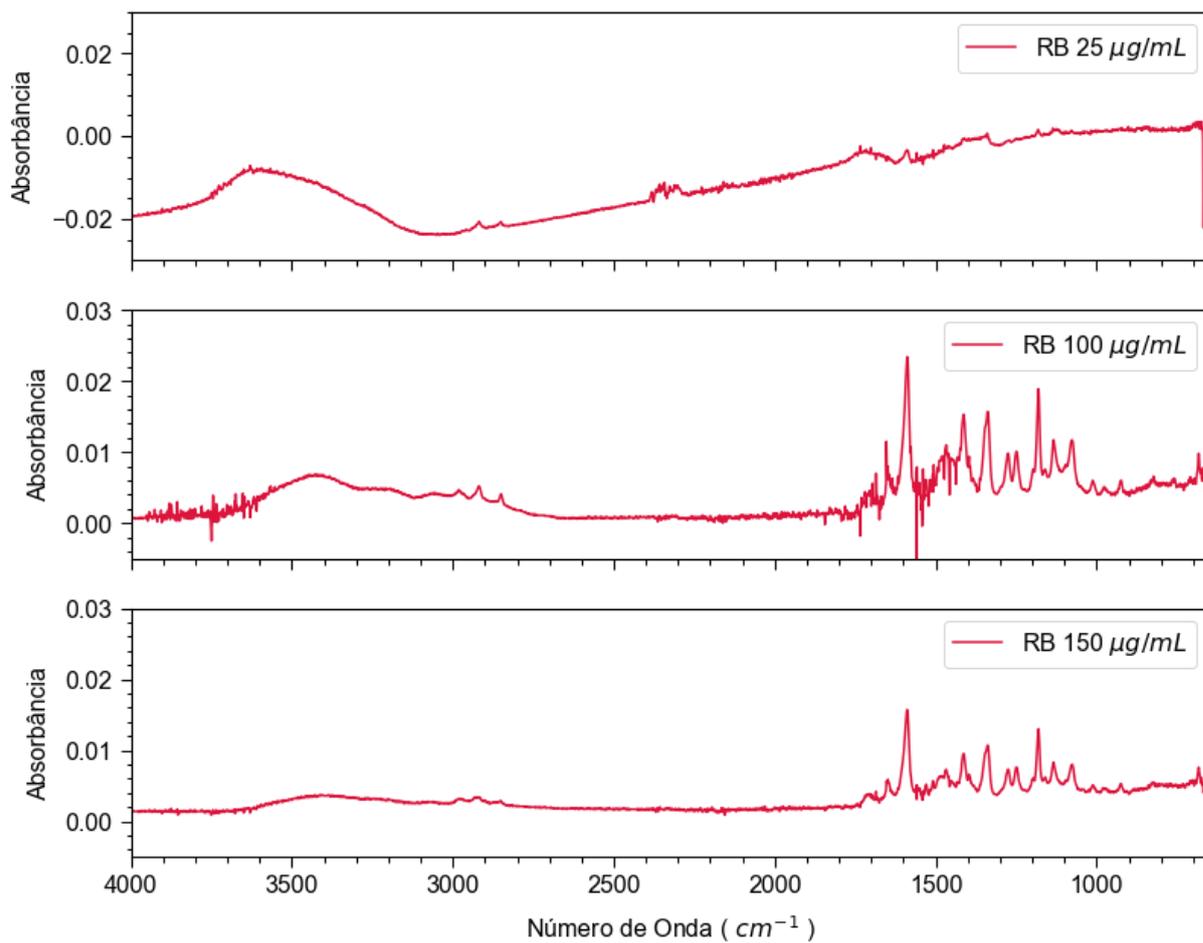
APÊNDICE A

Gráficos de corantes para o estudo da concentração





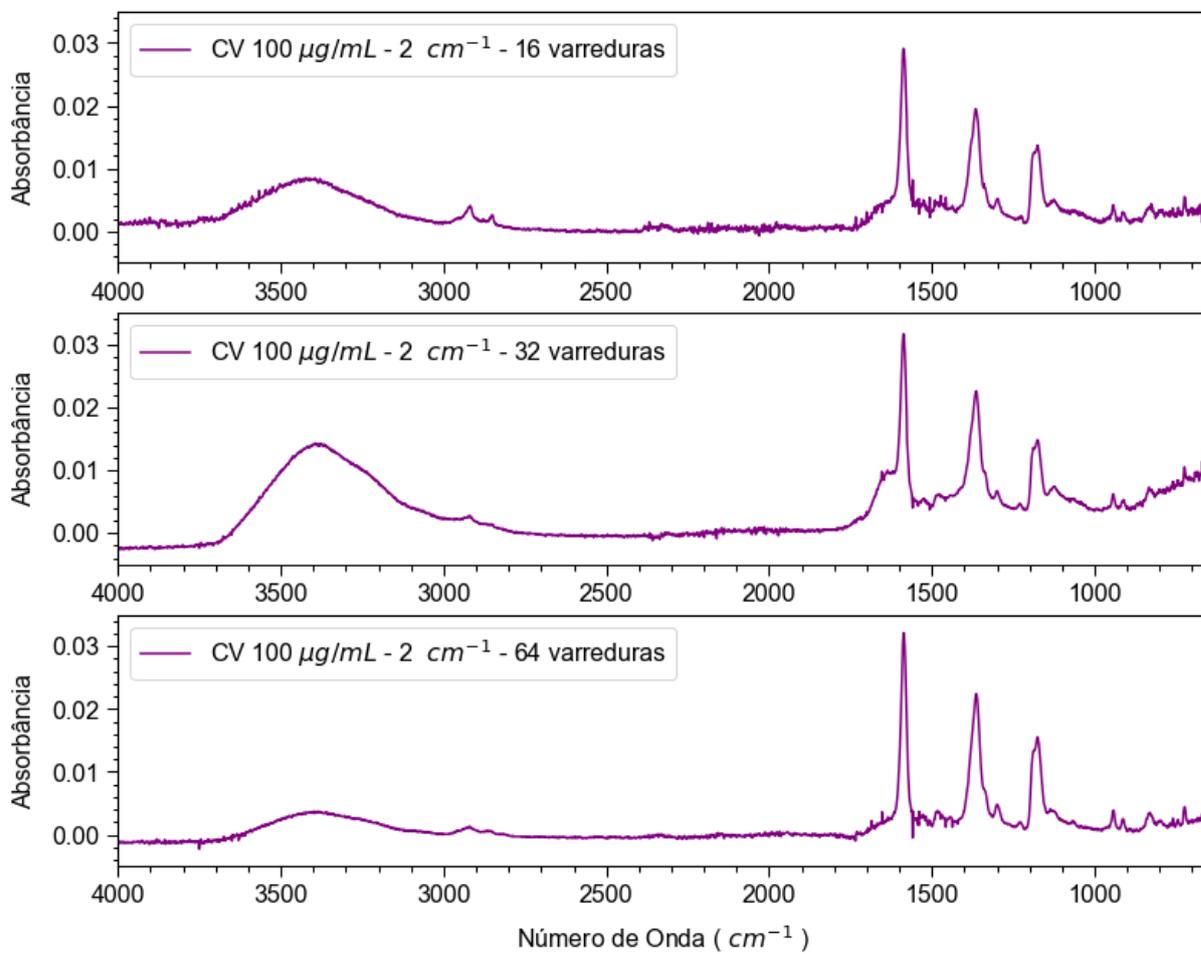


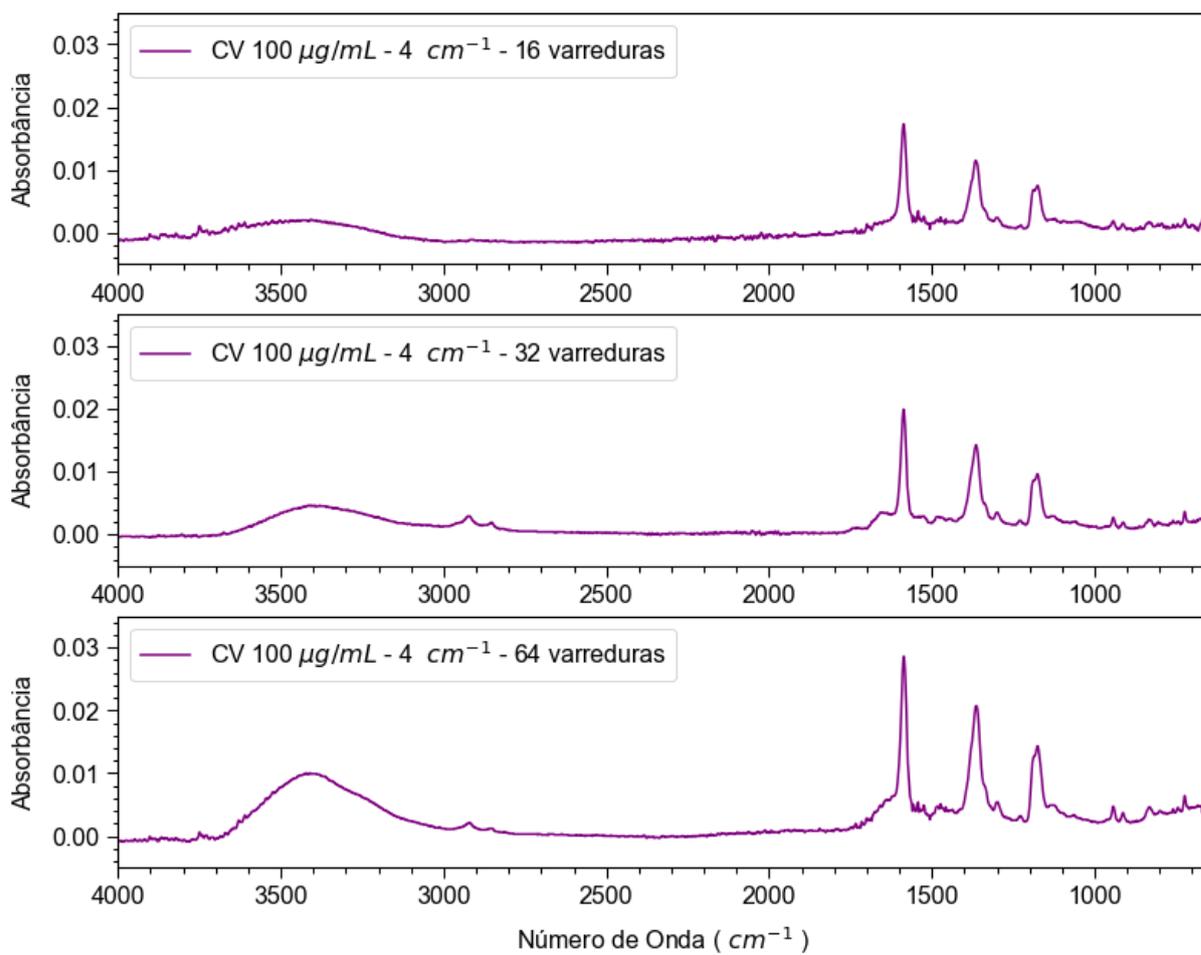


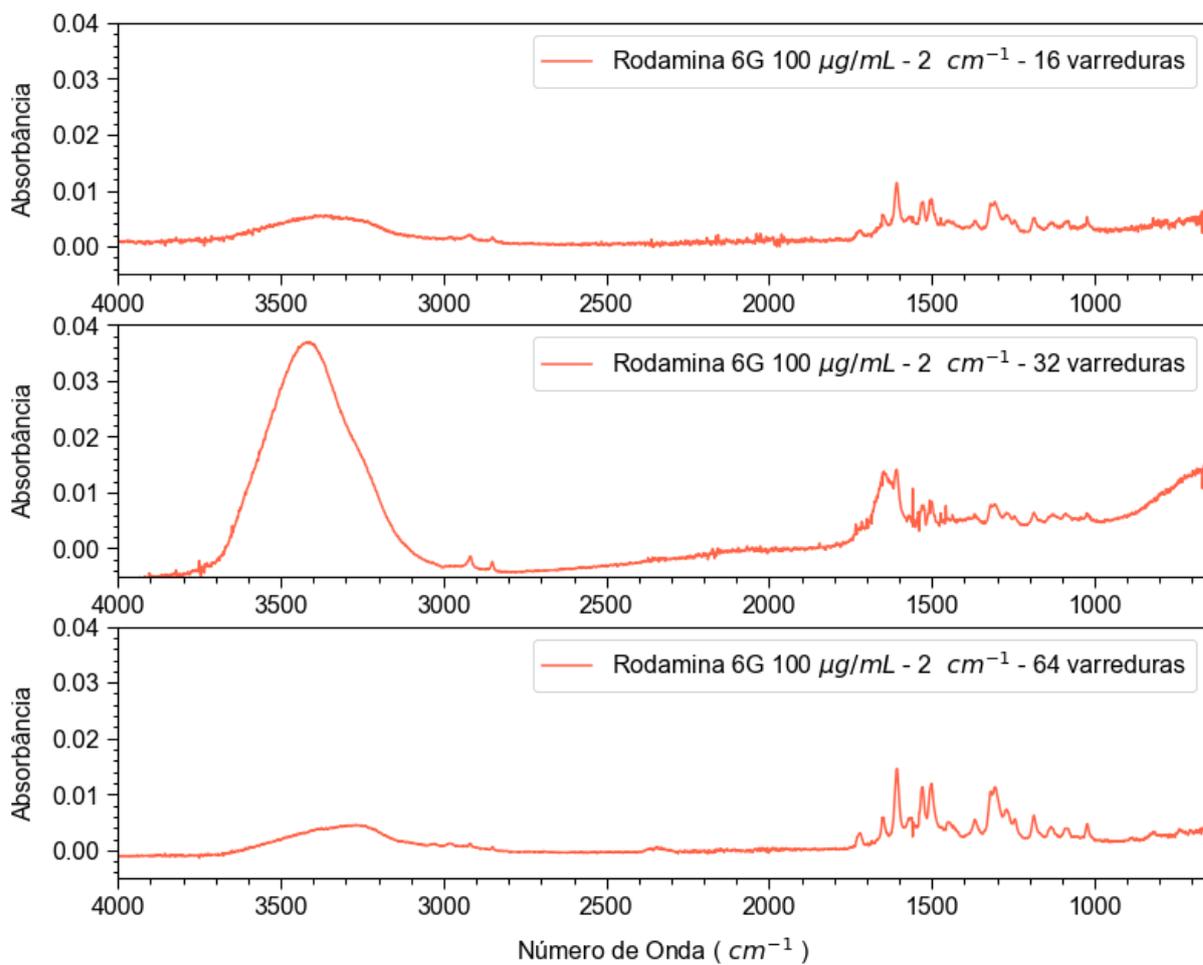
APÊNDICE B

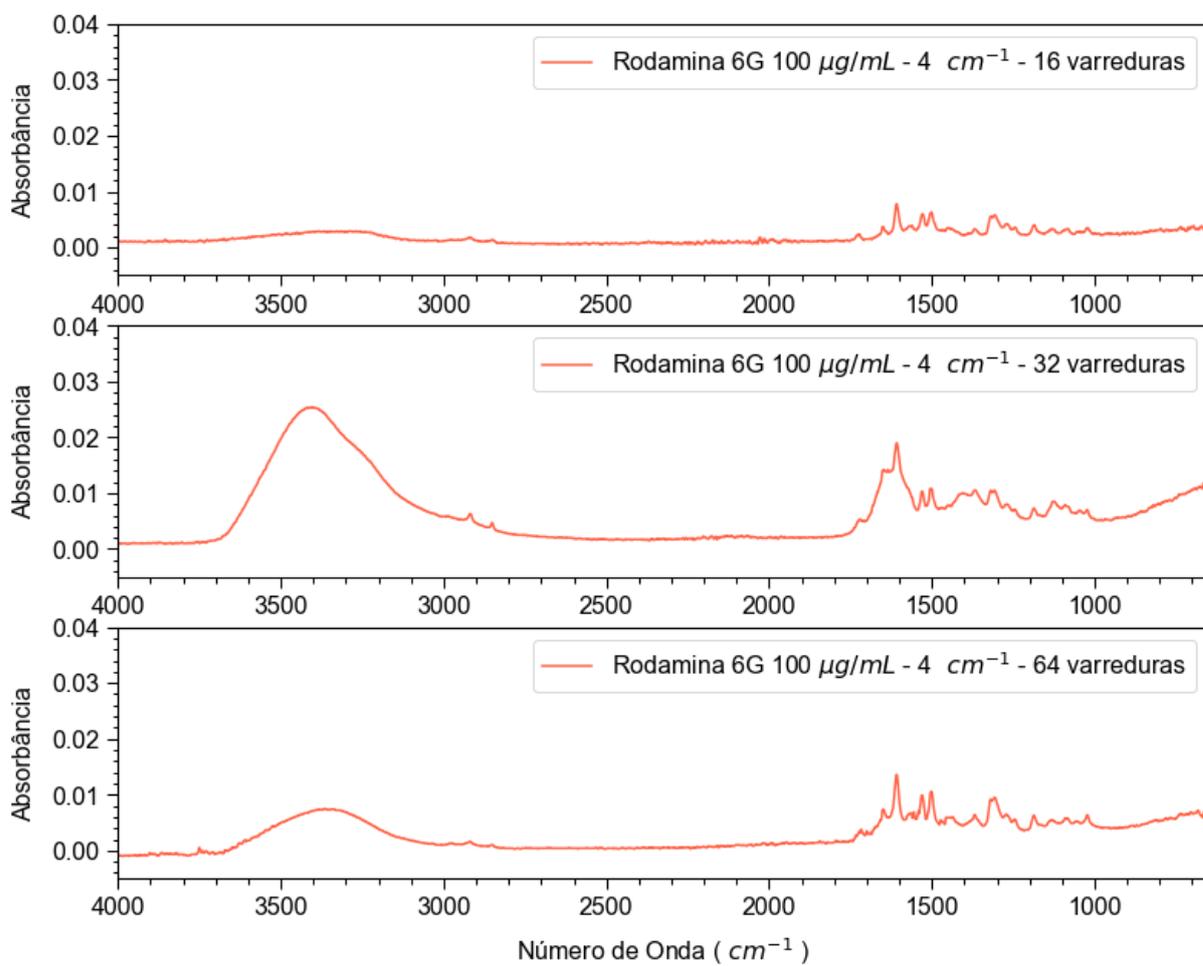
Espectros relativos ao estudo sobre resolução e número de varreduras

Cristal Violeta 2 cm^{-1}



Cristal Violeta 4 cm^{-1} 

Rodamina 6G 2 cm^{-1} 

Rodamina 6G 4 cm^{-1} 

APÊNDICE C

NOTA À IMPRENSA

Pesquisadores da UFPE desenvolvem método inovador para detecção de herbicida

Cientistas do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) desenvolveram uma nova técnica para monitoramento de poluentes ambientais, como corantes e herbicidas. O estudo, parte da tese de doutorado de Felipe Cunha da Silva Trindade, coordenado pela Profa. Dra. Claudete Fernandes Pereira, utilizou a Espectroscopia de Absorção no Infravermelho Intensificada por Superfície (SEIRA) com pontos quânticos de cobre e prata. A pesquisa focou na detecção do herbicida atrazina, amplamente utilizado em plantações de milho e cana-de-açúcar e, se mal administrada, pode causar sérios riscos à saúde humana. A pesquisa utilizou pontos quânticos, materiais semicondutores em escala nanométrica, para intensificação do sinal da atrazina, permitindo assim detectar concentrações extremamente baixas de atrazina, até 1 µg/L, demonstrando uma sensibilidade comparável às técnicas convencionais. A análise mostrou-se rápida, não destrutiva e de baixo custo, sendo uma alternativa viável para o monitoramento ambiental e controle de qualidade de alimentos.

Esse trabalho destaca a importância da pesquisa científica para a sociedade, especialmente no contexto brasileiro, onde o uso de defensivos agrícolas é crescente. O novo método pode contribuir significativamente para a segurança ambiental e alimentar, oferecendo uma ferramenta eficaz para a detecção de substâncias nocivas. Por fim, este trabalho representa um avanço significativo na área de química analítica e reforça o compromisso da UFPE com a inovação e a sustentabilidade.