



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELLE SARTO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES NANOESTRUTURADOS
DE TiO₂ DECORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS EM
EXTRATO DE UVA POR TÉCNICA SERRS**

Londrina
2023

GABRIELLE SARTO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES NANOESTRUTURADOS
DE TiO₂ DECORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS EM
EXTRATO DE UVA POR TÉCNICA SERRS**

Dissertação de mestrado apresentado à
Universidade Estadual de Londrina - UEL para a
obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Lucio César de Almeida

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Sarto, Gabrielle.

Desenvolvimentos de Filmes Nanoestruturados de TiO₂ Decorados com Nanopartículas de Prata para a Determinação de Antocianinas em Extrato de Uva por Técnica SERRS / Gabrielle Sarto. - Londrina, 2023.
82 f.

Orientador: Lucio César de Almeida
Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2023
Incluir bibliografia

1. Antocianinas - Tese. 2. Nanotubos de Dióxido de Titânio- Tese. 3. SERRS – Tese. I. César de Almeida, Lucio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

GABRIELLE SARTO

**DESENVOLVIMENTO DE FILMES NANOESTRUTURADOS
DE TiO₂ DECORADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
PARA A DETERMINAÇÃO DE ANTOCIANINAS EM
EXTRATO DE UVA POR TÉCNICA SERRS**

Dissertação de Mestrado apresentado à
Universidade Estadual de Londrina - UEL,
para a obtenção do título de Mestre em
Química.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Lucio César de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Henrique de Santana
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Elivelton Alves Ferreira
Universidade Federal Fluminense -UFF-
Campus de Volta Redonda

Londrina, 4 de agosto de 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus pela vida e pela oportunidade de estudar, e pela sanidade mental concedida ao longo desses anos

Aos meus pais Ednilson e Marcia, que sempre me apoiaram nos estudos, ensinado a nunca desistir e batalhar para o que estava buscando, proporcionando as melhores condições de estudo possível, além de sempre ser meu ponto seguro em todos os momentos de angústia, estando sempre presentes para me escutar, apoiar e aconselhar. E ao meu irmão, Gustavo, que proporcionar vários momentos de risadas e muita parceria durante esse período.

Aos meus familiares que me apoiaram durante a formação, sempre estando presentes quando eu precisasse independente da distância, em especial para meus avós e padrinhos.

Ao meu orientador Prof. Lucio por toda paciência, disposição, oportunidades, orientação e boas discussões dos resultados obtidos no laboratório. Obrigado por tudo que foi ensinado. E ao meus coorientador Thiago, pelos ensinamentos e orientações.

Aos meus colegas de laboratório, aos meus amigos que fiz durante o período do mestrado, por todos os momentos, conversas, estudos e experiências que passamos juntos.

Aos componentes da banca, o Prof. Dr. Henrique, Prof. Dr^a Elen, Prof. Dr. Elivelton e o Prof. Dr. Edson, por aceitarem o convite e contribuírem para a minha pesquisa.

À equipe do LabEspec e a do LARX pela leitura das amostras.

E por fim, agradeço a mim mesmo por não ter desistido do que realmente queria mesmo com as dificuldades, e ter paciência nas horas que eram necessárias.

Obrigado a todos que acreditaram em mim e que fizeram e fazem parte da minha vida até o momento.

RESUMO

SARTO, Gabrielle. **Desenvolvimento de filmes nanoestruturados de TiO₂ decorados com nanopartículas de prata para a determinação de antocianinas em extratos de uva por técnica SERRS**. 82 f. Trabalho de Defesa de Mestrado em Química – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023

Os corantes naturais, atualmente, são muito usados nas indústrias, e dentre eles, destacam-se as antocianinas encontradas em diferentes fontes naturais. A casca da uva é uma fonte importante destes pigmentos naturais, que é responsável pela coloração avermelhada dos cultivares. O fator que está intimamente relacionado com a cor é que, o pigmento coexiste, no equilíbrio, em quatro espécies diferentes: cátion flavílio, base carbinol, chalcona, base quinoidal, dependendo do pH do meio. Nesse sentido, com o intuito de desenvolver um sensor SERRS a partir da utilização dos nanotubos de dióxido de titânio (TiO₂NTs), obtidos por anodização tripla de placas de titânio, em conjunto com uma solução coloidal de prata para a determinação das antocianinas presentes nos extratos obtidos da casca de uva, buscando obter uma intensificação nos modos vibracionais presentes em equilíbrio desse composto. Os resultados de caracterização dos filmes de TiO₂NTs mostraram a presença da fase anatase, confirmando que o método usado foi eficaz para obtenção da fase cristalina. Foram identificadas as espécies das antocianinas em equilíbrio, utilizando a espectroscopia UV-Vis, porém, apenas alterando o pH do meio não foi possível identificar as estruturas individuais do pigmento. Nas análises dos espectros Raman, foi possível identificar o efeito SERRS apenas com a presença das nanopartículas de prata, demonstrando que essa intensificação dos modos vibracionais das antocianinas, ocorreram tanto nos extratos de casca de uva diluído em soluções coloidais como sobre os filmes de TiO₂NTs. Também foi verificado, com as deconvolução dos espectros das diferentes diluições de extrato, que o sinal do cátion flavílio foi intensificado com a redução da quantidade de extrato de uva e o aumento da razão nanopartículas de Ag / quantidade de antocianinas. Comparado com a metodologia padrão (UV-Vis), o sensor SERRS mostrou-se mais sensível. Dessa forma, evidenciou-se elevado potencial dos filmes de TiO₂NTs recobertos pelas nanopartículas de prata como um sensor SERRS capaz de avaliar o teor de antocianinas em extratos de cascas de uva.

Palavras-chave: Antocianinas; TiO₂NTs; SERRS.

ABSTRACT

SARTO, Gabrielle. **Development of nanostructured films of TiO₂ decorated with silver nanoparticles for the determination of anthocyanins in grape extracts by SERRS technique.** 82 f. Trabalho de Defesa de Mestrado em Química – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023

Natural dyes, currently, are widely used in industries, and among them, anthocyanins found in different natural sources stand out. The grape skin is an important source of these natural pigments, which is responsible for the reddish coloration of the cultivars. The factor that is closely related to color is that the pigment coexists, at equilibrium, in four different species: flavylium cation, carbinol base, chalcone, quinoidal base, depending on the pH of the medium. In this sense, to develop a SERRS sensor from the use of titanium dioxide nanotubes (TiO₂NTs), obtained by triple anodizing of titanium plates, together with a colloidal solution of silver for the determination of anthocyanins present in the extracts obtained from the grape skin, seeking to obtain an intensification in the vibrational modes present in equilibrium of this compound. The characterization results of the TiO₂NTs films showed the presence of the anatase phase, confirming that the method used was effective to obtain the crystalline phase. Anthocyanin species in equilibrium were identified using UV-Vis spectroscopy, however, only by changing the pH of the medium it was not possible to identify the individual structures of the pigment. In the analysis of the Raman spectra, it was possible to identify the SERRS effect only with the presence of silver nanoparticles, demonstrating that this intensification of the vibrational modes of anthocyanins occurred both in the extracts of grape skin diluted in colloidal solutions and on the TiO₂NTs films. It was also verified, with the deconvolution of the spectra of the different dilutions of extract, that the signal of the flavylium cation was intensified with the reduction of the amount of grape extract and the increase of the ratio of silver nanoparticles / quantify of anthocyanins. Compared to the standard methodology (UV-Vis), the SERRS sensor was more sensitive. Thus, the high potential of TiO₂NTs films recovered by silver nanoparticles as a SERRS sensor capable of evaluating the anthocyanin content in grape skin extracts was evidenced.

Keywords: Anthocyanins; TiO₂NTs, SERRS.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura principal antocianinas-3-O-glucosídeo (R ₃) | 18 |
| Figura 2 – Equilíbrio químico da antocianina que ocorrem devido a variação do pH do meio..... | 20 |
| Figura 3 – Mecanismos de espalhamento da radiação eletromagnética onde mostra a diferença entre o espalhamento Rayleigh, o espalhamento Stokes e o espalhamento Anti-Stokes..... | 24 |
| Figura 4 – Exemplo de um espectro Raman onde estão mostradas as bandas atribuídas para ambos os espalhamentos | 25 |
| Figura 5 – Dióxido de titânio representado em seus três distintos polimorfos, Anatase, Rutilo e Brookita..... | 30 |
| Figura 6 – Espectrômetro portátil utilizado nas medidas Raman | 40 |
| Figura 7 – Diluições de 20, 15, 10, 5, 1, 0,5 e 0,1% do extrato em soluções coloidais de nanopartículas de prata, utilizados nas medidas Raman | 40 |
| Figura 8 – TiO ₂ NTs colocados sobre uma superfície de vidro depositados 50 µL de solução de extrato de uva diluída a 1% em solução coloidal de prata (a) preparo das amostras na superfície do TiO ₂ NTs (b) imagem obtidas do espectrômetro portátil Raman, mostrando o escurecimento da região onde foi adicionado o extrato e do colóide de prata sobre o TiO ₂ NTs..... | 41 |
| Figura 9 – Análises de difração de Raios X de amostras de filmes de TiO ₂ NTs retiradas da superfície do titânio (—) sobre a superfície do titânio (—)..... | 43 |
| Figura 10 –Análise de Reflectância Difusa na região UV-Vis da amostra de TiO ₂ NTs retiradas da superfície do titânio metálico referente ao (a) gráfico de absorvância em função do comprimento de onda (b) gráfico de $\alpha h\nu^{1/2}$ em função da energia calculada a partir da função de Kubelka-Munk. | 44 |
| Figura 11 – Análise Raman das amostras de TiO ₂ NTs sobre a superfície do ITO (—) sobre a superfície do titânio (—), ambos obtidos na região de 300 a 1000 cm ⁻¹ ($\lambda_{\text{máx}} = 532 \text{ nm}$) | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 12 – Espectro eletrônico de absorção no UV-Vis de uma solução aquosa obtido pela diluição do corante de uva em diferentes pH (a) coloração das soluções após a alteração do pH do meio (b) | 47 |
| Figura 13 – Espectro Raman Ressonante do extrato puro (—) e do extrato diluído 50% em água (—), ambos obtidos na região de 1150 a 1650 cm^{-1} ($\lambda_{\text{máx}} = 532 \text{ nm}$)..... | 49 |
| Figura 14 –Espectro Raman Ressonante do corante puro (—) comparado com o espectro RR sobre a superfície do nanotubos de TiO_2 (—), ambos obtidos na região de 1200 a 1650 cm^{-1} ($\lambda_{\text{máx}} = 532 \text{ nm}$) | 50 |
| Figura 15 –Espectros Raman do extrato sobre a superfície do filme de TiO_2 NTs/ITO (—), sobre a superfície TiO_2 NTs/ITO com extrato e solução de nanopartículas de prata (—), obtidos na região de 1150 a 1700 cm^{-1} na radiação excitante 532 nm | 51 |
| Figura 16 – Espectros SERRS das diferentes diluições (0,1 a 20%) do extrato de uva em soluções de nanopartículas de Ag..... | 52 |
| Figura 17 –Espectros deconvoluídos na região de 1475 a 1700 cm^{-1} para os extratos de uva diluídos em (a) 0,1% e (b) 20% em soluções de nanopartículas de Ag. (c) Razão das intensidades (I) das bandas referente a base quinoidal (1633 - 1637 cm^{-1}) e do cátion flavílio (1647 - 1653 cm^{-1}) <i>versus</i> % de diluição do extrato de uva..... | 54 |
| Figura 18 –Espectros SERRS do (a) extrato diluído a 1% em solução de nanopartículas de Ag (—); extrato diluído a 1% em solução de nanopartículas de Ag sobre a superfície do TiO_2 NTs (—) obtidos na região de 1200 a 1700 cm^{-1} na radiação excitante 532 nm. Os espectros deconvoluídos na região de 1560 a 1680 cm^{-1} para o extrato de uva diluído a 1% em solução de nanopartícula de Ag obtidos em (b) líquido e (c) sobre o substrato de TiO_2 NTs..... | 57 |
| Figura 19 – Espectros deconvoluídos na região de 1560 a 1680 cm^{-1} para os extratos de uva diluídos em (a) 1% e (b) 0,1% em soluções de nanopartículas de Ag. (c) Razão das intensidades (I) das bandas referente a base quinoidal (1635 cm^{-1}) e do cátion flavílio (1653 cm^{-1}) <i>versus</i> % de diluição do extrato de uva. | 60 |

- Figura 20** – (a) Espectro de absorção no UV-Vis obtido pela diluição do corante de uva em água e (b) curva analítica obtida das diluições do extrato de uva (20, 15, 10, 5 e 1%) a partir da absorção máxima de 523 nm ...62
- Figura 21** - Percentual de degradação do teor de antocianinas após o período de 5 dias, a partir da diluição de 1% do extrato em solução coloidal de prata sobre o filme de TiO₂NTs, obtidos empregando a técnica SERRS64
- Figura 22** – Percentual de degradação do teor de antocianinas após o período de 5 dias, a partir da diluição de 10% do extrato em água, empregando a técnica de espectrofotometria UV-Vis65

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Classificação de pigmentos obtidos de fontes vegetais e animais com base em sua estrutura química..... | 17 |
| Tabela 2 – Principais estruturas das antocianinas e suas respectivas fontes vegetais | 18 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------------|--|
| TiO₂ | Dióxido de Titânio |
| Ti | Titânio |
| TiO₂NTs | Nanotubos de Dióxido de Titânio |
| RR | Raman Ressonante |
| SERS | Espalhamento Raman Amplificado por Superfície |
| SERRS | Espalhamento Raman Ressonante Amplificado por Superfície |
| ITO | Óxido de Estanho Dopado com Índio |
| DRX | Difratograma de raios X |
| ERD | Espectroscopia de Reflectância Difusa |
| Ag | Prata |
| Au | Ouro |
| Cu | Cobre |
| pH_{pcz} | pH no Ponto de Carga Zero |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REFERENCIAL TÉORICO | 16 |
| 2.1 | CORANTES NATURAIS | 16 |
| 2.1.1 | Antocianinas | 18 |
| 2.2 | IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS..... | 21 |
| 2.2.1 | Espectroscopia Raman..... | 23 |
| 2.2.2 | Raman Ressonante (RR)..... | 26 |
| 2.2.3 | Espalhamento Raman Amplificado por Superfície (SERS)..... | 27 |
| 2.2.4 | Substrato de SERS-ativo | 28 |
| 2.3 | DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO ₂) | 29 |
| 2.3.1 | Nanotubos de Dióxido de Titânio (TiO ₂ NTs) | 30 |
| 2.3.2 | Sínteses dos Nanotubos | 31 |
| 2.3.2.1 | Síntese por Anodização Eletroquímica | 32 |
| 2.3.3 | TiO ₂ NTs como substrato de SERS-ativo | 34 |
| 3 | OBJETIVOS | 36 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 36 |
| 3.2 | OBJETIVO ESPECÍFICO..... | 36 |
| 4 | PARTE EXPERIMENTAL | 37 |
| 4.1 | SÍNTESE DOS NANOTUBOS DE TiO ₂ | 37 |
| 4.2 | CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE NANOTUBOS DE TiO ₂ | 38 |
| 4.2.1 | Difratograma de Raios X..... | 38 |
| 4.2.2 | Espectroscopia de Reflectância Difusa | 38 |
| 4.3 | SÍNTESE DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE PRATA | 38 |
| 4.4 | PREPARO DO EXTRATO DE UVA | 39 |
| 4.5 | ANÁLISE UV-VIS DOS DIFERENTES PH | 39 |
| 4.6 | ESPECTROSCOPIA RAMAN..... | 39 |
| 4.6.1 | Preparo de soluções para estudo RR estudo SERS..... | 40 |
| 4.6.1.1 | Diluição do extrato de uva em solução coloidal de prata | 40 |
| 4.6.2 | Curva Analítica do extrato de casca de uva diluídos em solução coloidal de nanopartículas de prata sobre TiO ₂ NTs..... | 41 |
| 4.6.3 | Curva Analítica do extrato de casca de uva diluídos por análise UV-Vis | |

| | | |
|----------|--|-----------|
| | | 42 |
| 4.6.4 | Avaliação da degradação de antocianina em função do tempo..... | 42 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 43 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL..... | 43 |
| 5.1.1 | Difratograma de Raios X (DRX)..... | 43 |
| 5.1.2 | Espectroscopia de Reflectância Difusa (ERD)..... | 44 |
| 5.1.3 | Espectroscopia Raman | 46 |
| 5.2 | ANÁLISE DOS EXTRATOS DE CASCA DE UVA POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS | 47 |
| 5.3 | ANÁLISE RAMAN RESSONANTE DO EXTRATO PURO E DILUÍDO EM ÁGUA | 49 |
| 5.4 | ANÁLISE DO EXTRATO SOBRE O SUBSTRATO DE TiO ₂ NTs..... | 50 |
| 5.5 | ANÁLISE DO EFEITO DO EXTRATO DILUÍDOS EM COLOIDE DE PRATA | 52 |
| 5.6 | ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DO EXTRATO DE CASCA DE UVA E AS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE AG SOBRE O SUBSTRATO DE TiO ₂ NTs | 56 |
| 5.7 | CURVA ANALÍTICA DO EXTRATO DE CASCA DE UVA COM AS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA SOBRE O SUBSTRATO DE TiO ₂ NTs | 59 |
| 5.8 | COMPARAÇÃO COM O MÉTODO PADRÃO (ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS) PARA A QUANTIFICAÇÃO DE ANTOCIANINAS EM EXTRATO DE CASCA DE UVA | 62 |
| 5.9 | AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE ANTOCIANINA NO EXTRATO DA CASCA DE UVA APÓS 5 DIAS | 64 |
| 6 | CONCLUSÃO | 67 |
| | REFERÊNCIAS | 69 |
| | APÊNDICE | 77 |
| | APÊNDICE A – Espectros deconvoluídos na região de 1560 a 1680 cm ⁻¹ para os extratos de uva diluídos em (a) 5% e (b) 10% (c) 15% em soluções de nanopartículas de Ag. | 78 |
| | APÊNDICE B – Espectros deconvoluídos na região de 1560 a 1680 cm ⁻¹ para os extratos de uva diluídos em (a) 0,75% e (b) 0,5% (c) 0,25% em soluções de nanopartículas de Ag sobre a superfície do TiO ₂ NTs | 80 |
| | APÊNDICE C – Espectros deconvoluídos na região de 1560 a 1680 cm ⁻¹ para os extratos de uva diluídos após degradação de 5 dias em soluções de nanopartículas de Ag sobre a superfície do TiO ₂ NTs. | 82 |

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, há uma extensa área de investigação voltada para exploração de corantes naturais, devido ao crescente interesse em substituir os corantes sintéticos existentes que são tóxicos aos seres humanos. Dentre os corantes naturais, destacam-se as antocianinas que, em conjunto com os carotenoides, são os corantes mais utilizados na indústria alimentícia (Li *et al.*, 2022). As antocianinas apresentam atividade antioxidante, que desempenha um papel vital na prevenção de danos neurais e doenças cardiovasculares, além de auxiliar na redução de diabetes (KONCAZAK; ZHANG, 2004). Ademais, relata-se o efeito positivo das antocianinas em tratamentos de câncer (LULE; XIA, 2005), na nutrição humana (STINTZING; CARLE, 2004), e a sua intensa atividade biológica (KONG *et al.*, 2003).

As antocianinas são, essencialmente, encontradas em fontes vegetais, como flores, folhas e frutas. Com relação a essa última classe, destaca-se as uvas, que consiste em um dos maiores cultivares de fruta do mundo (ANDREEVA, 2020). Sua casca é uma fonte importante de pigmentos naturais e tem sua composição investigada devido à grande presença de compostos fenólicos de interesse (MAZZA, 1995). Dentre os compostos presentes na casca de uva, destaca-se as antocianinas que conferem a coloração avermelhada dos cultivares. Além das características benéficas ao ser humano já citadas, em conjunto com outros polifenóis presentes, também permitem avaliar o estágio de amadurecimento das uvas para fins quimiotaxonômicos (FLAMINI *et al.*, 2013). Entretanto, decorrente da variedade e da complexidade desses compostos, em conjunto com a falta de elucidação completa dos fatores que influenciam a estabilidade dessas espécies, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas capazes de determiná-las nessas matrizes complexa.

Em geral, as técnicas utilizadas para determinação de antocianinas envolvem processo de amostragem complexo, elevados custos e a necessidade do pré-tratamento de amostras, extração e partição utilizando solventes orgânicos, resultando na geração de resíduos. Em contrapartida, as técnicas espectroscópicas vibracionais, como a Raman, não necessitam de preparos de amostra, são baratas, rápidas, simples e permitem identificar diferentes tipos de grupos funcionais, inferir sobre as ligações e as conformações dos compostos presentes (DRANCA; OROIAN, 2019). Essas características tornam as espectroscopias vibracionais extremamente úteis na identificação e quantificação de vários compostos (como as antocianinas)

(KRYSA; SZYMANSKA-CHARGOT; ZDUNEK, 2022; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Um dos grandes inconvenientes para as análises por espectroscopia de espalhamento Raman, sobretudo em amostras coloridas, consiste na emissão por fluorescência e esse efeito se sobrepõe aos espectros Raman, impossibilitando as análises por meio dessa técnica (WEI; CHEN, LIU, 2015).

Nesse sentido, com o intuito de intensificar os modos vibracionais observados nos espectros Raman, duas metodologias são empregadas: a técnica Raman Ressonante (RR) e o Espalhamento Raman Amplificado por Superfície (SERS). Elas visam, basicamente, a intensificação dos modos vibracionais das amostras por diferentes efeitos: o RR pela presença do grupo cromóforo presente na estrutura do composto e o SERS devido ao efeito plasmônico que gera a intensificação do campo elétrico, na região próxima a da superfície das nanoestruturas metálicas. É conhecido que esse último efeito consegue sobrepujar a fluorescência de fundo, especialmente observada em corantes (LI *et al.*, 2022). Essas duas técnicas podem ser aplicadas em conjunto, sendo que o nome dessa junção é denominado como SERRS (Espalhamento Raman Ressonante Amplificado por Superfície).

Levando em conta a dependência da absorção das espécies de interesse com superfície, a maior tarefa para as medições SERS é o desenvolvimento de substratos eficientes com morfologia de superfície uniforme, que permitam o aprimoramento de sinal em cada ponto de medição, fornecendo sensibilidade adequadas para medir espectros vibracionais de monocamadas de moléculas adsorvidas. Nesse sentido, destacam-se as nanoestruturas de TiO₂, que possuem uma alta capacidade de adsorção e estabilidade química, disponibilidade e biocompatibilidade, tornando-as substratos promissores para medições SERS em diferentes aplicações. (FILIPPIN *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2018).

Posto isso, o intuito do trabalho é avaliar o potencial dos filmes TiO₂NTs (nanotubos de dióxido de titânio) em conjunto com as nanopartículas de prata, como sensor SERRS para a identificação/detecção de antocianinas presentes nos extratos obtidos da casca de uva.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CORANTES NATURAIS

A popularização dos corantes naturais, impulsionou as pesquisas na busca por um mundo mais sustentável e ecologicamente correto, a fim de substituir os corantes existentes por outros que não possuam, em sua composição, substâncias tóxicas e carcinogênicas. (STRINGHETA; FREITAS, 2021). Com o desenvolver das civilizações, aprimorou-se a capacidade de extrair corantes a partir de plantas, flores, frutos e minerais. A vantagem da utilização dos corantes naturais é que eles podem ser usados diretamente, sem a necessidade de métodos de extração complexos ou pré-tratamentos (JACKMAN *et al.*, 1987; SHAHID; ISLAM; MOHAMMAD, 2013).

Durante as últimas décadas, os pesquisadores têm cada vez mais prestado atenção nos corantes naturais, devido a sua atividade antioxidante, antimicrobiana e anticancerígena, exercendo efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular humano, além de serem biorrecursos renovais e sustentáveis, não poluem o ambiente durante a sua produção e uso, possuem alta biodegradabilidade, baixa toxicidade e são potencialmente menos alergênicos em relação aos sintéticos (GOMES *et al.*, 2022; FARIA *et al.*, 2013)

Os corantes naturais podem ser divididos em quatro grupos, sendo três deles os principais grupos encontrados em vegetais e frutas: os compostos heterocíclicos com estrutura tetra-pirrólica, que compreendem as clorofilas presentes em vegetais, temos também os compostos de estrutura isoprenóide, representados pelos carotenoides, encontrados em animais e principalmente em vegetais, e os compostos heterocíclicos contendo oxigênio como os flavonóides, que são encontrados, majoritariamente, em vegetais. Além desses existem outros dois grupos de corantes presentes unicamente em vegetais: as betalainas que são compostos nitrogenados e os taninos, que agrupam diversos compostos de estruturas altamente variáveis, conforme mostrado na Tabela 1 (BOBBIO, 1992; RIBEIRO; SERAVALLI, 2003).

Tabela 1 – Classificação de pigmentos obtidos de fontes vegetais e animais com base em sua estrutura química.

| Grupos Químicos | Pigmentos | Exemplos | Coloração |
|--|---------------------------|-----------------|-------------------------|
| Tetrapirróis | Compostos Heme | Oximioglobina | Vermelha |
| | | Mioglobina | Purpura/ Vermelha |
| | | Metamioglobina | Marrom |
| Tetraterpenoides | Clorofilas | Clorofila a | Verde- azulada |
| | | Clorofila b | Verde |
| Compostos O- Heterocíclicos/ quinonas | Carotenoides | Caroteno | Amarelo-alaranjado |
| | | Licopeno | Laranja-avermelhado |
| Compostos N-Heterocíclicos | Flavonoides/ Fenólicos | Antocianinas | Laranja/ Vermelho/ Azul |
| | | Flavonóis | Branco-amarelado |
| | | Taninos | Vermelha/Marrom |
| Compostos N-Heterocíclicos | Betalaínas | Betanina | Púrpura/ Vermelho |
| | | Betaxantinas | Amarelo |

Fonte: Adaptada (RIBEIRO; SERAVALLI, 2003)

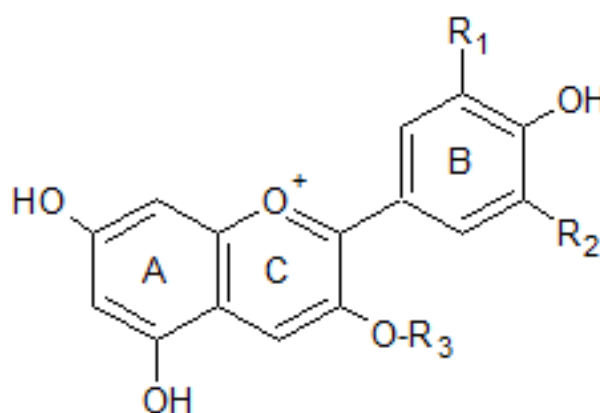
O conhecimento acerca dos corantes naturais utilizados ao longo do desenvolvimento da humanidade serve de base para novas pesquisas e, assim, gera novas perspectivas para as suas aplicações em diversas áreas, por exemplo, nas indústrias de alimentos, devido ao consumo alimentar de corantes sintéticos, que geram diversos problemas de saúde (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002). Como também para suas aplicações na indústria têxtil, considerada a maior poluidora mundial, assim, como as indústrias farmacêuticas e de cosméticos (SHAHID; ISLAM; MOHAMMAD, 2013).

2.1.1 Antocianina

As antocianinas pertencem à família dos flavonóides, que são compostos fenólicos caracterizados pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio) que consistem em estrutura policíclica de quinze carbonos (Figura 1), a qual possui duas ou três porções, sendo que, uma aglicona (antocianidina), um grupo de açúcares e, frequentemente, um grupo de ácidos orgânicos (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008; JACKMAN; YADA; SPEERS, 1987; LOPES *et al.*, 2007).

Com base na posição dos grupos hidroxila e metoxila no anel fenílico (B), os pigmentos de antocianina são classificados em cinco grupos principais: cianinas, petuninas, peoninas, malvinas e delphininas (Tabela 2). A coloração desses compostos está diretamente relacionada ao número de grupos hidroxila livres de grupos metóxi. Um exemplo é a malvidina, a principal antocianina das uvas tintas, que possui o maior grau de metilação e, portanto, a cor mais vermelha (FARIA *et al.*, 2013).

Figura 1 - Estrutura principal antocianinas-3-O-glucosídeo (R₃)



Fonte: Adaptada (JACKMAN *et al.*, 1986)

Tabela 2 - Principais estruturas das antocianinas e suas respectivas fontes vegetais.

| Antocianinas | R ₁ | R ₂ | Fontes |
|--------------|------------------|------------------|---|
| Cianinas | OH | H | Uva, vinho cereja, jambolão, morango, amora, maçã |
| Petuninas | OH | OCH ₃ | Uva, vinho, feijão, mirtilo, laranja |
| Peoninas | OCH ₃ | H | Uva, vinho, cereja, jaboticaba, batata roxa |
| Malvinas | OCH ₃ | OCH ₃ | Uva, vinho |
| Delphininas | OH | OH | Berinjela, feijão, uva, romã, repolho roxo |

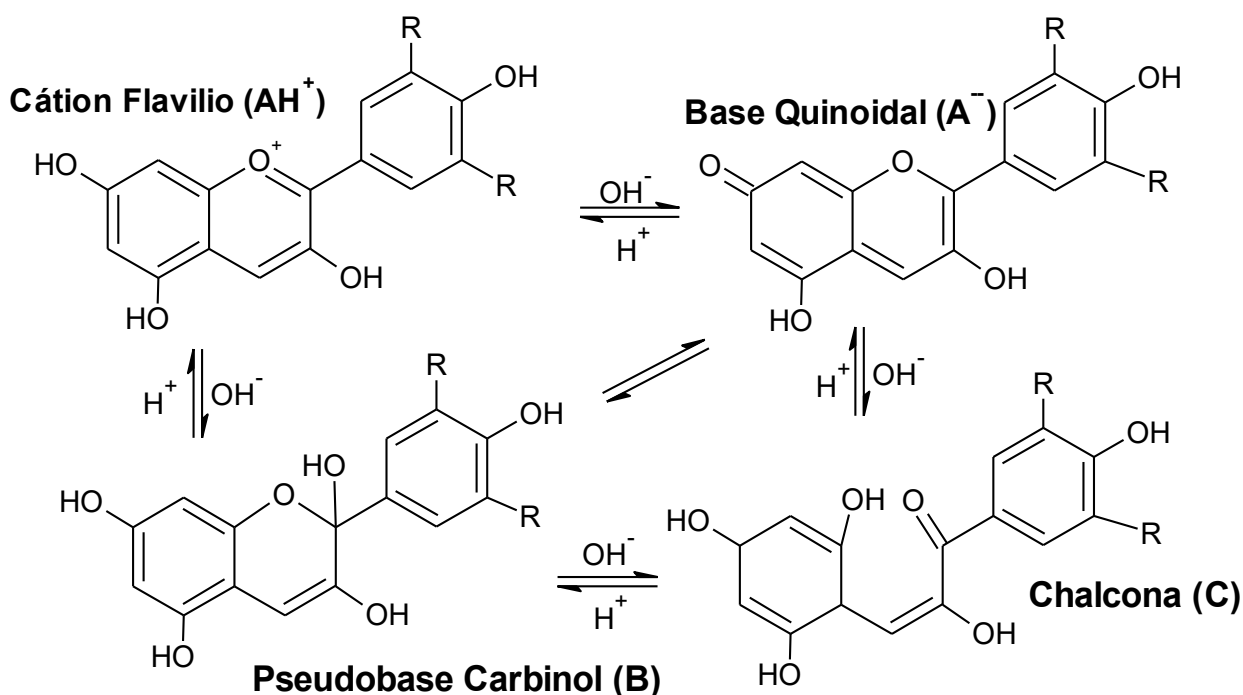
Fonte: Adaptada (MALACRIDA; MOTTA, 2006)

As propriedades físico-químicas das antocianinas, particularmente sua cor, características estruturais e estabilidade, são únicas. Sendo que, por serem moléculas altamente reativas, portanto, são sensíveis a reações de degradação. Assim, sua estrutura cromófora pode dar origem a cores diferentes, dependendo de vários fatores químicos e físicos, como temperatura, pH, luz, solvente e presença de outras enzimas que geralmente podem ser descritas como copigmentos (FARIA *et al.*, 2013; BOBBIO, 1992; RIBEIRO; SERAVALLI, 2003; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2011).

Um fator que está intimamente relacionado com a cor, é que as antocianinas coexistem em equilíbrio em diferentes espécies: cátion flavílio, base carbinol, chalcona, base quinoidal. Em solução aquosa, as antocianinas ocorrem entre essas diferentes estruturas, dependendo do pH (LOPES *et al.* 2007; TANG *et al.*, 2019; CABRITA; FOSSEN; ANDERSEN, 2000).

Em pH 1, a espécie predominante é o cátion flavílio (AH^+), que apresenta uma coloração avermelhada. Com o aumento do pH, ocorre uma série de reações químicas reversíveis, relacionada com a hidratação do cátion flavílio dando origem ao Pseudobase Carbinol (B). Essas estruturas são incolores e, ao sofrerem uma reação de tautomerização, abrem o anel aromático, formando as Chalcona (C) que possuem a coloração amarelo pálido. Finalmente, uma transferência de próton pode transformar o cátion flavílio vermelho em uma Base Quinoidal azul (A^-), como é mostrado na Figura 2. De modo geral, o cátion flavílio é a forma predominante em pH 1-2 e a base quinoidal e a chalcona é o principal componente em pH acima de 4 (FARIA *et al.*, 20015; LAPIDOT *et al.*, 1999; BROUILLARD; IACOBUCCHI; SWEENEY, 1982).

Figura 2 - Equilíbrio químico da antocianina que ocorrem devido a variação do pH do meio.



Fonte: Adaptada (FARIA *et al.*, 2013)

Dentre as diversas fontes de antocianinas, nesse trabalho foi estudada a uva, que é uma das maiores cultivares do mundo. Esses compostos estão presentes na casca da uva, responsável pela coloração avermelhada dos cultivares. (MAZZA, 1995). É um fato bem estabelecido que as antocianinas acumulam naturalmente na casca das bagas de uva através de uma variedade de estímulos ambientais, como sinais de desenvolvimento e estresses ambientais (FLAMINI *et al.*, 2013). Assim, o período importante que ocorre um aumento da concentração de antocianinas e outros compostos fenólicos, é no início da maturação (SHAHAB *et al.*, 2020; MANFRA *et al.*, 2011). Além de contribuir para a cor de flores e frutas, as antocianinas atuam como filtro das radiações ultravioletas nas folhas. Em certas espécies de plantas estão associadas com a resistência aos patógenos e atuam melhorando e regulando a fotossíntese (ANDREEVA, 2020; KATO; TONHI; CLEMENTE, 2012).

Dessa maneira, a proporção antocianina na casca das frutas é muito importante, pois, além de ter um impacto significativo na cor, influenciam também na forma com que se acumulam durante o processo de amadurecimento da uva, atrelado intimamente às características genéticas da própria fruta. Portanto, identificar o perfil

das mesmas tem sido usado como parâmetro quimitaxonômico para classificação de variedades de uva. (CARREÑO *et al.*, 1997; CABRITA; FOSSEN; ANDREEVA, 2020; MALACRIDA; MOTTA, 2006)

2.2 IDENTIFICAÇÃO DAS ANTOCIANINAS

O crescente interesse na identificação de antocianinas diretamente em matriz biológica levou ao desenvolvimento de técnicas diferentes daquelas empregadas inicialmente. Na literatura destaca-se como método padrão (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008), a espectrofotometria de absorção UV-Vis, que se torna muito útil para a caracterização de antocianinas (RIBÈREAU-GAYON, 1970; VIVAS; VIVAS DE GAULEJAC; NONIER, 2003). Isso ocorre, devido à sua estrutura ressonante, que a tornam capazes de absorver radiação desde o espectro ultravioleta (UV) até o espectro visível (vis). (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008; TANGA *et al.*, 2019, ARRUDA *et al.*, 2019).

Dentre as técnicas tradicionais usadas para identificação do composto, podemos destacar, as técnicas cromatográficas como HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) acoplada a detector de fotodiodos (KRYSA; SZYMANSKA-CHARGOT; ZDUNEK, 2022; CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009; DUGO, *et al.*, 2004), HPLC acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e eletrospray (ESI) (VISHNU *et al.*, 2023), ou FABMS (espectrometria de massas de bombardeamento com átomos rápidos) (TATSUZAWA, 2023). Porém essas técnicas citadas, necessitam de métodos de extração, a fim de isolar as antocianinas, na qual envolvem solventes como água, álcool, éter, clorofórmio (KRYSA; SZYMANSKA-CHARGOT; ZDUNEK, 2022; FONTANA; ANTONIOLLI; BOTTINI, 2013).

Em geral, as técnicas comumente utilizadas para determinação de antocianinas envolvem processo de amostragem complexo, sendo necessário o pré-tratamento de amostras, extração e partição utilizando solventes orgânicos, resultando na geração de resíduos (DRANCA; OROIAN, 2019; DUGO *et al.*, 2004). Em contrapartida, as técnicas espectroscópicas vibracionais, não necessitam de preparos de amostra, são baratas, rápidas, simples e permitem identificar diferentes tipos de grupos funcionais, inferir sobre as ligações e as conformações dos compostos presentes. Essas características acabam sendo extremamente úteis na identificação e quantificação de vários compostos (como as antocianinas), se mostrando eficaz

para a análise, como uma técnica não invasiva. (KRYSA; SZYMANSKA-CHARGOT; ZDUNEK, 2022; CASTAÑEDA-OVANDO *et al.*, 2009).

Mesmo que alguns trabalhos reportem a caracterização de corantes utilizando espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), essa técnica não é viável para identificação de antocianinas *in situ*, devido aos efeitos de interferência da matriz que podem ocorrer, devido o emprego de, por exemplo, solvente em amostras aquosas que interferem nos espectros, diferentemente da espectroscopia Raman (SILVA *et al.*, 2021). No trabalho de Alecu e colaboradores (2020), utiliza-se ambas as técnicas para obtenção dos dados espectrais, aplicada a análise multivariada para investigar as diferenças nas composições química de quatro extratos de casca de uva vermelha, para identificar possíveis correlações entre o tipo de vinhedo (convencional e ecológico), variedades de uva e características dos extratos hidroalcolócos.

No entanto, mesmo apresentando vantagens, a espectroscopia Raman possui algumas limitações, para a caracterização de corantes naturais, relacionadas a forte fluorescência molecular, que muitas vezes sobrepõe o espalhamento Raman, inerentemente fraco, mesmo quando lasers emissores vermelhos ou de infravermelho próximo são usados para excitação (DAS; AGRAWAL, 2011; POZZI; LEONA, 2016). Por conta disso, algumas estratégias têm sido empregadas para contornar esses problemas. Dentre elas, podemos destacar o emprego da técnica SERS (espalhamento raman amplificado por superfície), ou ainda a técnica SERRS (espalhamento raman ressonante amplificado por superfície), que é a união da técnica Raman Ressonante (RR), com a técnica SERS.

O trabalho de Pinzaru e Magdas (2018) apresentou uma das primeiras aplicações da técnica SERS para estudos de reconhecimento de componentes moleculares específicos do vinho, utilizando as nanopartículas de prata. Outra aplicação da técnica SERS consistiu na análise química de alguns alimentos ricos em antocianinas, realizada por QU *et al.* (2020) onde, empregando espelhos de prata como substrato, conseguiu obter a análise dos vinhos tintos, encontrando modos característicos de diversos compostos, dentre eles taninos, resveratrol. Nesse trabalho, os autores ainda relatam que conseguiram, a partir do perfil espectral, separar três tipos de vinhos tintos.

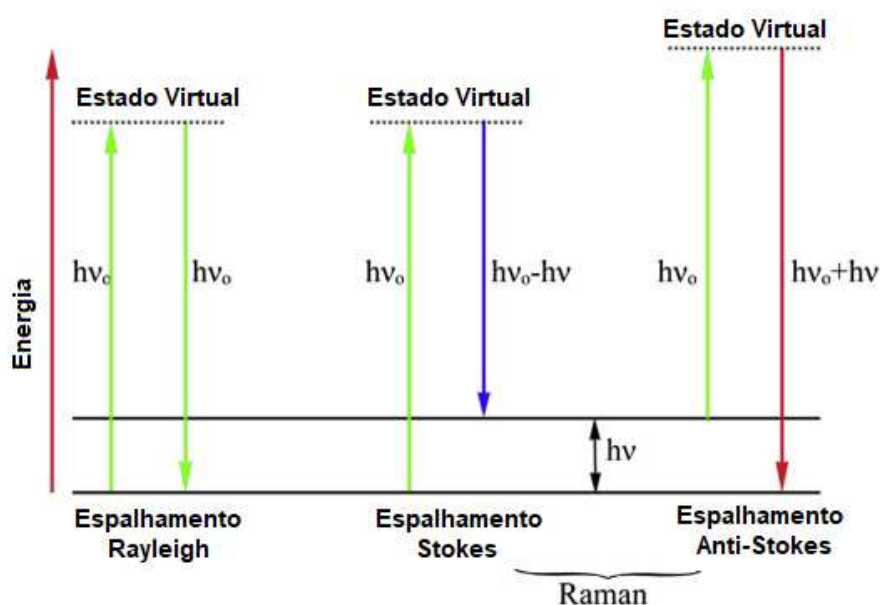
2.2.1 Espectroscopia Raman

O fenômeno da dispersão inelástica da luz, foi descoberto em 1928, pelo físico indiano Chandrashekhara Venkata Raman. A espectroscopia Raman utiliza o espalhamento de luz, a fim de obter respostas das vibrações moleculares, fornecendo informações sobre a estrutura, simetria, estrutura eletrônica e ligação da molécula, como consequência permite a análise quantitativa e qualitativa dos compostos individuais (LONG, 2008; LI *et al.*, 2022).

Dependendo da interação radiação eletromagnética com o meio, ela pode ser refletida, propagada ou transmitida pelo material. A fração de luz sofre diferentes propagações do comprimento de onda dependendo da estrutura química das moléculas responsáveis para dispersão. Isso explica a mudança no comprimento de onda de radiação espalhada por moléculas, ter diferentes frequências daquele do feixe incidente (SANTOS *et al.*, 2019; RIBEIRO; SANTOS, 1992).

O espalhamento inelástico pode ser classificado de duas formas dependendo da relação entre a frequência da radiação espalhada e a frequência da radiação incidente. Um deslocamento Stoke ocorre quando uma molécula do analito absorve energia, o que faz que a radiação emitida tenha energia menor que a radiação incidente, sendo retirada do campo de radiação e transformada no meio espalhador. Por outro lado, um deslocamento anti-Stokes surge quando a molécula do analito perde energia e a radiação emitida tem energia maior que a radiação incidente, sendo retirada do meio espalhador e transformada em energia do campo de radiação. A perda ou ganho de energia da radiação incidente é igual à diferença de energia entre os dois níveis de energia vibracional. (RODRIGUES; GALZERANI, 2012; NASCIMENTO-DIAS; RODRIGUES; OLIVEIRA, 2020)

Figura 3 - Mecanismos de espalhamento da radiação eletromagnética onde mostra a diferença entre o espalhamento Rayleigh, o espalhamento Stokes e o espalhamento Anti-Stokes



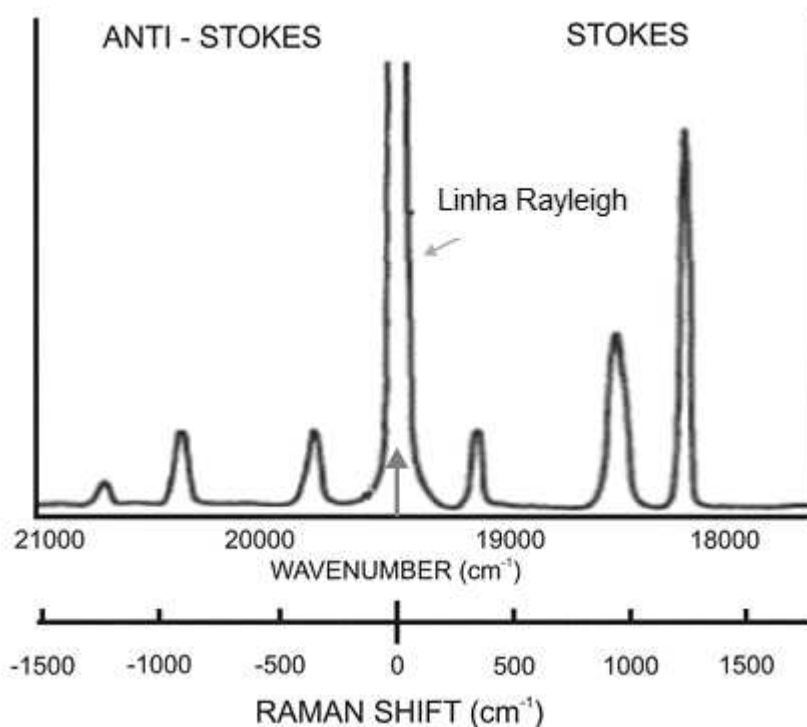
Fonte: Adaptado (JOHN; GEORGE, 2017)

Os espectros Raman são de simples aquisição, e não necessitam de um preparo de amostras complexo. As aquisições dos espectros são obtidas em função das diferenças entre o número de onda do sinal espalhado e o sinal incidente, expresso pelo número de onda (cm^{-1}), denominado como deslocamento Raman. Dessa maneira, dependendo das moléculas e das diferentes estruturas existentes nas amostras, apresentam modos vibracionais únicos que originam diferentes espectros com características vibracionais deste composto, permitindo a identificação do mesmo, até em misturas complexas. (RODRIGUES; GALZERANI, 2017; DAS; AGRAWAL, 2011; JOHN; GEORGE, 2017)

Os espectros Raman de compostos biológicos são complexos e, de difícil interpretação. No entanto, apresenta significativa vantagem, visto que bandas de absorção devido à presença de água não representam um problema para a análise. Embora a fluorescência possa ser considerada o principal obstáculo para algumas amostras examinadas pela técnica Raman, as interações fotoquímicas devem também ser consideradas (LI *et al.*, 2022).

Em um espectro Raman as bandas relacionadas ao espalhamento Rayleigh, correspondem com a frequência da fonte de excitação, localizadas nos centros do espectro. A maneira que, os valores positivos de deslocamento, se obtém as bandas do espalhamento Stokes, e nos valores negativos os espalhamentos anti-Stokes. Há também uma diferença relacionada com a intensidade do espalhamento, dessa forma de Stokes é muito mais favorecida do que anti-Stokes e, portanto, a mudança mais intensa (DAS; AGRAWAL, 2011).

Figura 4 – Exemplo de um espectro Raman onde estão mostradas as bandas atribuídas para ambos os espalhamentos.



Fonte: Adaptado (RODRIGUES; GALZERANI, 2017)

A espectroscopia Raman permite ainda que se explorem dois efeitos especiais, como o efeito Raman Ressonante (RR), e o efeito de intensificação de espalhamento Raman causado por superfície (SERS, espalhamento raman amplificado por superfície) (FARIA; AFONSO; EDWARDS, 2002; WEI; CHEN; LIU, 2015).

2.2.2 Raman Ressonante (RR)

A espectroscopia de Ressonância Raman (RR) é uma técnica poderosa e versátil para o estudo de estruturas vibracionais e eletrônicas de sistemas moleculares cromóforos. A relação das transições eletrônicas e vibracionais, e os modos vibracionais que se mostram intensificados estão localizados no cromóforo, ou seja, no grupo de átomos que dão origem à transição eletrônica (CZERNUSZEWICZ; ZACZEK, 2011).

O efeito RR é definido teoricamente, considerando a intensidade da uma banda Raman, que é a razão da transição entre o estado inicial e o estado final, considerando a quarta potência da radiação espalhada e do quadrado do módulo do componente da polarizabilidade dessa transição $|(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}|^2$, adotando ρ, σ como x, y, z, conforme demonstrado na equação abaixo (SALA, 2008):

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{mn} = \frac{1}{hc} \sum \left(\frac{\int \Psi_n \mu_\sigma \Psi_e d\tau \cdot \int \Psi_e \mu_\rho \Psi_m d\tau}{\nu_{em} - \nu_0} + \frac{\int \Psi_n \mu_\rho \Psi_e d\tau \cdot \int \Psi_e \mu_\sigma \Psi_m d\tau}{\nu_{em} + \nu_0} \right) \text{ Eq(1)}$$

Onde o somatório representa todos os estados excitados da molécula e as integrais representam os momentos de transição entre as funções de onda indicadas. Na condição de RR, o ν_0 tem valor próximos a ν_{em} e o denominador do primeiro termo fica com valor pequeno (tendendo ao ∞), e o do segundo fica com o valor grande (tornando pequeno e podendo ser desprezado). No denominador do primeiro termo é introduzido um fator de amortecimento, Γ_e (que impede que ele se anule na condição de ressonância), assim como o fator ($i = \sqrt{-1}$):

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{mn} = \frac{1}{hc} \sum \left(\frac{\int \Psi_n \mu_\sigma \Psi_e d\tau \cdot \int \Psi_e \mu_\rho \Psi_m d\tau}{\nu_{em} - \nu_0 + i\Gamma_e} \right) \text{ Eq (2)}$$

A intensificação não depende apenas do denominador, mas também do numerador, causando uma intensificação seletiva, pois a segunda integral representa a probabilidade da transição do estado inicial para um estado intermediário e, como o somatório é sobre todos estados excitados, haverá estados em que a integral tem valor pequeno e estados em que o momento de transição adquire valor elevado (SALA, 2008).

Portanto, usa-se o efeito RR, para melhorar a detecção e seletividade, espalhamento Raman, aumentando substancialmente seu sinal. Dessa maneira, para substância intensamente coloridas, como os corantes, cuja banda de adsorção esteja na mesma região de energia da radiação excitante intensidade do pico Raman, temos um aumento muito grande na intensidade de bandas Raman referentes a vibrações dos grupos responsáveis pela transição eletrônica (grupo cromóforo). Assim, estudado a intensidade da banda Raman em função da energia do laser de excitação, pode-se obter informações sobre a estrutura eletrônica (FARIA; AFONSO; EDWARDS, 2002; DRESSELHAUS; JORIO; PIMENTA, 2006).

2.2.3 Espalhamento Raman Intensificado por Superfície (SERS)

Essa área tem sido uma das que mais se destacou nas pesquisas em espectroscopia Raman nos últimos anos. Historicamente, as aplicações analíticas das técnicas Raman eram limitadas por sua relativa baixa sensibilidade, se comparada, por exemplo, a técnica de fluorescência. Sendo assim, o aperfeiçoamento das técnicas SERS possibilitou a detecção do espectro vibracional de uma única molécula, de forma rápida, sensível e não destrutiva, possuindo um baixo custo (comparado com as outras técnicas) e sensibilidade superior (SCHLÜCKER, 2014).

O espectro SERS reflete as mudanças no espectro Raman da molécula devido a adsorção e uma interação com o substrato metálico. Portanto, para entender o SERS, precisamos considerar não apenas a interação entre luz e moléculas/matéria, mas também entre luz e nanoestruturas metálicas (SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006; PERSSON; ZHAO. ZHANG, 2006; JANA; GANGULY; PAL, 2016).

Isso ocorre por conta de dois tipos diferentes de contribuições, que explicam esse mecanismo. O primeiro é o modelo eletromagnético, responsável pela ressonância plasmônica de superfície gerado pela intensificação do campo eletromagnético, o segundo seria o modelo químico causado pela transferência de carga que ocorre na superfície adsorvida. O aprimoramento eletromagnético surge da interação entre a molécula e a superfície, gerando um forte campo magnético local induzido pela radiação do laser, no qual forma um dipolo induzido amplificando a polarização da molécula. Já o aprimoramento químico pode ser detectado na monocamada das moléculas adsorvidas, podendo se manifestar de diferentes

maneiras, uma gerada devido a interação química entre a molécula e as nanoestruturas presentes, e outros mecanismos de transferência de carga da molécula adsorvida, na qual envolve transferência fotoinduzida de um elétron do nível Fermi do metal para um orbital molecular desocupado (JOHN; GEORGE, 2017; PERSSON; ZHAO. ZHANG, 2006; SUR, 2016).

O efeito de SERS tem sido explorado principalmente nas áreas químicas. Portanto, considerando as informações fornecidas no espectro vibracional, a técnica se destaca na detecção de vestígios, monitoramento ambiental, segurança ambiental, e na detecção bioquímica. Isso por conta da alta sensibilidade as técnicas que permite a obtenção de espectros de moléculas na concentração de 10^{-10} mol L⁻¹. (BIRKE; LOMBARDI; SANCHEZ, 1982). Ganhos ainda maiores podem ser obtidos nos espectros SERS quando a espécie interagindo com a superfície possui transição eletrônica com energia em ressonância com a radiação excitante utilizada. Neste caso, além do efeito SERS, ocorre a intensificação por RR e a este efeito denomina-se SERRS (espalhamento raman ressonante amplificado por superfície) (SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006).

2.2.4 Substrato SERS-Ativo

Em comparação com a espectroscopia Raman “tradicional”, a técnica SERS requer a presença de nanoestruturas metálicas como um componente integral. A utilidade prática de um substrato é definida por uma série de características: tipo mais adequado em cada caso específico, grupos funcionais e polímeros viáveis para associação com o metal visando melhorias nas propriedades, estabilidade, reprodutibilidade e propriedades ópticas (JANA; GANGULY; PAL, 2016).

Os substratos SERS podem ser divididos, basicamente, em três categorias: nanopartículas metálicas em suspensão, nanopartículas metálicas imobilizadas em substratos sólidos e nanoestruturas metálicas fabricadas diretamente em substratos sólidos (SUR, 2016).

As nanopartículas metálicas em suspensão são as mais simples de todos os substratos ativos SERS usados até agora, onde o efeito SERS pode ser estudado na presença de concentração definida de analitos (molécula sonda). Os metais selecionados para serem usados como substrato SERS podem ser determinados pela frequência de ressonância do plasmon. Prata (Ag), ouro (Au) e

cobre (Cu) são normalmente utilizados para a realização de experimentos SERS porque suas frequências de ressonância plasmônica estão na região do comprimento de onda do espectro eletromagnético, proporcionando aprimoramento máximo de sinal. Porém, desde o primeiro relato de um substrato sólido consistindo as nanopartículas, o processo se tornou popular e é encontrado em diferentes trabalhos (PIZARU; MAGDAS, 2018; WU *et al.* 2008).

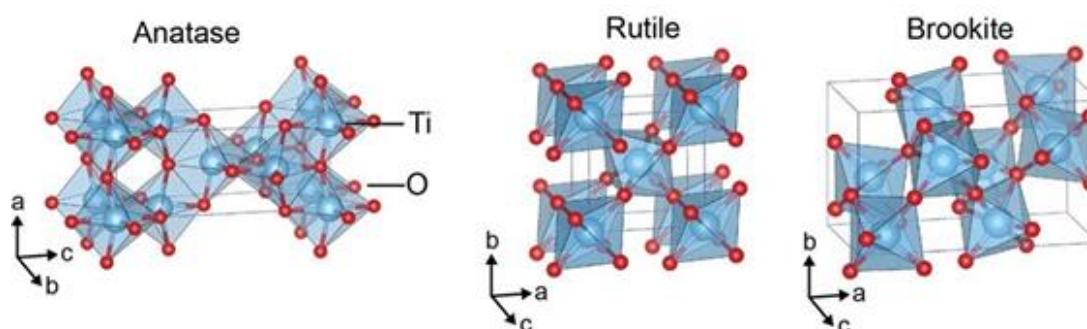
2.3 DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO₂)

O dióxido de titânio (TiO₂) é material semicondutor de banda larga, muito versátil, extremamente insolúvel, não volátil. Esse material acaba se tornando muito interessante, devido a sua capacidade de crescer estruturas porosas de óxido. É muito utilizado por possuir baixa toxicidade e baixo custo, além de ter uma boa estabilidade (GUPTA; TRIPATHI, 2010; BOWEN; STEVENS; ALLSOPP, 2007).

Essa estrutura foi relatada e identificada por Keller e colaboradores, em 1953. Conforme estudado, o TiO₂ podem ser encontradas em três formas cristalográficas distintas, sendo a brookita, a anatase e a rutilo. Embora sua composição seja a mesma, cada uma das fases apresentam um arranjo de átomos diferentes, formando diferentes estruturas cristalinas (Figura 5) (BAI *et al.*, 2014).

Tanto a fase anatase quanto a rutilo possuem uma estrutura cristalina tetragonal. A estrutura é composta pela distorção do octaedro do Ti-O, onde o temos o Ti como núcleo, circundado por 6 átomos de oxigênio por célula unitária. Mesmo possuindo a mesma estrutura, as fases se diferenciam, na distorção do octaedro, enquanto na estrutura do rutilo, os octaedros compartilham os lados, na anatase, eles compartilham os cantos. Já a estrutura cristalina da Brookita, em comparação com as demais é a única que possui uma estrutura cristalina ortorrômbica, onde célula unitária é composta por 8 unidades de fórmula de TiO₂ e é formada por octaedros de TiO₆ de borda compartilhada (ALBU, *et al.*, 2010; GUPTA; TRIPATHI, 2010).

Figura 5- Dióxido de titânio representado em seus três distintos polimorfos, Anatase, Rutilo e Brookita.



Fonte: Adaptada (WANG; LIN, 2009)

Enquanto a brookita é a menos comum das três estruturas, ela pode ser encontrada principalmente como um mineral natural. A fase rutilo e anatase, por outro lado, aparecem com mais frequência em materiais sintetizados em laboratório (WANG; LIN, 2009; BAI *et al.*, 2014).

Apesar de terem estruturas cristalinas semelhante, apresentam diferentes propriedades físicas. A fase rutilo é a estrutura termodinamicamente estável, pois possui a menor configuração de energia livre em condições padrão. Já a fase anatase e brookita são fase metaestáveis, obtidas em temperaturas próximas a 500 °C que se transformam exotermicamente e irreversivelmente para a fase rutilo, formada a partir de temperaturas superiores (SALEIRO; CARDOSO; TOLEDO; HOLANDA, 2010, KOWALSKI; KIM; SCHMUKI, 2013).

Essas diferenças nas estruturas cristalinas acarretam ainda diferentes estruturas eletrônicas, o que leva a atividades em reação fotocatalítica distinta, assim a fase anatase é a forma alotrópica na qual apresenta melhor atividade catalítica do TiO_2 (YU *et al.*, 2014; YUAN; SU, 2004).

2.3.1 Nanotubos de Dióxido de Titânio (TiO_2NTs)

O TiO_2 podem ser sintetizados em diferentes formas: nanopartículas, nanofios, os nanotubos, etc. (YU *et al.*, 2014). A descoberta dos nanotubos de dióxido de titânio (TiO_2NTs) foram recentes. Em 1999, ocorreu o primeiro relato mostrando a viabilidade de crescer matrizes altamente ordenadas por meio de uma anodização eletroquímica do titânio (ALBU *et al.*, 2010). E a partir disso, tem atraído atenção para

diferentes aplicações, como por exemplo, em dispositivos fotovoltaicos, e para fotocatalise (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011) Comparadas com as demais estruturas, os nanotubos são superiores, devido a estrutura apresentar uma auto-organização, boa estabilidade química e uma grande área superficial (HUANG; ZHANG; LAI, 2013). Isso ocasionam, um melhor desempenho e melhor eficiência nos processos químicos e fotoeletroquímicos, por conta da natureza da orientação vertical e a maior área superficial dos nanotubos (WANG; LIN, 2009; KOWALSKI; KIM; SCHMUKI, 2004).

A estrutura nanotubular fornece uma melhora nas propriedades eletrônicas do semicondutor, ajudando a separar os pares foto gerados e aumenta a área da superfície reativa, diminuindo a distância que os portadores de carga devem percorrer até o local reativo (MARQUES *et al.*, 2019; ABUDULLANH; KAMARUDIN, 2017).

2.3.2 Sínteses dos Nanotubos

Ao longo dos anos foram desenvolvidas diferentes sínteses de formação dessas nanoestruturas. Na literatura vários procedimentos podem ser encontrados, dentre eles, os mais usados são os métodos de sol-gel, o método hidrotérmico e o método por anodização (ALBU *et al.*, 2010; ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011).

O método sol-gel é baseado em reações de polimerização inorgânica que inclui quatro etapas, como a hidrólise, a policondensação, secagem e a decomposição térmica. O processo começa a partir de precursor que é misturado a um solvente para formar uma solução coloidal suspensa, que forma um gel após agitação contínua. Uma vez alcançada a suspensão desejada, as membranas poliméricas são imersas na solução. As partículas suspensas preenchem os poros e/ou canais dos moldes para adquirir suas formas (SEIXAS, *et al.*, 2018).

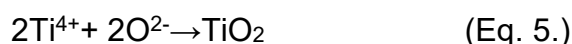
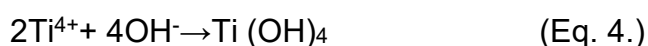
Já no processo hidrotérmico, uma nanoestrutura é sintetizada a partir de sais metálicos solúveis em água. Nesta metodologia, uma massa desejada do sal metálico é dissolvida na água e aquecida de 100 a 300 °C (sob pressão). Sua morfologia é controlada pelo material precursor, dependendo, também, de sua concentração, temperatura e tempo de processo (ROY; BERGER; SCHMUKI, 2011).

O processo de anodização consiste na formação de uma camada de óxido na superfície do titânio através da passagem de uma diferença de potencial, contido em uma solução aquosa. A reação ocorre em uma célula de dois eletrodos, na qual temos como ânodo o Titânio metálico (Ti). O processo fornece um alto grau de controle das propriedades físico-químicas dos nanotubos, conforme são ajustados os parâmetros do processo, como pH, química do eletrólito, voltagem aplicada (GONG et al., 2001; WANG; LIN, 2009).

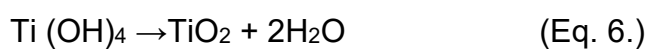
Cada processo possui sua própria vantagem e desvantagem, porém a anodização eletroquímica é fácil de executar e tem a liberdade de controlar os parâmetros do processo para atingir um conjunto desejado de propriedades (YUAN; SU, 2004; REGONINI *et al.*, 2013).

2.3.2.1 Síntese de Anodização Eletroquímica

A formação dos filmes de TiO₂NTs, se inicia a partir da oxidação metálica da superfície, liberando íons Ti⁴⁺ e elétrons (Eq. 3.) (JAROENWORALUCK *et al.*, 2007). Dessa forma, uma camada de óxido é depositada na superfície do metal por conta da interação química inicial dos íons Ti⁴⁺ liberados e os íons O₂⁻ e ⁻OH gerados pelas moléculas de água, contidas no eletrólito (Eq. 4 e 5):



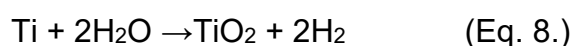
Posteriormente, acontece a reação de condensação do óxido hidratado:



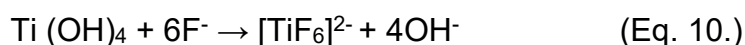
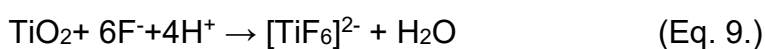
Além disso, há a geração de hidrogênio que ocorrem no cátodo:



Equação global do processo de formação do óxido é a seguinte (Eq. 8):



O ataque dos íons F^- a camada de óxido e do óxido hidratado, os quais se movimentam na camada anódica pela aplicação do campo elétrico, reagindo com os íons Ti^{4+} . A dissolução localizada do óxido cria pequenas cavidades (Eq. 9 e 10), formando centros, que formam poros distribuídos uniformemente sob toda a superfície. As espécies iônicas migram do eletrólito para interface do metal/óxido. (LIU *et al.*, 2012). Os íons Ti^{4+} migram do metal para interface óxido/eletrólito e se dissolvem no eletrólito (Eq.11):



Dente as rotas sintéticas para a obtenção dos TiO_2 NTs, a anodização eletroquímica na folha de titânio (Ti) se destaca, por ser um processo, reprodutivo e simples. Outra vantagem desse processo, está relacionada ao fato que alguns parâmetros podem ser controlados durante a anodização eletroquímica, conforme alteramos (temperatura, velocidade de rampa de potencial, potencial aplicado, espécies de eletrólitos, pH do eletrólito, viscosidade, água ou eletrólito orgânico). Isso pode gerar diferentes estruturas de dióxido titânio, como um óxido compacto plano, uma estrutura desordenada, uma camada porosa altamente auto-organizada, ou finalmente uma camada de nanotubos altamente auto-organizada. (HUANG; ZHANG; LAI, 2013; JAROENWORALUCK *et al.*, 2007)

A capacidade de aumentar matrizes de nanotubos diretamente em substratos de titânio, não apenas mostra a flexibilidade do processo de anodização eletroquímica, mas também demonstra a extensão de suas aplicações promissoras (RHO *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2019).

Os nanotubos TiO_2 obtidos diretamente após a anodização são amorfos e não fotoativos; portanto, é necessário transformar o nanotubos de TiO_2 amorfo em forma cristalina para uma ampla gama de aplicações. O tratamento térmico (i.e., calcinação) em alta temperatura tem sido considerado como uma rota eficaz para induzir a formação cristalina, convertendo-os no anatase ou fase rutilo, sem comprometer a morfologia tubular obtida na anodização (WANG; LIN, 2009, GONG *et al.*, 2001).

Mesmo com sua morfologia tubular, os materiais gerados pelo processo de anodização possuem fundos fechados e são anexados ao substrato de titânio, dessa maneira podem restringir as aplicações do nanotubos, por não serem opticamente transparentes sob iluminação (LIU *et al.*, 2012). A partir disso, nesse trabalho, buscou-se a proposta de desenvolver TiO₂NTs separados do substrato de titânio. A vantagens desses nanotubos independentes são devidos a sua microestrutura otimizada, transferência direta de elétrons, e por permitirem ser fixados diretamente a outros substratos. Com isso, foi utilizando uma proposta para o destacamento dos nanotubos das folhas de Ti adaptada do trabalho de Luan e Chang (2022), afim de aplicar em diferentes aplicações.

2.4 TiO₂NTs COMO SUBSTRATO DE SERS-ATIVO

A atividade SERS de um substrato ativo depende da morfologia da superfície, a qual confere sensibilidade suficiente para medir os espectros vibracionais das moléculas adsorvidas, seja de uma monocamada ou até menos (LIU *et al.*, 2018; ROGUSKA *et al.*, 2009).

Com isso, a maior tarefa para as medições SERS é o desenvolvimento de substratos que possuam superfície uniformes e forneçam aprimoramento de sinal em cada ponto de medição. Com o intuito de reduzir os limites de detecção alcançados pela técnica SERS, busca-se materiais alternativos que sejam SERS-ativos (LIU *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2016). Nesse sentido, se destacam-se as nanoestruturas de TiO₂, que possuem uma alta capacidade de adsorção e estabilidade química, disponibilidade e biocompatibilidade, propriedades que os tornam os substratos mais promissores para medições SERS em diferentes aplicações. Assim, em combinação com revestimentos de nanopartículas são de grande interesse, uma vez que permitem fornecer um fator de aprimoramento bastante alto, enquanto seu custo é muito mais barato em comparação com todos os substratos (LING *et al.*, 2016).

Neste sentido, as nanoestruturas de TiO₂NTs, podem proporcionar o aprimoramento do sinal SERS dependem da ressonância no acoplamento de luz e de múltiplos efeitos de dispersão de luz. Na dispersão da luz, os nanotubos fazem com que os fótons tenham um caminho óptico mais longo e tenham mais tempo para interagir com as nanopartículas, conseqüentemente melhorando o mecanismo de

transferência de carga, por conta do aumento das concentrações dos pares de elétrons/buraco (LIU *et al.*, 2018; ROBUSKA *et al.*, 2009).

No trabalho de Jing e colaboradores (2021), foi investigado as matrizes de TiO₂NTs decorados com nanopartículas de prata como substrato SERS, para identificação de produtos de degradação de antibióticos em leite. Os resultados foram eficazes, uma vez que se apresentaram rapidez, boa reprodutibilidade, além de demonstrarem uma relação linear ($R^2 = 0,992$) em relação a intensidade SERS e a concentração do antibiótico.

Assim como foi estudado no trabalho de Jafari e colaboradores (2022), foi desenvolvido um substrato SERS-ativo reutilizável composto de TiO₂NTs/Ag para detecção de vitamina B12. Os resultados mostraram ser um método de determinação altamente apropriado, mostrando uma sensibilidade de detecção tão baixo quanto $2,48 \times 10^{-8}$ M, alta reprodutibilidade, mesmo em diferentes pontos na superfície da sonda, com um desvio padrão relativo de 9,69%. A confiabilidade da utilização do substrato SERS-ativo foi confirmada pela detecção de vitamina B12 em amostras farmacêuticas reais.

Já no trabalho de Dou e colaboradores (2018), foi aplicado os TiO₂NTs decorados com nanopartículas de prata como substrato SERS, que se mostraram sensíveis para detecção *in situ* de vestígios de traço *Thiram* (fungicida usado para prevenir doenças fúngicas na agricultura) em água potável. Os limites de detecção obtidos foram de 1×10^{-9} mol L⁻¹ em água deionizada e 1×10^{-7} mol L⁻¹ em água corrente, respectivamente. Além disso, este substrato possui uma uniformidade de sinal, boa reprodutibilidade, alta seletividade e boa estabilidade.

A partir de tudo o que foi exposto, o presente trabalho propõe de desenvolver um substrato de TiO₂NTs autônomos decorados com nanopartículas de prata, que seja, SERS-ativo para identificação das antocianinas. Uma vez que, as nanoestruturas apresentam vantagens, porque geralmente fornecem mais pontos quentes de excitação de feixes de luz, gerando uma maior amplificação do efeito Raman, além de ser um substrato reutilizável devido a atividade fotocatalítica dos nanotubos. Além disso, o substrato é reciclável, podendo ser limpo com a incidência de luz, devido à capacidade fotocatalítica do TiO₂ e ao efeito de ressonância plasmônica de superfície (LIU *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetivou desenvolver um substrato SERS-ativo utilizando filmes de TiO₂NTs associados a soluções coloidais de nanopartícula de prata. Dessa forma, será avaliado o potencial do substrato como sensor SERRS para a identificação e quantificação das diferentes espécies de antocianinas presentes nos extratos obtidos da casca de uva.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar filmes de TiO₂NTs anodizados eletroquimicamente e “descolados” do substrato de titânio metálico, a partir de uma metodologia adaptada;
- Sintetizar nanopartículas de prata, para utilização como material amplificador do sinal SERS;
- Investigar o efeito do pH nos extratos de uva, utilizando a técnica UV-Vis;
- Explorar a presença das espécies de antocianina em equilíbrio no extrato de uva, utilizando a técnica SERS, avaliando o potencial dessas técnicas na quantificação dessas espécies;
- Desenvolver um substrato ativo-SERS utilizando o filme de TiO₂NTs decorados com nanopartículas de prata, para identificação de antocianinas nos extratos de uva.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 SÍNTESE DOS NANOTUBOS DE TiO₂

Os nanotubos de dióxido de titânio, (i.e., TiO₂NTs) foram produzidos a partir de uma metodologia adaptada de Luan e Chang (2022), na qual a síntese dos materiais foi obtida empregando uma célula de dois eletrodos: rutênio (Ru) e titânio (Ti), como cátodo e ânodo, respectivamente.

A síntese eletroquímica do TiO₂NTs foi realizada a partir de três etapas de anodização (usando uma fonte de alimentação à temperatura ambiente). A primeira etapa de anodização foi realizada a uma voltagem de 30 V por 24 horas, em solução eletrolítica de 0,5%, em peso, de NH₄F e 1,0%, em volume, de H₂O em etilenoglicol.

Após a primeira anodização, os filmes de TiO₂NTs foram colocados em banho ultrassônico para remover os arranjos irregulares formados e assim obter uma folha de Ti com uma superfície côncava. Na segunda anodização, foram aplicados 30 V por 24 horas, semelhante a primeira anodização. Feito isso, os eletrodos foram calcinados no mufla à 450 °C por 1 horas para conversão da fase amorfa na cristalina anatase. Depois de calcinados, os eletrodos foram submetidos a uma terceira etapa de anodização por 30 min sob as mesmas condições experimentais adotadas para a primeira anodização, a fim de crescer uma camada de nanotubos amorfa sob a camada cristalizada. O método empregado para auto destacamento das membranas (filmes finos) de TiO₂NTs foi o choque de tensão, reduzindo a adesão da camada de TiO₂NTs, crescida no substrato de titânio, o que facilita a remoção da membrana. Este efeito acontece devido à acidificação local, e à evolução dos gases que promovem o aumento da tensão interfacial. Subsequentemente, as amostras foram enxaguadas com água ultrapura (Milli-Q), e o destacamento gradual dos filmes foi realizado ao longo da secagem das amostras.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE TiO₂

4.2.1 Difractograma de Raios X

Os difratogramas foram realizados no Difratorômetro de Raio X PANanalytical modelo X'Pert PRO MPD, localizado no laboratório de Análises por Técnicas de Raios X (LARX), da Universidade Estadual de Londrina. Foram analisadas duas amostras de TiO₂ e uma do filme sobre o substrato de Titânio e outra a partir do filme destacado do substrato.

4.2.2 Espectroscopia de Reflectância Difusa

A análise de Reflectância Difusa do filme foi feita por espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2006. Estimou-se a energia entre bandas (*gap*) utilizando a extrapolação da região linear para $(\alpha h\nu)^{1/2} = 0$, calculada a partir da função de Kubelka-Munk (equação 12):

$$\alpha h\nu = A (h\nu - E_g)^{1/2} \quad (\text{Eq. 12})$$

onde α é o coeficiente de extinção, h é a constante de Planck (J s), ν é a frequência da luz incidente (s⁻¹), A é o constante de absorção, E_g é a energia de gap (eV) e n é o coeficiente de absorção, ao qual foi atribuído valor unitário.

4.3 SÍNTESE DA SOLUÇÃO COLOIDAL DE PRATA

A síntese da solução coloidal de prata foi preparada de acordo com o procedimento descrito em de Santana *et al.* (2006). Antes da síntese, toda a vidraria foi lavada com ácido nítrico (HNO₃/H₂O) na proporção 1:1 (v/v). Para o preparo, foram pesados \approx 90 mg de nitrato de prata (AgNO₃) e essa massa foi transferida para um erlenmeyer de 1 L, envolto em papel alumínio, contendo 500 mL de água tridestilada. A solução foi aquecida até a ebulição. Após atingir a ebulição, foi adicionado, gota-a-gota, sob vigorosa agitação, 10 mL de uma solução de citrato de sódio a 1%. Após a adição do citrato de sódio, a solução permaneceu ebulindo por 40 min. Logo após

esse período, ela foi retirada do aquecimento e a mesma mantida por 90 min com agitação contínua com o intuito de resfriá-la.

4.4 PREPARO DO EXTRATO DE UVA

O extrato de uva contendo o analito de interesse foi obtido a partir da casca da uva vermelha (GÓES *et al.*, 2023). Com esse propósito, as cascas foram separadas manualmente das sementes. Em seguida, 50 g de casca da fruta foram submetidas ao solvente extrator composto por 250 mL de solução hidroetanólica 50% (v/v) acidificada com HCl 0,1% (v/v) até o pH 2. Essa mistura foi mantida por 1h em agitação constante a 200 rpm, em temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi filtrado e armazenado na geladeira na temperatura de -1°C para não ocorrer a degradação das espécies presentes.

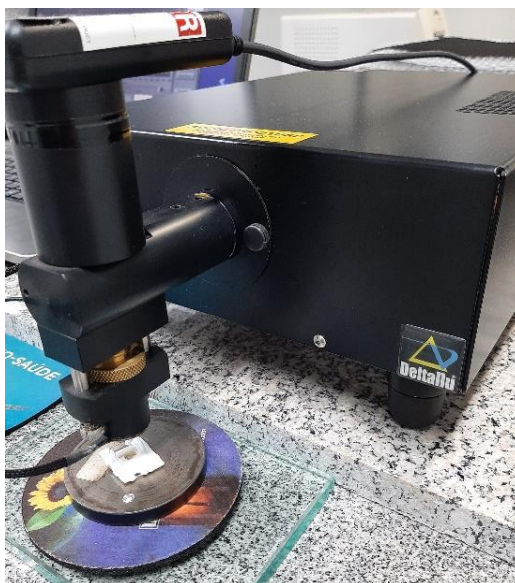
4.5 ANÁLISE UV-VIS DO EXTRATO DE UVA NOS DIFERENTES PH

As análises UV-Vis foram feitas no espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-2006, obtidas a partir das amostras concentradas do extrato de uva foram diluídas em água ultrapura (Milli-Q), na proporção 1:2 (v/v). A fim de obter os espectros em diferentes valores de pH, e assim identificar o perfil do extrato, os mesmos foram ajustados com NaOH 0,1 M, partido do pH inicial igual de 2 até o pH 10.

4.6 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Os espectros Raman foram obtidos usando um espectrômetro portátil DeltaNu Advantage532®, excitando a 532 nm com resolução de 8 cm^{-1} . O software DeltaNu NuSpec foi empregado com recursos de linha de base para remover a fluorescência de fundo, localizado no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC), da Universidade Estadual de Londrina. A espectroscopia Raman também foi usada para a caracterização dos filmes de TiO_2NTs .

Figura 6- Espectrômetro portátil utilizado nas medidas Raman



Fonte: A própria autora (2023).

4.6.1 Preparo de soluções para estudo RR e estudo SERS

4.6.1.1 Diluição do extrato de uva em solução coloidal de prata

Com a finalidade de estudar o efeito das nanopartículas de prata na intensificação dos espectros Raman, em função de diferentes concentrações de extrato de uva, foram preparadas diluições de 20, 15, 10, 5, 1, 0,5 e 0,1% do extrato em soluções coloidais de prata. Essas amostras líquidas foram preparadas em frascos de vidro de 1 mL de capacidade e os espectros foram obtidos imediatamente após esse preparo.

Figura 7- Diluições de 20, 15, 10, 5, 1, 0,5 e 0,1% do extrato em soluções coloidais de nanopartículas de prata, utilizados nas medidas Raman.



Fonte: A própria autora (2023).

Com o intuito de obter uma relação entre o percentual de diluição do extrato de casca de uva (em solução coloidal de nanopartículas de prata) e os sinais obtidos a partir da técnica SERRS, os espectros Raman foram deconvoluídos, empregando o método das Gaussianas (CERVANTES *et al.*, 2014). Todas as deconvoluções espectrais foram feitas a partir do programa Origin (8.0, 2007).

4.6.2 Curva Análítica do extrato de casca de uva diluída em solução coloidal de nanopartículas de prata sobre filmes de TiO₂NTs

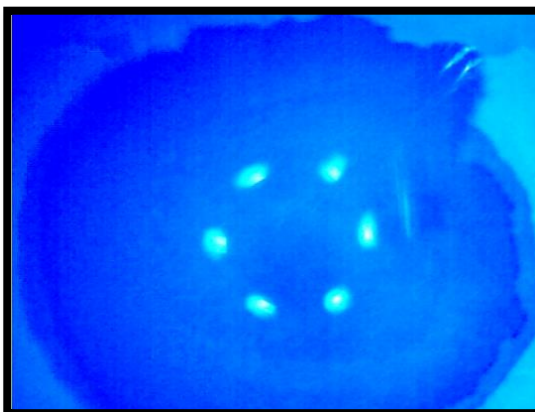
A curva analítica foi construída a partir de diferentes soluções depositadas sobre o TiO₂NTs, onde 50 µL de solução de extrato de casca de uva, diluída em diferentes concentrações (1, 0,75, 0,5, 0,25 e 0,1%), em soluções coloidais de nanopartículas de prata. Feito isso, as amostras foram secadas na estufa à 60 °C por 10 min e mais 50 µL solução coloidal de Ag foram depositados sobre o substrato, conforme demonstrado na Figura 8a. Assim, foram obtidos os respectivos espectros SERRS das amostras e, a partir deles, empregando o método das Gaussianas para a deconvoluções dos espectros (*vide* item 4.6.1.1), obteve-se a curva analítica.

Figura 8- TiO₂NTs colocados sobre uma superfície de vidro depositados 50 µL de solução de extrato de uva diluída a 1% em solução coloidal de prata (a) preparo das amostras na superfície do TiO₂NTs (b) imagem obtidas do espectrômetro portátil Raman, mostrando o escurecimento da região onde foi adicionado o extrato e do colóide de prata sobre o TiO₂NTs.

(a)



(b)



Fonte: A própria autora (2023).

4.6.3 Curva Análítica do extrato de casca de uva diluídos por análise UV-Vis

A curva analítica foi construída a partir de diferentes proporções de extrato de casca de uva (20, 15, 10, 5, 1, 0,75, 0,5, 0,25 e 0,1%) diluídas em água ultrapura (Milli-Q). Esses espectros foram obtidos imediatamente após o preparo das amostras.

4.6.4 Avaliação da degradação de antocianinas em função do tempo

A avaliação da degradação de antocianina foi realizada após condicionar 50 g de cascas de uva a temperatura ambiente ao abrigo de luz por 5 dias. Após esse período, as cascas das frutas foram submetidas ao solvente extrator composto por 250 mL de solução hidroetanólica 50% (v/v), e assim analisadas a partir de dois métodos diferentes (UV-Vis e SERRS) a fim de compará-los.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

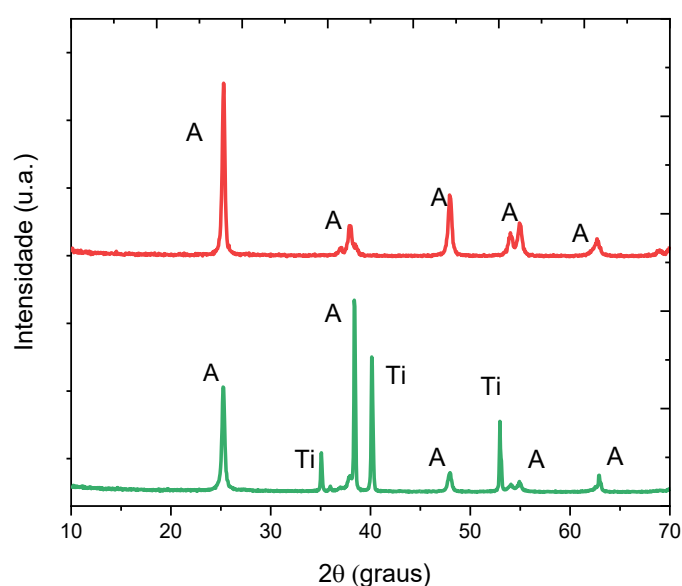
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOTUBOS DE TiO_2

Com o intuito de caracterizar os filmes de nanotubos de dióxido de titânio retirado da superfície do Titânio, foram realizadas análises de caracterização empregando difratometria de raios X (DRX) (Figura 9), a espectroscopia de Reflectância Difusa (DRS) (Figura 10), e da espectroscopia Raman (Figura 11).

5.1.1 Difratoograma de Raio X (DRX)

Na Figura 9 foram apresentado o difratogramas de raios X, os mesmos obtidos a fim de fornecer informações da sobre fase cristalina, encontrada nas amostras de filmes de TiO_2NTs após o processo de calcinação na mufla a $450\text{ }^\circ\text{C}$, por 1 hora. Em conjunto, também foi verificado se o processo de destacamento dos nanotubos, não alterou a cristalinidade do material.

Figura 9- Análise de Difração de raios X de amostras de filmes de TiO_2NTs retiradas da superfície do titânio (—) sobre a superfície do Titânio (—).



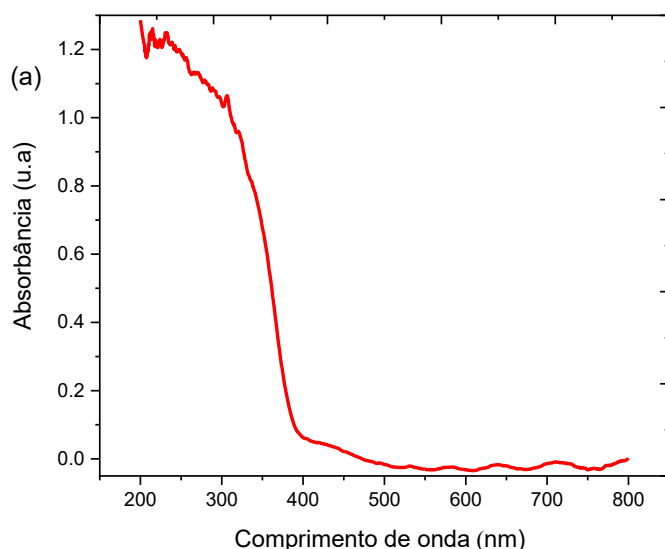
Fonte: A própria autora (2023).

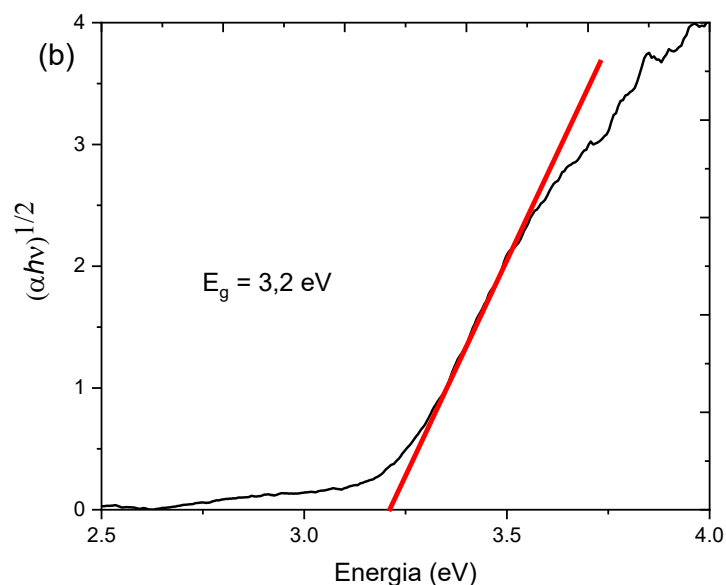
Na Figura 9, observa-se que o difratograma apresentou picos de difração de raios X localizados em 25,3, 37,9, 48,0, 54,9 e 62,8°. Esses valores foram muito próximos aos valores encontrados para as reflexões dos planos (101), (004), (200), (105), e (204) da fase anatase do TiO₂ (JCPDS número 21-1272) (SOTO et al, 2020; ALMEIDA; ZANONI, 2014). Dessa maneira, considerou-se que o tratamento térmico, 450 °C por 1 h, foi suficiente para converter o material da fase amorfa para a fase cristalina anatase. É importante destacar que o filme destacado do titânio metálico manteve as características de cristalinidades.

5.1.2 Espectroscopia de Reflectância Difusa (ERD)

Na Figura 10 foi determinado a energia *bandgap* da amostra de TiO₂NTs, foi obtido o espectro de reflectância difusa na região UV-Vis. A partir disso realizado os cálculos utilizando o método de Kubelka-Munk (ZHAO *et al.*, 2012), a qual proporcionaram um melhor ajuste dos dados de absorbância. Uma vez que a estimado os valores de *bandgap* do material, será mostrado a natureza da transição eletrônica do material.

Figura 10 - Análise de Reflectância Difusa na região UV-Vis da amostra de TiO₂NTs retiradas da superfície do titânio metálico referente ao (a) gráfico de absorbância em função do comprimento de onda (b) gráfico de $\alpha hv^{1/2}$ em função da energia calculada a partir da função de Kubelka-Munk.





Fonte: A própria autora (2023).

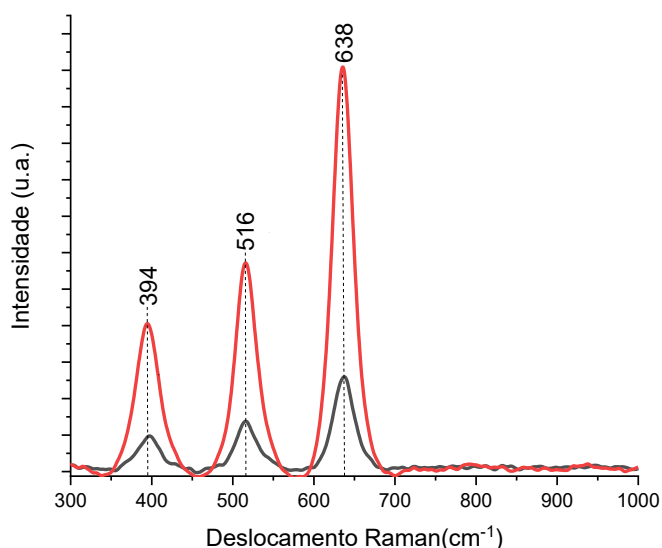
No espectro da Figura 10a, observam-se, uma forte absorção na região do UV, atribuída a transferência de carga entre as bandas de valência (orbital 2p do TiO₂) e condução (orbital 3d t_{2g} do Ti⁴⁺) dos TiO₂NTs (ALMEIDA; ZANONI, 2014; SOBANA; MURUGANADHAM; SWAMINATHAN, 2006). Na Figura 10b, foi demonstrado o cálculo da energia entre bandas (gap), estimada a partir da extrapolação da região linear para $(\alpha h\nu)^{1/2} = 0$, calculada a partir da função de Kubelka-Munk, mostrado na equação (12) (ZHAO *et al.*, 2012).

A partir do procedimento, foi possível obter um valor de 3,20 eV de *bandgap* para os filmes de TiO₂NTs. Esse valor foi muito próximo daquele encontrado por Almeida e Zanoni (2014), 3,21 eV, para a fase anatase de TiO₂NTs (empregando uma metodologia similar aquela utilizada no presente trabalho). Isso corrobora com os dados obtidos para DRX, na Figura 9, no qual demonstram a presença da fase cristalina anatase nos filmes de TiO₂NTs, mostrando que o tratamento realizado para retirar o filme de TiO₂NTs das placas de titânio não influenciou em sua forma cristalina.

5.1.3 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman, inicialmente, foi aplicada para compreender melhor a constituição dos materiais. Com o intuito de caracterizar os filmes de TiO₂NTs depositados em ITO (óxido de estanho dopado com Índio), denominados por TiO₂NTs/ITO, esses materiais também foram analisados empregando a espectroscopia Raman (Figura 11), para identificar alguma possível alteração na composição da amostra.

Figura 11- Análise Raman das amostras de TiO₂NTs sobre a superfície do ITO (—) sobre a superfície do titânio (—), ambos obtidos na região de 300 a 1000 cm⁻¹ ($\lambda_{\text{máx}} = 532 \text{ nm}$).



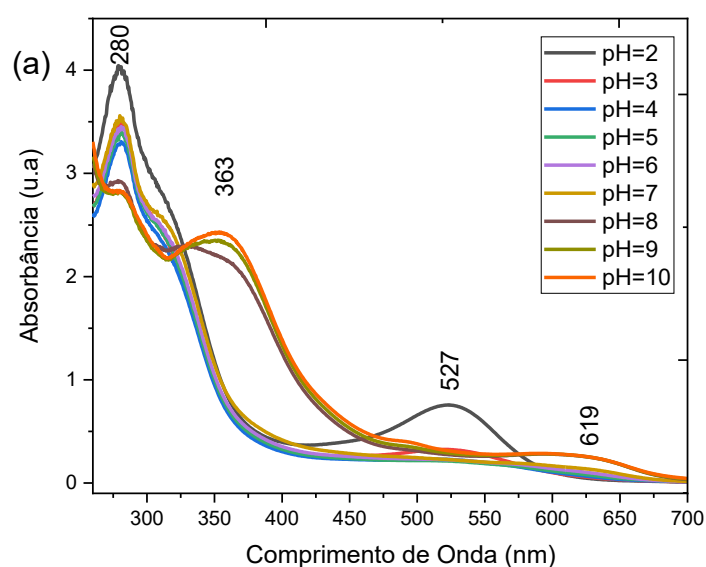
Fonte: A própria autora (2023).

A partir do espectro Raman, Figura 11, observa-se as três bandas características dos estiramentos de Ti-O das amostras de TiO₂NTs, referente a fase anatase, centradas em 395 cm⁻¹, 516 cm⁻¹, 638 cm⁻¹ atribuídas aos modos vibracionais, B_{1g}, (A_{1g}+B_{1g}) e E_g, respectivamente (RHO; SONG; LEE; JUN, 2017). Dessa forma, o espectro Raman e de reflectância difusa, corroboram com os dados obtidos das análises de raios X, onde verifica-se a formação da fase anatase para os filmes de TiO₂NTs.

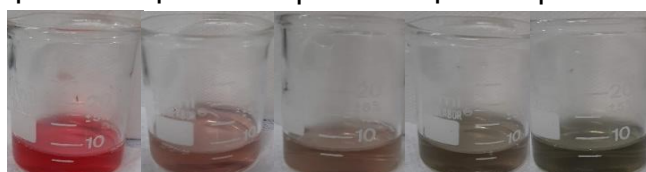
5.2 ANÁLISE DOS EXTRATOS DE CASCA DE UVA POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS

A maioria dos métodos espectrofotométricos empregados na quantificação de corantes naturais baseiam-se nas transformações estruturais sofridas pela estrutura química do pigmento de interesse em função de mudanças do pH do meio. Na Figura 12, foram obtidos os espectros UV-Vis desse na diluição 1:2 (v/v), em água, na região entre 250 e 700 nm, variando o pH de 2 a 10, com o intuito de explorar as características do extrato de casca de uva vermelha. A obtenção dos espectros UV-Vis em função do pH é uma ferramenta que auxilia nas análises das antocianinas, devido à diferentes perfis espectrais referentes a mudança do pH, favorecendo a predominância de diferentes estruturas em cada meio (BROUILLARD; LACOBUCCI; SWEENEY, 1982).

Figura 12 - Espectro eletrônico de absorção no UV-Vis de uma solução aquosa obtido pela diluição do corante de uva em diferentes pH (a) coloração das soluções após a alteração do pH do meio (b).



(b) pH=2-3 pH=4-5 pH=6-7 pH=8 pH=9-10



Fonte: A própria autora (2023).

Na Figura 12 a, em todos os espectros, foram verificadas bandas relacionadas à quatro espécies de antocianinas que se apresentam em equilíbrio: base quinoidal (A), cátion flavílio (AH^+), pseudobase carbinol (B) e chalcona (C), (vide Figura 2). A estabilidade dessas espécies depende de uma série de fatores como temperatura, concentração, luz, solventes, presença de enzimas, pH. Na Figura 12, observa-se que esse último fator foi necessário para identificar alterações significativas nas espécies presentes no extrato, gerando alterações sensíveis nos espectros de absorção do extrato de uva (ZAFFINO *et al.* 2015).

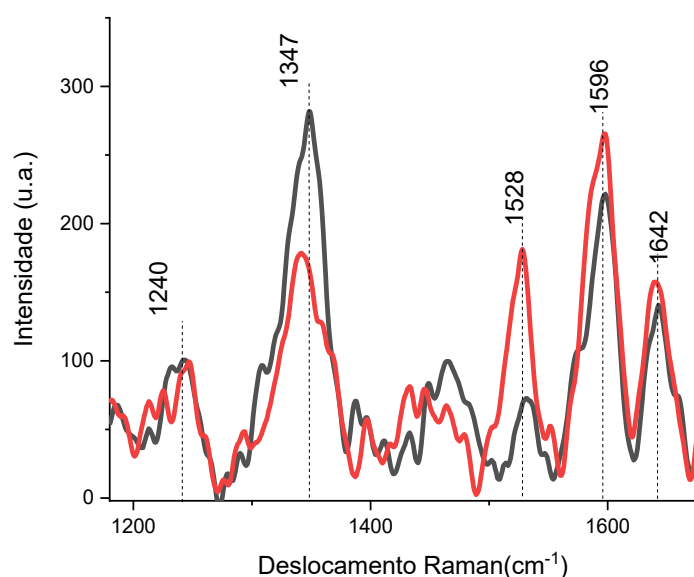
Em todos os espectros foi verificada uma banda centrada em torno de 280 nm, referente a pseudobase carbinol (B) (LEVI *et al.*, 2004). Por sua vez, com a elevação do pH, sobretudo entre 8 e 10, há o surgimento da banda centrada em torno de 360 nm, característica da base chalcona (C), e a elevação da intensidade da banda centrada em torno de 620 nm, característica da base quinoidal (A^-) (LEVI *et al.*, 2004; MARÇO *et al.*, 2008). Além dessas, nos espectros obtidos no pH 2, destaca-se a banda centrada em 527 nm. Essa, de acordo com Merlin *et al.* 1993, está relacionada a transição $\pi-\pi^*$ do cátion flavílio, de coloração avermelhada (em solução hidroalcolica).

Mesmo os espectros de absorção UV-Vis sendo uma ferramenta útil para a determinação das diferentes antocianinas, favorecido pela grande quantidade destas substâncias presentes no extrato da uva, a utilização desta técnica não permite afirmar a estrutura individual do pigmento que se almeja determinar no extrato obtido. Dessa forma, foi utilizado, inicialmente, a espectroscopia Raman ressonante (RR) para observar a estrutura do pigmento presente na amostra do extrato obtido em pH 2. Para isto, foi obtido o espectro excitando a amostra do extrato de uva com a radiação 532 nm, pelo fato da banda de absorção do cátion flavílio, presente no extrato, absorver em 527 nm. Assim, nessas condições de análise, espera-se determinar os modos vibracionais dessa espécie pelo efeito RR (devido à intensificação do sinal Raman deste grupo cromóforo).

5.3 ANÁLISE RAMAN RESSONANTE DO EXTRATO PURO E DILUÍDO EM ÁGUA

A fim de avaliar o efeito da diluição no extrato e quais mudanças causariam nos espectros, foram obtidos os espectros RR do extrato puro e do extrato diluído 50% em água destilada (Figura 13). Esses foram obtidos pois foi considerada a possibilidade em ocorrer a reabsorção da radiação excitante neste comprimento de onda na amostra mais concentrada.

Figura 13 - Espectro Raman Ressonante do extrato puro (—) e do extrato diluído 50% em água (—), ambos obtidos na região de 1150 a 1650 cm^{-1} ($\lambda_{\text{máx}} = 532 \text{ nm}$).



Fonte: A própria autora (2023).

Os espectros da Figura 13 demonstram os principais modos vibracionais para o extrato de uva na região de 1200 a 1650 cm^{-1} . Foram observadas as frequências em 1240 e 1347 cm^{-1} atribuídas aos modos ν_{COH} , ν_{CC} (entre anéis) + δ_{CH} , e as em 1528, 1596, 1642 cm^{-1} características do ν_{CC} (ZAFFINO *et al.*, 2015) dos anéis fenílico e benzopirílio. Todas essas frequências supracitadas são características da estrutura da antocianina em $\text{pH} < 4$ (BURNS *et al.*, 2013).

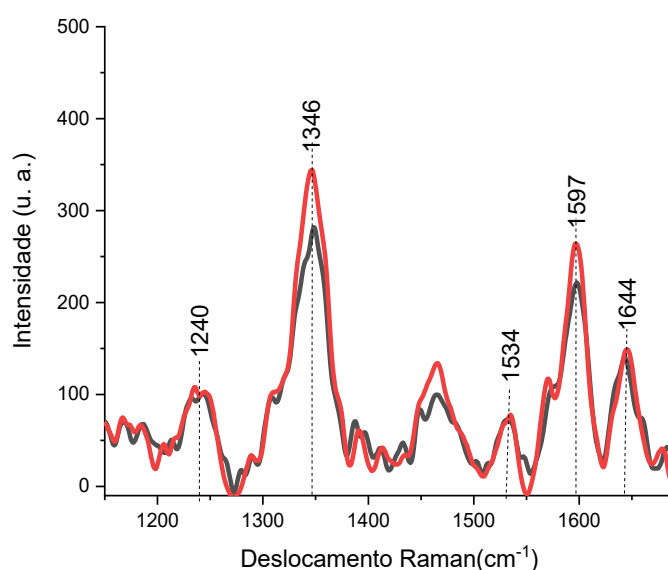
Foi observado que o espectro do corante diluído em 50% demonstrou pequenos deslocamentos batocrômicos (*red shift*) dos modos vibracionais relacionados a ν_{CC} dos anéis aromáticos. Isso está associado ao efeito do solvente

(água) que, possivelmente, interage com os grupamentos hidroxilas da molécula e reduz a repulsão eletrostática entre as próprias moléculas de antocianinas. Esse efeito foi mais sensível para o modo centrado em 1530 cm^{-1} . Dessa forma, este pode, além do $\nu_{\text{C-C}}$, estar associado ao modo δ_{COH} (CASTAÑEDA-OVANDO *et al.* 2009; ITO *et al.* 2002, MERLIN; STATOUA; BROUILLARD, 1985).

5.4 ANÁLISE DO EXTRATO SOBRE O SUBSTRATO DE TiO_2NTs

Com o intuito de avaliar a aplicabilidade de um substrato como um sensor para identificar as espécies de antocianinas presentes no extrato de uva, foi verificado o efeito de adsorção do mesmo sobre o filme de TiO_2NTs . Esses materiais nanoestruturados foram utilizados devido à sua elevada área superficial, que podem favorecer significativamente a adsorção das moléculas alvo devido a estrutura catiônica do TiO_2 no pH estudado (JAROENWORALUCK *et al.* 2007; YU *et al.* 2014). A partir disso, foi obtido os espectros RR do extrato de uva sobre o TiO_2NTs e do extrato puro (Figura 14).

Figura 14 - Espectro Raman Ressonante do corante puro (—) comparado com o espectro RR sob a superfície do nanotubos de TiO_2 (—), ambos obtidos na região de 1200 a 1650 cm^{-1} ($\lambda_{\text{máx}} = 532\text{ nm}$).

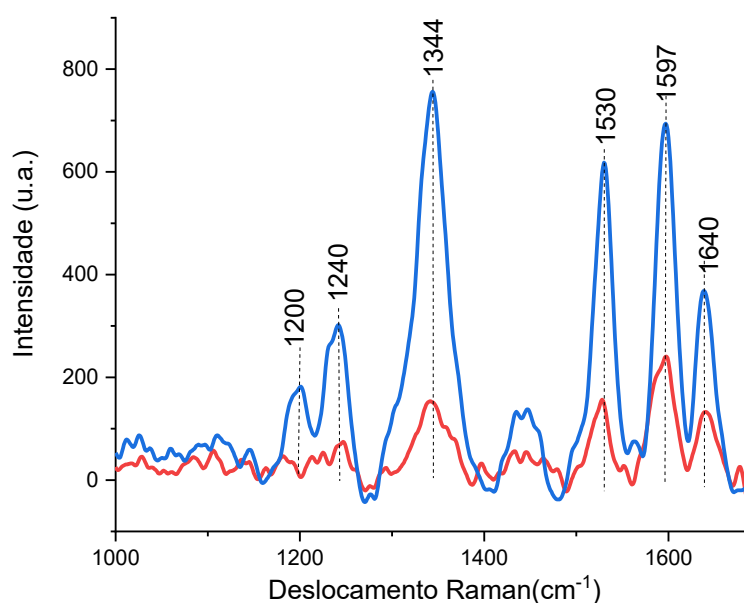


Fonte: A própria autora (2023).

Nos espectros da Figura 14, não foi possível observar deslocamentos significativos dos modos vibracionais do extrato de uva. Dessa forma, infere-se que apenas a deposição do extrato sobre o material nanoestruturado não gera interações significativas extrato/TiO₂.

Almejando favorecer o estudo de caracterização do extrato sobre o filme de TiO₂NTs pela técnica Raman, foram obtidos os espectros associando ao extrato adsorvido sobre o TiO₂NTs uma solução de nanopartículas de prata, com o objetivo de também viabilizar o efeito de intensificação Raman por superfície (SERS).

Figura 15 - Espectros Raman do extrato sobre a superfície do filme de TiO₂NTs/ITO (—), sobre a superfície TiO₂NTs/ITO com extrato e solução de nanopartículas de prata (—), obtidos na região de 1150 a 1700 cm⁻¹ na radiação excitante 532 nm.



Fonte: A própria autora (2023).

Na Figura 15 foi observado um espectro pouco intenso quando o extrato foi depositado sobre TiO₂ NTs/ITO. Entretanto, ao se adicionar à solução de nanopartículas de Ag sobre o substrato nanoestruturado contendo o extrato de uva, constatou-se um aumento significativo das bandas raman relacionados as frequências centradas em 1200, 1240, 1344, 1530, 1597, 1640 cm⁻¹. Comparando as Figuras 13 e 14, destaca-se, ainda, que a primeira banda citada, atribuída ao modo δ_{OH} , só foi

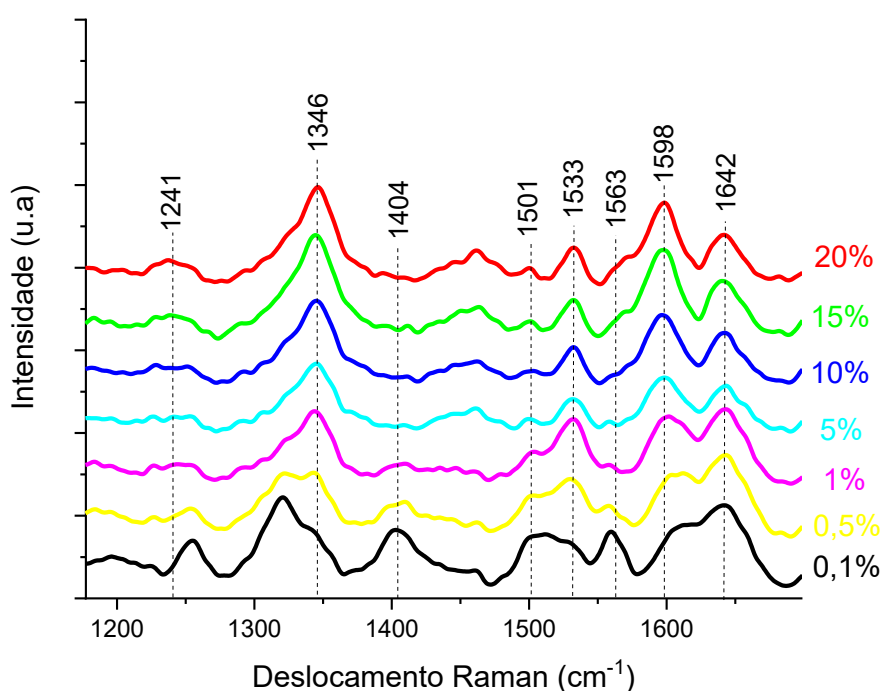
possível observar após a adição das nanopartículas de Ag (ZAFFINO et al., 2015).

Dessa forma, os resultados da Figura 15 demonstram a viabilidade de utilização do substrato nanoestruturado de TiO_2 recoberto com nanopartículas de prata para a caracterização do extrato de uva vermelha pelo efeito SERRS, que combinou o efeito de intensificação Raman ressonante (RR) com o efeito Raman intensificado pela superfície (SERS).

5.5 ANÁLISE DO EFEITO DO EXTRATO DILUÍDOS EM COLOIDE DE PRATA

Com o objetivo de verificar o efeito da interação do extrato com as nanopartículas de Ag, foram realizadas diferentes diluições dos extratos em soluções de nanopartículas de Ag e foram obtidos os espectros SERRS dessas diluições, como apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Espectros SERRS das diferentes diluições (0,1 a 20%) do extrato de uva em soluções de nanopartículas de Ag.



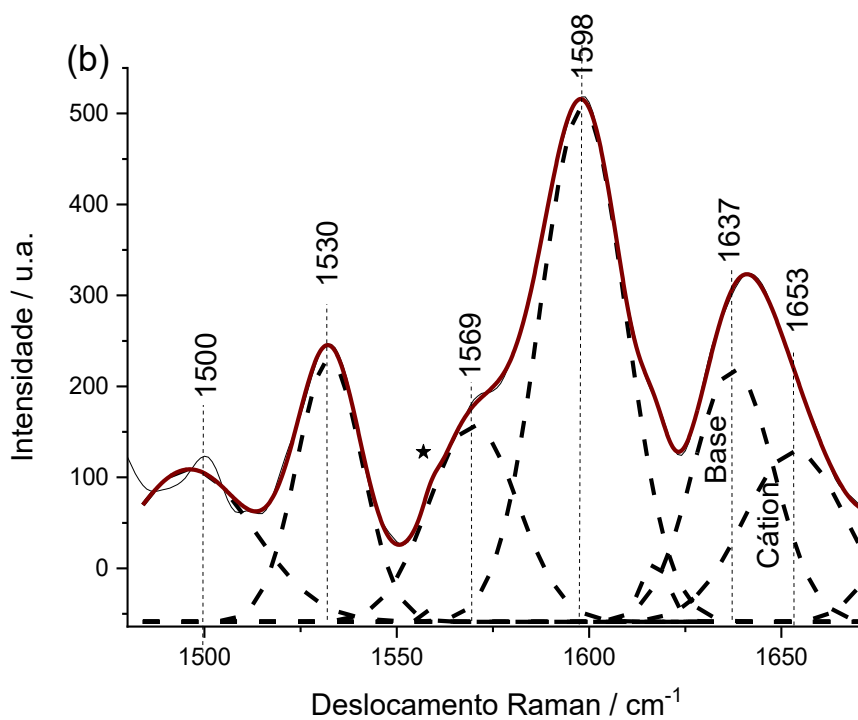
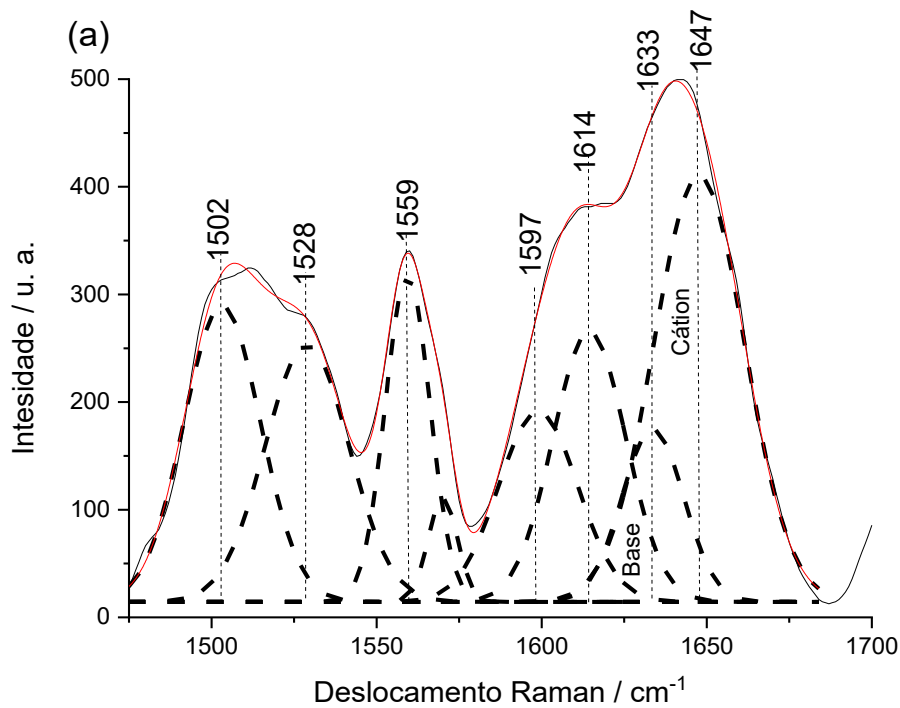
Fonte: A própria autora (2023).

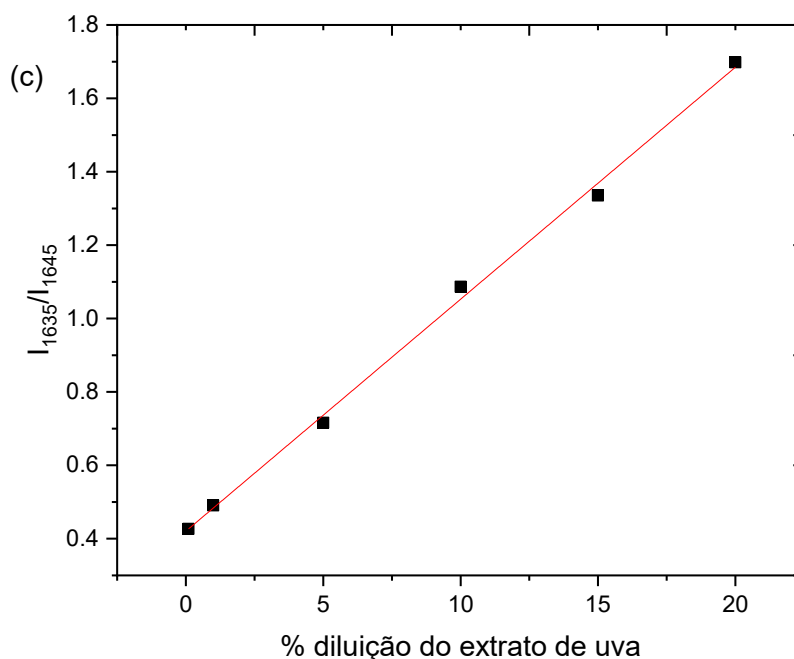
Na Figura 16, observou-se que, em todas as diluições do extrato, é possível verificar a intensificação dos sinais devido ao efeito SERRS dos coloides de prata (no comprimento de onda de excitação empregado, $\lambda_{\text{máx}} = 532 \text{ nm}$). Entretanto, além desse efeito, denota-se que em função da diluição, há uma significativa modificação nos espectros: aqueles obtidos nas diluições de 1 a 20% apresentam-se similares; os espectros obtidos em 0,5 e 0,1% são distintos.

Em função da diluição, as bandas centradas em 1241, 1346, 1533, 1598 cm^{-1} tiveram sua intensidade reduzida, enquanto as bandas em 1404, 1501, 1563, 1642 cm^{-1} aumentaram suas intensidades. Esse efeito provavelmente está associado a dois fatores: com a diluição, há uma alteração na intensidade do(s) modo(s) relacionado(s) ao cátion flavílio e de outras espécies de antocianina em equilíbrio. De acordo com Castañeda-Ovando *et al.* 2009, em $\text{pH} = 2$, além do cátion flavílio, há o aparecimento da base quinoidal (A^-) (*vide Figura 2*). Dessa forma, espera-se que modos vibracionais dessas duas espécies estejam presentes nos espectros SERRS. Além disso, outro fator que pode influenciar nas alterações dos espectros, seria a alteração nos sítios de interação antocianina/nanopartícula.

Com o intuito de verificar a presença de modos vibracionais das espécies de antocianina em equilíbrio no extrato de uva, em função da diluição do mesmo, em soluções de nanopartícula de Ag, obteve-se as deconvoluções dos espectros na região entre 1475 e 1700 cm^{-1} empregando o método das Gaussianas (CERVANTES *et al.*, 2014). Na Figura 17, são apresentadas as deconvoluções obtidas nas diluições a 20% e a 0,1% (as deconvoluções a 5, 10, e 15% estão disponíveis no Apêndice (A); a deconvolução a 1% encontra-se na Figura 17).

Figura 17 - Espectros deconvoluídos na região de 1475 a 1700 cm^{-1} para os extratos de uva diluídos em (a) 0,1% e (b) 20% em soluções de nanopartículas de Ag. (c) Razão das intensidades (I) das bandas referente a base quinoidal (1633 - 1637 cm^{-1}) e do cátion flavílio (1647 - 1653 cm^{-1}) *versus* % de diluição do extrato de uva.





Fonte: A própria autora (2023).

Na Figura 17, a partir das deconvoluções, foi possível identificar que as contribuições centradas em 1500, 1559, 1615 cm^{-1} , atribuídas aos modos $\nu_{\text{C-C}} + \delta_{\text{C-OH}}$, taninos condensados (em proantocianinas) deformação do anel benzopirílio (A e B) e $\nu_{\text{C-C}}$ reduziram sua intensidade ao se variar o percentual de extrato de uva de 0,1 (Figura 17a) para 20% (Figura 17b) (QU *et al.*, 2020; ZAFFINO *et al.* 2015; MENDONZA-WILSON; GLOSSMAN-MITNIK, 2004). Além disso, foram verificadas três contribuições centradas em 1598, 1633-1637 e 1647-1653 cm^{-1} , atribuídas a modos $\nu_{\text{C-C}}$. De acordo com Zaffino, Russo e Bruni (2015), as bandas em 1598 e 1647-1653 cm^{-1} estão relacionadas ao cátion flavílio e as bandas entre 1633-1637 cm^{-1} refere-se a base quinoidal. A contribuição centrada em 1647-1653 cm^{-1} apresentou-se extremamente sensível a quantidade de extrato de uva presente na solução de nanopartículas de Ag. A atribuição da banda em 1647-1652 cm^{-1} ao cátion flavílio foi realizada considerando as intensidades relativas observadas para as bandas 1598/1647-1653 cm^{-1} por Zaffino, Russo e Bruni (2015) em pH = 4 e pH= 7. Na primeira condição, onde há predominância do cátion flavílio, a banda em 1647-1653 cm^{-1} encontra-se mais intensa, enquanto na segunda condição, onde há escassez de cátion flavílio, a banda em 1598 cm^{-1} apresenta-se mais intensa.

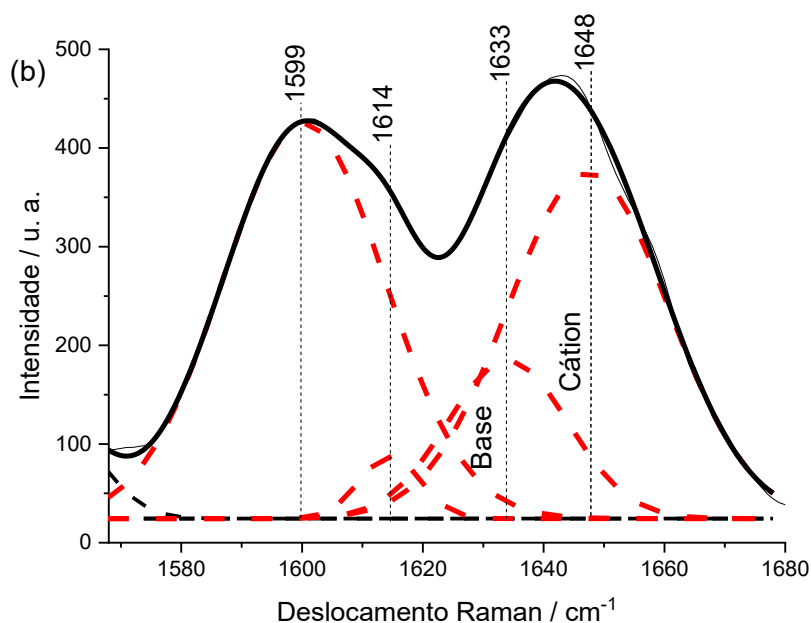
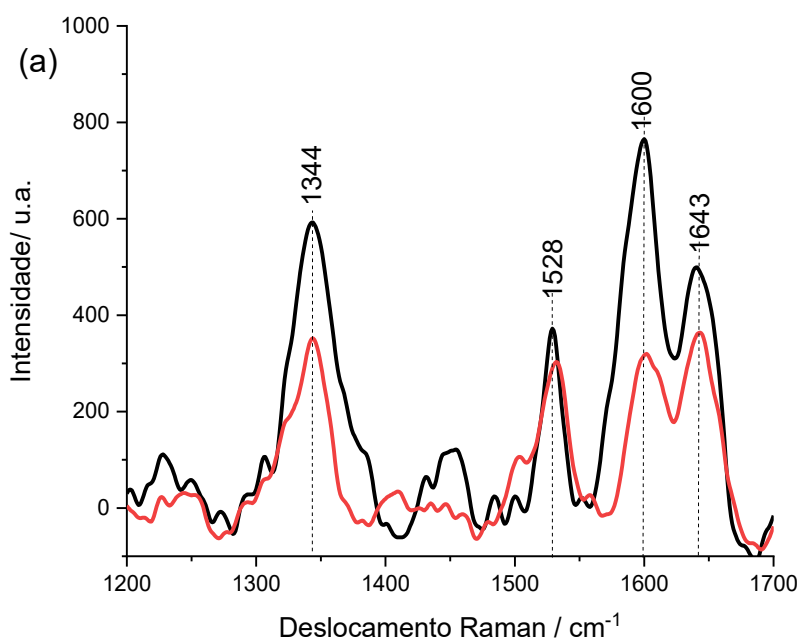
Por isso, com o intuito de avaliar a relação entre a quantidade de base quinoidal/cátion flavílio e o extrato de uva, construiu-se o gráfico da razão entre a intensidade da banda relacionada a base quinoidal ($1633-1637\text{ cm}^{-1}$) e aquela referente ao cátion flavílio ($1647-1653\text{ cm}^{-1}$) *versus* o percentual de diluição do extrato de uva (Figura 17c).

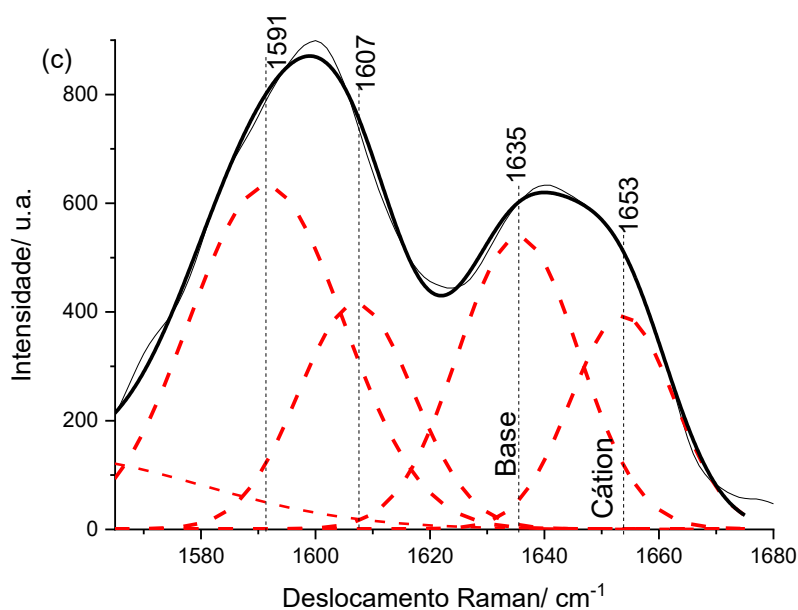
A partir da Figura 17c, percebe-se que a banda referente ao cátion flavílio, em aproximadamente $1647-1653\text{ cm}^{-1}$, é menos intensa com a diluição de 20% (em relação a diluição de 0,1%). Assim, infere-se que o sinal do cátion flavílio foi intensificado com a redução da quantidade de extrato de uva e o aumento de nanopartículas de Ag / quantidade de antocianinas. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que uma elevação, nas condições apresentadas, uma elevação de nanopartículas/molécula alvo favorece o efeito SERRS. Como a quantidade de extrato de uva apresentou relação linear ($R^2 = 0,997$) entre a razão das intensidades das bandas centradas em nos intervalos de $1633 - 1637\text{ cm}^{-1}$ e $1647 - 1653\text{ cm}^{-1}$ e o percentual de sua diluição, constata-se que seria possível aplicar as soluções de nanopartículas de Ag, sintetizadas nesse trabalho, para a confecção de um sensor capaz de detectar antocianinas (em especial o cátion flavílio).

5.6 ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DO EXTRATO DE CASCA DE UVA E AS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE AG SOBRE O SUBSTRATO DE TiO_2NTs

Por fim, com o intuito de verificar a diferença entre as interações do extrato de uva e as soluções de nanopartículas de Ag, obteve-se os espectros SERRS dos extratos de uva diluídos em 1% de soluções de nanopartículas de Ag depositados ou não sobre os filmes de TiO_2NTs (Figura 18). Os espectros da Figura 18 também foram deconvoluídos adotando o mesmo procedimento empregado nos espectros da Figura 17.

Figura 18 - Espectros SERRS do (a) extrato diluído a 1% em solução de nanopartículas de Ag (—); extrato diluído a 1% em solução de nanopartículas de Ag sobre a superfície do TiO₂NTs (—) obtidos na região de 1200 a 1700 cm⁻¹ na radiação excitante 532 nm. Os espectros deconvoluídos na região de 1560 a 1680 cm⁻¹ para o extrato de uva diluído a 1% em solução de nanopartícula de Ag obtidos em (b) líquido e (c) sobre o substrato de TiO₂NTs.





Fonte: A própria autora (2023).

Os espectros Raman da Figura 18a demonstraram diferenças significativas entre os espectros obtidos dos extratos na solução de nanopartícula de prata (líquido), linha vermelha, e os espectros obtidos após a deposição destes sobre os TiO₂NTs, linha preta, sobretudo na região entre 1560 e 1680 cm⁻¹. Isso indica que, ainda que os espectros da Figura 14 não tenham demonstrado significativas interações entre os filmes TiO₂NTs e os extratos de uva, ao se depositar os extratos de uva sobre os TiO₂NTs recoberto com a solução de nanopartículas de Ag, aumentasse as interações entre o extrato de uva e o substrato (filmes de TiO₂NTs). Ao se comparar os espectros da Figura 18b e 18c, referentes ao extrato de uva diluído em 1% de solução de nanopartículas de Ag (líquido) e o extratos de uva diluídos em 1% de solução de nanopartículas de Ag depositados sobre a superfície dos nanotubos de TiO₂, respectivamente, há um deslocamento nas contribuições centradas em 1599 e 1614 cm⁻¹ para 1591 e 1607 cm⁻¹, devido possivelmente, a uma adsorção preferencial nesses grupos (C=C). Como a banda em 1599-1591 cm⁻¹ refere-se ao cátion flavílio, pode-se inferir que o mesmo, nas condições apresentadas, encontra-se adsorvido ao substrato. Além disso, a banda em 1633-1635 cm⁻¹, referente a base quinoidal, demonstrou maior intensidade em relação a banda em 1648-1653 cm⁻¹, referente ao cátion flavílio.

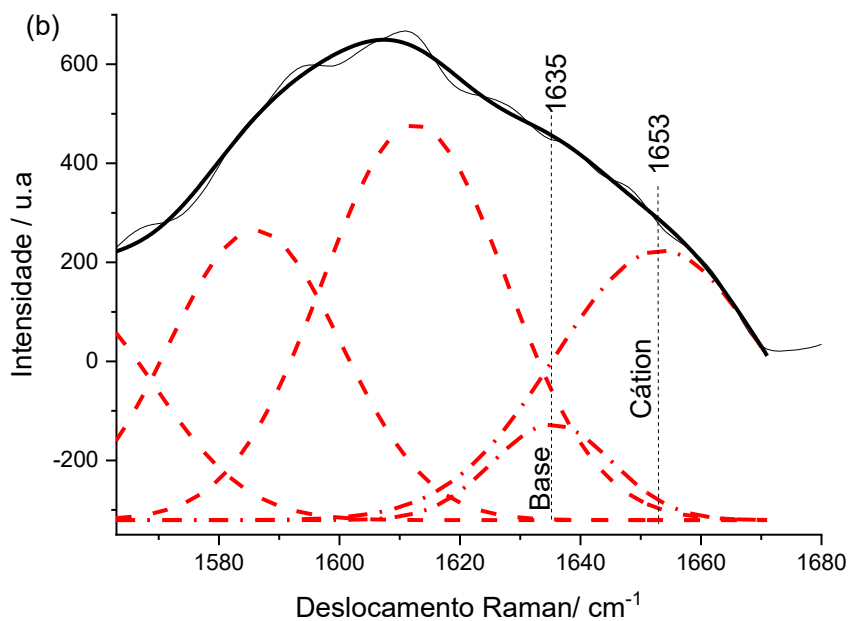
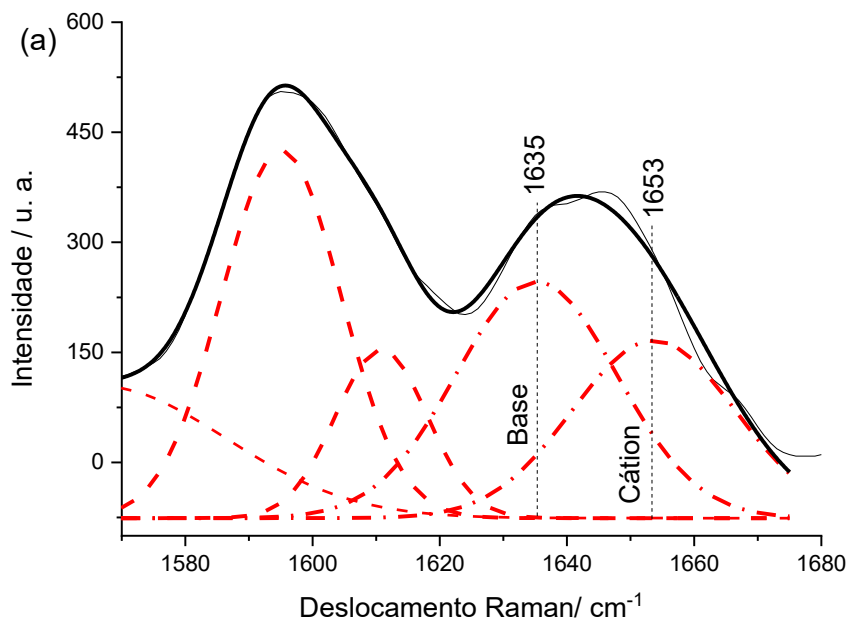
Dessa forma, percebe-se que, diferentemente do que foi verificado para a solução de nanopartícula de Ag (Figura 18b), o sinal referente à base quinoidal (A^-), nos espectros obtidos sobre o filme de TiO_2NTs (Figura 18c), foi mais intenso que o cátion flavílio (AH^+) (mesmo em baixos percentuais de diluição do extrato, ou seja, 1%). Esse fato pode ser corroborado pelo deslocamento do modo centrado em 1344 cm^{-1} , relacionado ao estiramento $C=C$ entre anéis (que é sensível a variação do pH, ou seja, das espécies AH^+ e A^-).

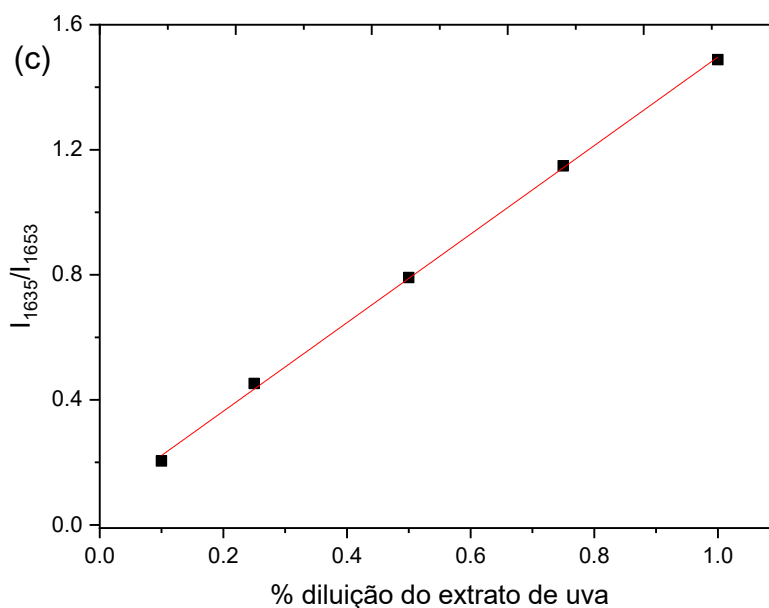
Uma possível explicação para essa intensificação no sinal da base quinoidal (A^-), em detrimento ao cátion flavílio (AH^+), está relacionado ao fato do pH no ponto de carga zero (pH_{pcz}) da fase anatase na superfície do filme de TiO_2NTs ser de aproximadamente 6,1 (ZENG, 2012). Como o pH da solução encontra-se menor que o pH_{pcz} , a superfície dos nanotubos encontra-se carregada positivamente (na forma $TiOH_2^+$). Dessa forma, há uma repulsão eletrostática entre o AH^+ e o TiO_2NTs . Esse efeito repulsivo não ocorreria entre os nanotubos e a A^- , o que justificaria a adsorção preferencial dessa última espécie.

5.7 CURVA ANALÍTICA DO EXTRATO DE CASCA DE UVA COM AS SOLUÇÕES DE NANOPARTÍCULAS DE AG SOBRE O SUBSTRATO DE TiO_2NTs

Para viabilizar uma possível utilização do sensor desenvolvido a partir do substrato de TiO_2NTs em conjunto com as nanopartículas de Ag, foi obtida uma curva analítica para identificar se há linearidade na faixa de trabalho de interesse, em função da intensidade das bandas da base quinoidal e do cátion flavílio. Com isso, foram feitas diluições de 1% a 0,1%, sobre os filmes de TiO_2NTs .

Figura 19 - Espectros deconvoluídos na região de 1560 a 1680 cm^{-1} para os extratos de uva diluídos em (a) 1% e (b) 0,1% em soluções de nanopartículas de Ag. (c) Razão das intensidades (I) das bandas referente a base quinoidal (1635 cm^{-1}) e do cátion flavílio (1653 cm^{-1}) *versus* % de diluição do extrato de uva.

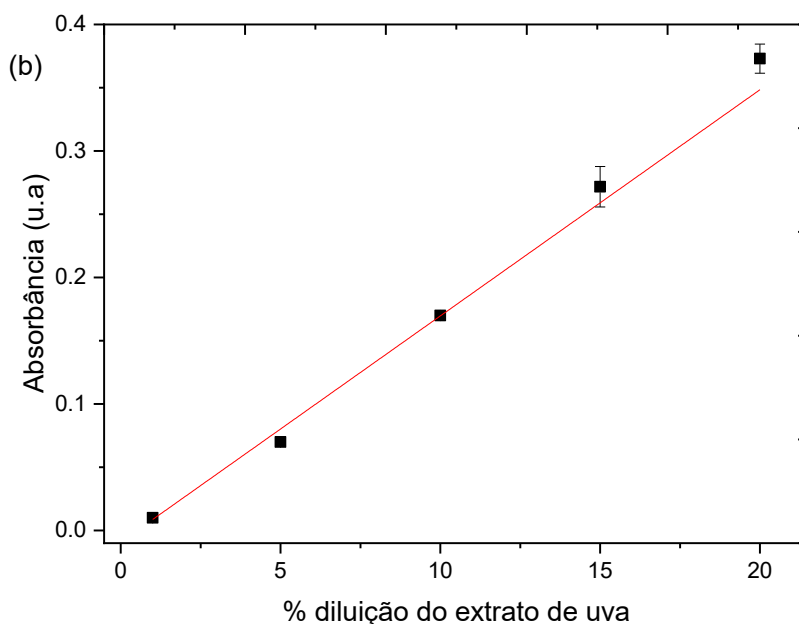




Fonte: A própria autora (2023).

Os espectros Raman deconvoluídos na Figura 19a e na Figura 19b demonstram, respectivamente, as bandas referentes ao cátion flavílio e a base quinoidal para as diluições de 1% e 0,1% (as deconvoluções a 0,75, 0,5, e 0,25% estão disponíveis no Apêndice B). Com o aumento da diluição, semelhante ao resultado observado na Figura 17a, há um predomínio do modo vibracional relacionado ao cátion flavílio (que se torna mais intenso que a base quinoidal). Portanto, ainda que ocorra uma adsorção preferencial de A^- em diluições até 1%, o aumento das nanopartículas de prata, em detrimento da quantidade de corante, provoca a intensificação do efeito SERRS, denotados nos espectros a 0,1%.

A partir da relação entre a intensidade da banda relacionada à base quinoidal (A^-) e o cátion flavílio (AH^+) e o percentual de diluição do corante obtido a partir do extrato de casca uva foi possível construir uma curva analítica. Com a obtenção de um modelo de regressão linear foi construída a equação da reta e o valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,999$), mostrando que os dados se ajustam de forma satisfatória ao modelo linear. Importante destacar que o limite do sensor é o percentual de 0,1% antocianinas. Para percentuais inferiores, a incerteza na medida impossibilita a quantificação, à medida que os espectros ficam bastante ruidosos. De modo que para valores superiores a 1%, as medidas apresentam sobrepostas devido à fluorescência de fundo.



Fonte: A própria autora (2023).

Os espectros de absorbância do extrato de casca de uva (Figura 20a) demonstraram máxima de absorção em 523 nm, referente a banda a transição $\pi-\pi^*$ do cátion flavílio (Merlin *et al.* 1994). A partir disso, foi possível obter a construção da curva e um modelo de regressão linear (Figura 20b). Com isso, foi obtido a equação da reta e o valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,997$), sendo possível avaliar que os dados se ajustam de forma satisfatória ao modelo linear, obtida pela relação entre o percentual de diluição do extrato de uva e a área de cada banda de absorbância. Porém, foi desconsiderado os percentuais das menores diluições (0,1% a 0,75%) para a construção da curva analítica, pois não foi possível determinar com precisão os resultados obtidos, de forma que os máximos de absorção se mostraram pouco intensas nessas diluições.

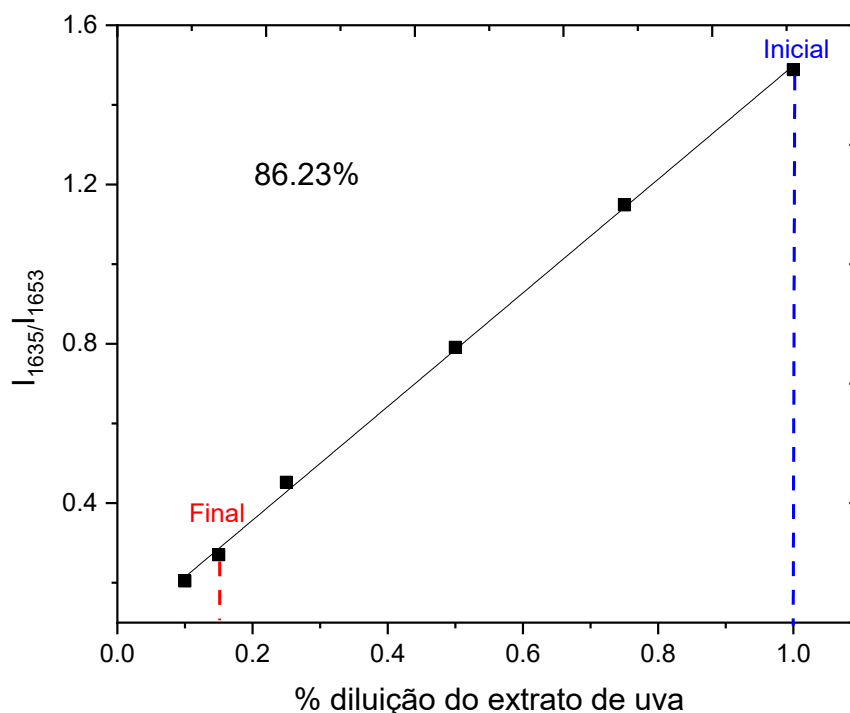
Dessa forma, foi possível inferir que a espectrofotometria UV-Vis se mostra uma técnica eficiente para a determinação de antocianinas em extratos de uva em amostras concentradas (1 a 20%), ao passo que nos sensores de TiO₂NTs decorados com as nanopartículas de Ag, foram possíveis a determinação em amostras mais diluídas (de 1 a 0,1%). Além disso, a técnica SERRS permite não apenas a quantificação, mas, a determinação e identificação das espécies de antocianinas presentes nas amostras.

5.9 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE ANTOCIANINA NO EXTRATO DA CASCA DE UVA APÓS 5 DIAS

Para estabelecer uma relação direta entre variação da concentração do extrato de uva com o tempo e viabilizar o uso do sensor, foram feitas análises após 5 dias da exposição das amostras ao ambiente não refrigerado e ao abrigo de luz. E a partir disso foram feitas as análises de UV-Vis e SERS, e avaliado se os dois métodos conseguem identificar/quantificar o percentual de diluição do extrato passado os 5 dias.

A partir da curva analítica obtida por SERRS da relação de intensidade da banda da base quinoidal/ cátion flavílio em função do percentual de diluição (item 5.7), foi obtido um gráfico para comparar o percentual de degradação do extrato de uva após os 5 dias, utilizando a diluição de 1% para a análise (Figura 21).

Figura 21 - Percentual de degradação do teor de antocianinas após o período de 5 dias, a partir da diluição de 1% do extrato em solução coloidal de prata sobre o filme de TiO₂NTs, obtidos empregando a técnica SERRS.

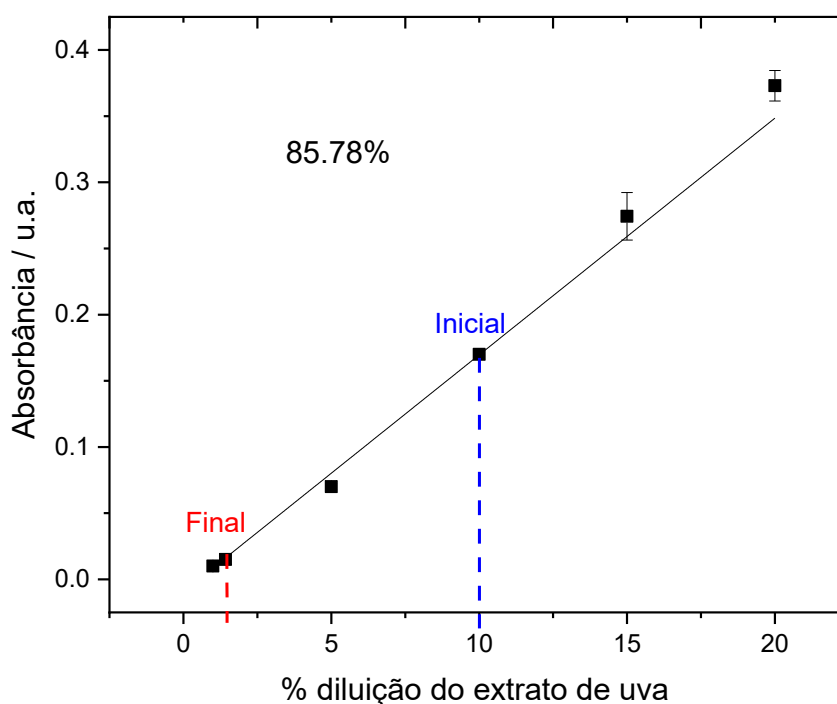


Fonte: A própria autora (2023).

Os resultados apresentados na Figura 21, mostram que houve degradação após os 5 dias e dessa forma foi possível quantificar o percentual de diluição, que se encontra dentro da curva analítica. Tendo que, inicialmente as amostras de 1% tinham uma relação de intensidade de 1,48, e após os 5 dias, a amostra de 1% diminui para 0,15%, tendo uma relação de intensidade de 0,27 (deconvolução apresentada no APÉNDICE C). Isso indica que o percentual de degradação do teor de antocianina após o período de 5 dias da exposição a ambiente não refrigerado e ao abrigo de luz foi de um percentual igual a 86,23%.

A fim de uma comparação dos métodos empregados, foram feitas as mesmas análises, utilizando o UV-Vis. Com a curva analítica obtida (item 5.8), foi possível a determinação percentual de degradação do extrato de uva após os 5 dias, utilizando a diluição de 10% (Figura 22).

Figura 22 – Percentual de degradação do teor de antocianinas após o período de 5 dias, a partir da diluição de 10% do extrato em água, empregando a técnica de espectrofotometria UV-Vis.



Fonte: A própria autora (2023).

O gráfico obtido na Figura 22, evidencia que após o período de 5 dias expostas a ambiente não refrigerado e ao abrigo de luz ocorreu a degradação das antocianinas. Visto que, após o período, a amostra que era de 10%, com uma absorvância de 0,17, diminuiu para 1,4% com uma absorvância de 0,015, obtendo uma degradação de 85,78% comparado com o valor inicial.

Diante do exposto, podemos concluir que ambos os métodos apresentaram percentuais de degradação semelhantes, comprovando a exatidão da técnica SERRS. Ao fato que, a técnica SERRS utilizando o sensor de TiO_2NTs em conjunto com as nanopartículas de prata como substrato, apresentou maior sensibilidade para a quantificação/ identificação de antocianinas no extrato de uva.

6 CONCLUSÃO

As análises de caracterização dos TiO₂NTs demonstraram a presença da fase anatase do dióxido de titânio, confirmando que o método de preparação e o tratamento térmico, de 450 °C por 1 h, foram eficazes para obtenção da fase cristalina de interesse. Também foi possível identificar, que o método de destacamento dos TiO₂NTs do substrato de titânio, não afetaram a fase cristalina do material. A partir das análises Raman, conseguimos mostrar que diferentes substratos não alteram os modos vibracionais do titânio, apenas diminuem a intensidade do sinal, após a fixação do TiO₂NTs no substrato de ITO.

As propriedades do extrato de uva foram investigadas a fim de observar características espectrais que ocorrem devido à mudança de pH, por espectroscopia de absorção UV-Vis. Nas bandas de absorção obtidos a pH 2, destaca-se a banda centrada em 527 nm relacionada a transição $\pi-\pi^*$ do cátion flavílio. Essa banda diminuiu a intensidade com o aumento do pH. Conforme era previsto, também foi verificado em pH alcalinos (8 a 10), o aumento da base quinoidal e da chalcona.

Os espectros Raman obtidos dos extratos de uva sobre os filmes de TiO₂NTs apenas demonstraram uma intensificação dos modos vibracionais das antocianinas com a presença das nanopartículas de prata. Apesar dos nanotubos não demonstrarem efeito de amplificação do sinal sem a presença das nanopartículas metálicas, as nanoestruturas recobertas com soluções coloidais de prata influenciaram na estabilização das espécies de antocianinas presentes. Na ausência dos nanotubos há uma predominância do cátion flavílio e, na sua presença, há um aumento da quantidade de base quinoidal.

Além disso, os resultados demonstraram que, em todas as diluições do extrato nas soluções coloidais de prata, há intensificação dos sinais devido ao efeito SERRS. Também foi verificado, a partir da deconvolução dos espectros das diferentes diluições empregando o método dos Gaussianas, que o sinal do cátion flavílio foi intensificado com a redução da quantidade de extrato de uva e o aumento de nanopartículas de Ag / quantidade de antocianinas. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que, nas condições apresentadas, o aumento de nanopartículas/molécula alvo favorece o efeito SERRS. Outro fator determinante está relacionado com o ponto de carga zero, como o pH da solução encontra-se menor que

o pH_{pcz} , a superfície dos nanotubos encontra-se carregada positivamente (na forma TiOH_2^+), gerando uma repulsão eletrostática entre o AH^+ e o TiO_2NTs . Esse efeito repulsivo não ocorreria entre os nanotubos e a A^- , dessa forma justifica a adsorção preferencial dessa espécie.

Ademais, também foi observado que há uma relação linear entre a intensidade da banda do cátion flavílio ($1647\text{-}1653\text{ cm}^{-1}$) / base quinoidal ($1633\text{ - }1637\text{ cm}^{-1}$) e o percentual de diluição do extrato de uva. Com isso foi obtido um modelo de regressão linear, com um coeficiente de determinação ($R^2= 0,999$), mostrando que os dados se ajustam de forma satisfatória ao modelo linear. Os resultados mostraram que o limite do sensor é o percentual de 0,1% de diluição do extrato, para valores mais baixos que isso, à medida que os espectros ficam bastante ruidosos. De modo que para valores superiores a 1%, as medidas apresentam sobrepostas devido à fluorescência de fundo.

Cabe destacar, ainda, que a técnica SERRS foi comparada a uma metodologia padrão, a técnica UV-Vis. Nessa última, foi possível identificar, com exatidão, apenas as concentrações mais elevadas do extrato, o que mostrou que o sensor SERRS de TiO_2NTs recobertos de nanopartículas de prata se apresentou mais sensível que a técnica clássica. Além disso, a partir da avaliação da degradação da amostra de 5 dias, condicionada em ambiente não refrigerado e ao abrigo de luz, as técnicas UV-Vis e SERRS apresentaram percentuais de degradação semelhantes (aproximadamente 86%), comprovando a exatidão da técnica SERRS.

Mesmo não conseguindo avaliar concentrações superiores a 1%, considerando concentrações semelhantes, o sensor se mostrou mais sensíveis a base quinoidal do que a dispersão apenas no líquido. Isso permitiria, em trabalhos futuros, avaliar a influência do pH.

A partir dos resultados apresentados, denotou-se o potencial de aplicação dos filmes de TiO_2NTs recobertos pelas nanopartículas de prata como um sensor SERRS capaz de avaliar o teor de antocianinas em cascas de uva e identificar/determinar as variações das quantidades dessas espécies presentes em função da diluição do extrato a partir de uma metodologia simples, barata e rápida.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M.; KAMARUDIN, S. K. Titanium dioxide nanotubes (TNT) in energy and environmental applications: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 212–225, 2017.
- ALBU, S. P. et al. Self-organized TiO₂ Nanotube Arrays: Critical Effects on Morphology and Growth. **Israel Journal of Chemistry**, v. 49, p. 453–467, 2010.
- ALECU, G. C. et al. Characterization of Red Grapes Skin Extracts Using Vibrational Spectroscopy and Chemometrics. **Journal of Science and Arts**, n. 2, p. 475- 490, 2020.
- ALMEIDA, L. C., ZANONI, M. V. Decoration of Ti/TiO₂ nanotubes with Pt nanoparticles for enhanced UV-Vis light absorption in photoelectrocatalytic process. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 25, p. 579-588, 2014.
- ANDREEVA, V. Identification of red grape varieties by anthocyanin profile. **BIO Web of Conferences**, v. 25, p. 02020, 2020.
- ARRUDA, M. R. E. *et al.* Avaliação de extratos de antocianinas como indicadores de pH obtidos por diferentes métodos. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 10, n. 3, p. 87–100, 2019.
- BAI, J.; ZHOU, B. Titanium dioxide nanomaterials for sensor applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 19, p. 10131–10176, 2014.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3° ed. São Paulo: VARELA, 1992.
- BOWEN, C. R.; STEVENS, R.; ALLSOPP, D. Macro, micro and nanostructure of TiO₂ anodised films prepared in a fluorine-containing electrolyte. **J Mater Sci**, p. 6729–6734, 2007.
- BIRKE, R. L.; LOMBARDI, J. R.; SANCHEZ, L. A. Surface Enhanced Raman Spectroscopy. In: **Electrochemical and Spectrochemical Studies of Biological Redox Components**. 1° ed. Washington: American Chemistry Society, 1982. p. 69–107.
- BROUILLARD, R.; IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G. Chemistry of anthocyanin pigments. 9. UV-Visible spectrophotometric determination of the acidity constants of apigeninidin and three related 3-deoxyflavylium salts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 26, p. 7585-7590, 1982.
- BURNS, A. E.; MAZAURIC, J. P.; CHEYNIER, V. Resonance Raman study on the pH dependence on grape anthocyanins. **ACS Symposium Series**, v. 1138, p. 127–135, 2013.

CABRITA, L.; FOSSEN, T.; ANDERSEN, M. Analytical, nutritional and clinical methods section colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v. 68, p. 101–107, 2000.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. *et al.* Chemical studies of anthocyanins: A Review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859-871, 2009.

CERVANTES, T. N. M. *et al.* The influence of different electrolytes on the electrical and optical properties of polymer films electrochemically synthesized from 3-alkylthiophenes. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 25, n. 4, p. 1703–1715, 2014.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203–220, 2002.

CZERNUSZEWICZ, R. S.; ZACZEK, M. B. Resonance Raman Spectroscopy. In: **Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, p. 32, 2011.

DAS, R. S.; AGRAWAL, Y. K. Raman spectroscopy: Recent advancements , techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 163–176, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DRANCA, F.; OROIAN, M. Kinetic Improvement of Bioactive Compounds Extraction from Red Grape (*Vitis vinifera* Moldova) Pomace by Ultrasonic Treatment. **Foods**, v. 8, n. 8, p. 353, 2019.

DRESSELHAUS, M. S.; JORIO, A.; PIMENTA, M. A. Resonance Raman spectroscopy in one-dimensional carbon materials. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 3, p. 423–439, 2006.

DOU, X. *et al.* An Ultrasensitive, Disposable, and “plug and Play” Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate for the in Situ Detection of Trace Thiram in Water. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 9, p. 4955–4963, 2018.

DUGO, P. *et al.* Determination of anthocyanins and related components in red wines by micro- and capillary HPLC. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 17–18, p. 1458–1466, 2004.

FARIA, A. *et al.* Bioavailability of Anthocyanins. **Natural Products**, p. 2466–2482, 2013.

FARIA, D. L. A. DE; AFONSO, M. C.; EDWARDS, H. G. M. Espectroscopia Raman: uma nova luz no estudo de bens culturais. **Revido Museu de Arqueologia e Etnologia**, v. 12, p. 249–267, 2002.

FONTANA, A.R.; ANTONIOLLI, A.; BOTTINI, R. Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological

applications of phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 61, p. 8987–9003, 2013.

FLAMINI, R. *et al.* Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 19651–19669, 2013.

FILIPPIN, N. *et al.* Plasma-Enabled Amorphous TiO₂ Nanotubes as Hydrophobic Support for Molecular Sensing by SERS. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 12, n. 45, p. 50721–50733, 2020.

GÓES, M. M. *et al.* Plasticizers' effect on pH indicator film based on starch and red grape skin extract for monitoring fish freshness. **Packaging Technology and Science**, v. 36, n. 6, p. 425–37, 2023.

GOMES, B. B. *et al.* Efeitos das antocianinas na saúde: uma revisão sistemática. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 4, p. e6411427069, 2022.

GONG, D. *et al.* Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. **Journal of Materials Research**, v. 16, n. 12, p. 3331–3334, 2001.

GUPTA, S. M.; TRIPATHI, M. A review of TiO₂ nanoparticles. **Chinese Science Bulletin**, v. 56, n. 16, p. 1639–1657, 2011.

HU, L. *et al.* Au Nanoparticles Decorated TiO₂ Nanotube Arrays as a Recyclable Sensor for Photoenhanced Electrochemical Detection of Bisphenol A. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 8, p. 4430–4438, 2016.

HUANG, J. Y.; ZHANG, K. Q.; LAI, Y. K. Fabrication, modification, and emerging applications of TiO₂ nanotube arrays by electrochemical synthesis: A review. **International Journal of Photoenergy**, v. 2013, p. 19, 2013.

ITO, F. *et al.* Why do flavylum salts show so various colors in solution?: Effect of concentration and water on the flavylum's color changes. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 150, n. 1–3, p. 153–157, 2002.

JACKMAN, R.; YADA, R. Y.; SPEERS, R. A. Anthocyanins as food colorants – A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 11, p. 201-247, 1987.

JAFARI, M *et al.* A TiO₂ nanotube array decorated by Ag nanoparticles for highly sensitive SERS determination and self-cleaning of vitamin B12. **Microchemical Journal**, v. 181, n. 107813, 2022.

JANA, J.; GANGULY, M.; PAL, T. Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application. **RSC Advances**, v. 6, n. 89, p. 86174–86211, 2016.

JAROENWORALUCK, A. *et al.* Macro, micro and nanostructure of TiO₂ anodised films prepared in a fluorine-containing electrolyte. **J Mater Sci**, v. 42, p. 6729–6734, 2007.

JING, M. *et al.* Silver nanoparticle-decorated TiO₂ nanotube array for solid-phase microextraction and SERS detection of antibiotic residue in milk. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 255, p. 119652, 2021.

JOHN, N.; GEORGE, S. Raman Spectroscopy. In: **Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization**. 1^o ed. Cambridge: Elsevier Inc., 2017. v. 2, p. 95–127.

KATO, C. G.; TONHI, C. D.; CLEMENTE, E. ANTOCIANINAS DE UVAS (*Vitis vinífera* L.) PRODUZIDAS EM SISTEMA CONVENCIONAL. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, 2012.

KONG, J. M. *et al.*. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923–933, 2003.

KOWALSKI, D.; KIM, D.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes, nanochannels and mesosponge: Self-organized formation and applications. **Nano Today**, v. 8, n. 3, p. 235–264, 2013.

KRYSA, M.; SZYMANSKA-CHARGOT, M.; ZDUNEK, A. FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – a review. **Food Chemistry**, v. 393, p. 133430, 2022.

KONCZAK, I.; ZHANG, W. Anthocyanins-more than nature's colours (2004). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p. 239–240, 2004.

LAPIDOT, T. *et al.* pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 67–70, 1999.

LEVI, M. A. B. *et al.* Three-way chemometric method study and UV-Vis absorbance for the study of simultaneous degradation of anthocyanins in flowers of the *Hibiscus rosa-sinensis* species. **Talanta**, v. 62, n. 2, p. 299-305, 2004.

LIU, G. *et al.* Progress on free-standing and flow-through TiO₂ nanotube membranes. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 98, p. 24–38, 2012

LI, L. *et al.* Recent Developments in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Its Application in Food Analysis: Alcoholic Beverages as an Example. **Foods**, v. 11, n. 14, 2022.

LIU, L. *et al.* TiO₂ Nanofoam-Nanotube Array for Surface-Enhanced Raman Scattering. **ACS Applied Nano Materials**, v. 1, n. 12, p. 6563–6566, 2018.

LING, Y. *et al.* Using Ag-embedded TiO₂ nanotubes array as recyclable SERS substrate. **Applied Surface Science**, v. 388, p. 169–173, 2016.

LONG, D. A. 80TH Anniversary of the discovery of the Raman Effect: a celebration. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 39, p. 316–321, 2008.

LOPES, T. J. *et al.* Antocianinas: Uma Breve Revisão Das Características Estruturais

- E Da Estabilidade. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 291–297, 2007.
- LUAN, N. H.; CHANG, C. F. Efficient fabrication of robust and highly ordered free-standing TiO₂ nanotube layers. **Materials Research Bulletin**, v. 151, p. 111829, 2022.
- LULE, S. U.; XIA, W. Food phenolics, pros and cons: A review. **Food Reviews International**, v. 21, n. 4, p. 367–388, 2005.
- MANFRA, M. *et al.* Anthocyanin composition and extractability in berry skin and wine of *Vitis vinifera* L. cv. Aglianico. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 15, p. 2749–2755, 2011.
- MALACRIDA, C. R.; DA MOTTA, S. Antocianinas Em Suco De Uva: Composição E Estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 59–82, 2006.
- MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, p. 1218-1223, 2008
- MARQUES, P. A. *et al.* Optimized synthesis for improved TiO₂NT array surface. **Ceramica**, v. 65, n. 375, p. 327–334, 2019.
- MAZZA, G.; BROUILLARD, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. **Phytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 1097–1102, 1990.
- MERLIN, J. C.; STATOUA, A.; BROUILLARD, R. Investigation of the in vivo organization of anthocyanins using resonance raman microspectrometry. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1575–1581, 1985.
- MERLIN, J. C. *et al.* Resonance Raman spectroscopic studies of anthocyanins and anthocyanidins in aqueous solutions. **Phytochemistry**, v. 35, n. 1, p. 227–232, 1993.
- NASCIMENTO-DIAS, B.; OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, B. M. Espectroscopia Raman e suas particularidades: Um resumo sobre suas concepções teóricas e experimentais. **J. of Experimental and Technique Instrumentation**, v. 4, n. 1, p. 15–25, 2020.
- PERSSON, B. N. J.; ZHAO, K.; ZHANG, Z. Chemical Contribution to Surface-Enhanced Raman Scattering. **Phys. Rev. Lett.**, v. 96, p. 207401, 2006.
- PINZARU, S. C.; MAGDAS, D. A. Ag nanoparticles meet wines: SERS for wine analysis. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 3, p. 892–900, 2018.
- POZZI, F.; LEONA, M. Surface-enhanced Raman spectroscopy in art and archaeology. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 47, n. 1, p. 67–77, 2016.
- QU, Y.; TIAN, Y.; CHEN, Y.; HE, L. Chemical profiling of red wines using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). **Analytical Methods**, v. 12, n. 10, p. 1324–1332, 2020.

REGONINI, D. *et al.* A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 74, n. 12, p. 377–406, 2013.

RIBEIRO, E.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 2° Ed ed. São Paulo: BLUCHER, 2003.

RIBEIRO, M. C. C.; SANTOS, P. S. Espectro eletrônico de absorção e perfil de excitação Raman. Duas facetas mesma questão. I. **Química Nova**, v. 15, n. 4, p. 317–322, 1992.

RIBÈREAU-GAYON, P. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. **Chimie Analytique**, vol. 52, n. 6, p. 627-631, 1970

RHO, Won-Yeop *et al.* Enhanced efficiency in dye-sensitized solar cells by electron transport and light scattering on freestanding TiO₂ nanotube arrays. **Nanomaterials**, v. 7, n. 10, p. 345, 2017.

RODRIGUES, A. D. G.; GALZERANI, J. C. Espectroscopias de Infravermelho, Raman e de Fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 4, p. 4309, 2012.

ROY, P.; BERGER, S.; SCHMUKI, P. TiO₂ nanotubes: Synthesis and applications. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 13, p. 2904–2939, 2011.

ROGUSKA, A. *et al.* In situ spectroelectrochemical surface-enhanced Raman scattering (SERS) investigations on composite Ag/TiO₂-nanotubes/Ti substrates. **Surface Science**, v. 603, n. 17, p. 2820–2824, 2009.

SALA, O. I₂ - Uma molécula didática. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 914–920, 2008.

SALEIRO, G. T. *et al.* Avaliação das fases cristalinas de dióxido de titânio suportado em cerâmica vermelha. **Cerâmica**, v. 56, p. 162–167, 2010.

SANT'ANA, A. C.; CORIO, P.; TEMPERINI, M. L. A. The SERS effect in trace analysis: The role of nanostructured surfaces. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 805–810, 2006.

SANTANA, H. *et al.* Preparação e caracterização de substrato SERS ativo: em estudo de adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 194–199, 2006.

SANTOS, A. R. *et al.* Raman spectroscopy application in the characterization of pertaining minerals of a geocollection. **Química Nova**, v. 42, n. 5, p. 489–496, 2019.
SCHLÜCKER, S. Surface-enhanced raman spectroscopy: Concepts and chemical applications. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 19, p. 4756–4795, 2014.

SEIXAS, J. *et al.* Estudos da obtenção de nanopartículas de TiO₂ pelos métodos Solvotermicos assistidos por micro-ondas e sol-gel. **Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade**, v. 5, n. esp, p. 18–24, 2018.

SHAHAB, M. *et al.* Relationship between anthocyanins and skin color of table grapes treated with abscisic acid at different stages of berry ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 259, n. September 2019, p. 108859, 2020.

SHAHID, M.; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: A review. **Journal of Cleaner Production**, v. 53, p. 310–331, 2013.

SILVA, D. S. N. *et al.* Espectroscopia Raman e Infravermelho próximo para identificação de carotenoides em amostras vegetais: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 14285–14302, 2021.

SOBANA, N.; MURUGANADHAM, M.; SWAMINATHAN, M. Nano-Ag particles doped TiO₂ for efficient photodegradation of Direct azo dyes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 258, n. 1–2, p. 124–132, 2006.

SOTO, P. C. *et al.* A novel sensel plataforma based on self-doped TiO₂ nanotubes for methylene blue dye electrochemical monitoring during its electro-Fenton degradation. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 24, p. 1951-1959, 2020.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 1, 19–38, 2004.

STRINGHETA, P. C.; FREITAS, P. A. V. DE. **Corantes Naturais: do laboratório ao mercado**. 1ª Ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2021.

SUR, U. K. Surface-Enhanced Raman Scattering. In: **Raman Spectroscopy and Applications**. 1ª Ed. Croácia: IntechOpen, 2017. p. 293–312.

TANG, B. *et al.* Kinetic investigation into pH-dependent color of anthocyanin and its sensing performance. **Dyes and Pigments**, v. 170, p. 107643, 2019.

TATSUZAWA, F. Flower colors and antocyanins in the cultivars of *Campanula medium* L. (*Campanulaceae*). **Phytochemistry Letters**, v. 53, p. 13-21, 2023.

VISHNU, V. R. *et al.* Identification of anthocyanin in a purple yam (*Dioscorea alata*) accession and their in vitro antiproliferative active. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, 2023. Acesso em: 24 jul. 2023. Disponível: <https://doi.org/10.1007/s13562-023-00828-2>.

VIVAS, N.; VIVAS DE GAULEJAC, N.; NONIER, M.F. Sur l'estimation et la quantification des composés phénoliques des vins. **Bulletin de L'O.I.V.**, , vol. 76, n. 865-866, p. 281-303, 2003

WANG, J.; LIN, Z. Anodic formation of ordered TiO₂ nanotube arrays: Effects of electrolyte temperature and anodization potential. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 10, p. 4026–4030, 2009.

WEI, D.; CHEN, S.; LIU, Q. Review of fluorescence Suppression Techniniques in

Raman Spectroscopy. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 50, n. 5, p. 387-406, 2015.

WU, D. Y. et al. Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy of nanostructures. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 5, p. 1025–1041, 2008.

YU, Y. et al. The Design of TiO₂ Nanostructure (Nanoparticle, Nanotube and Nanosheet) and their Photocatalytic Activity. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 118, p. 2–5, 2014.

YUAN, Z. Y.; SU, B. L. Titanium oxide nanotubes, nanofibers and nanowires. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 241, n. 1–3, p. 173–183, 2004.

ZAFFINO, C.; RUSSO, B.; BRUNI, S. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of anthocyanidins. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 149, p. 41–47, 2015.

ZAFFINO, C. et al. Identification of anthocyanins in plant sources and textiles by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 47, n. 3, p. 269–276, 2016.

ZENG, M. Influence of TiO₂ surface properties on water pollution treatment and photocatalytic activity. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 3, p. 953–956, 2013.

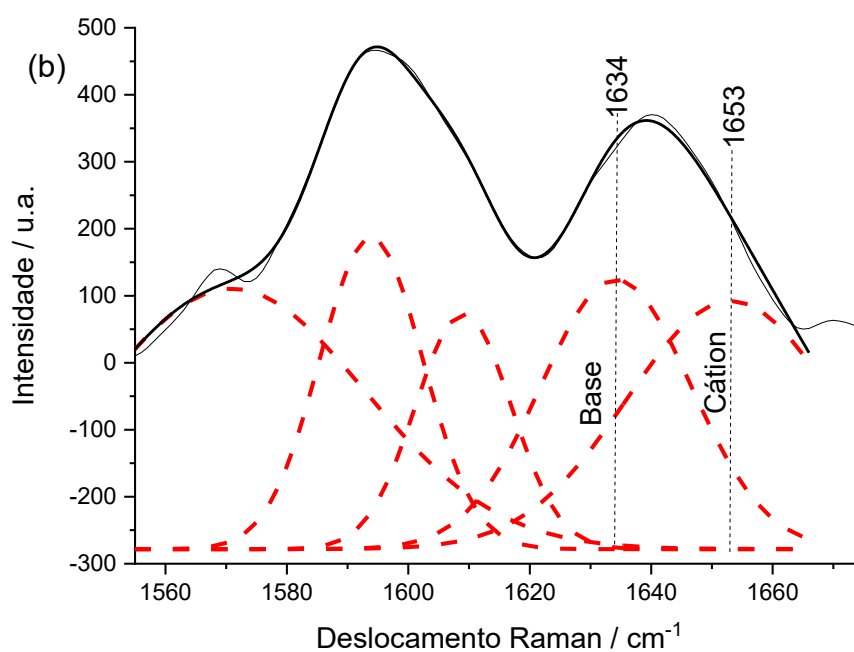
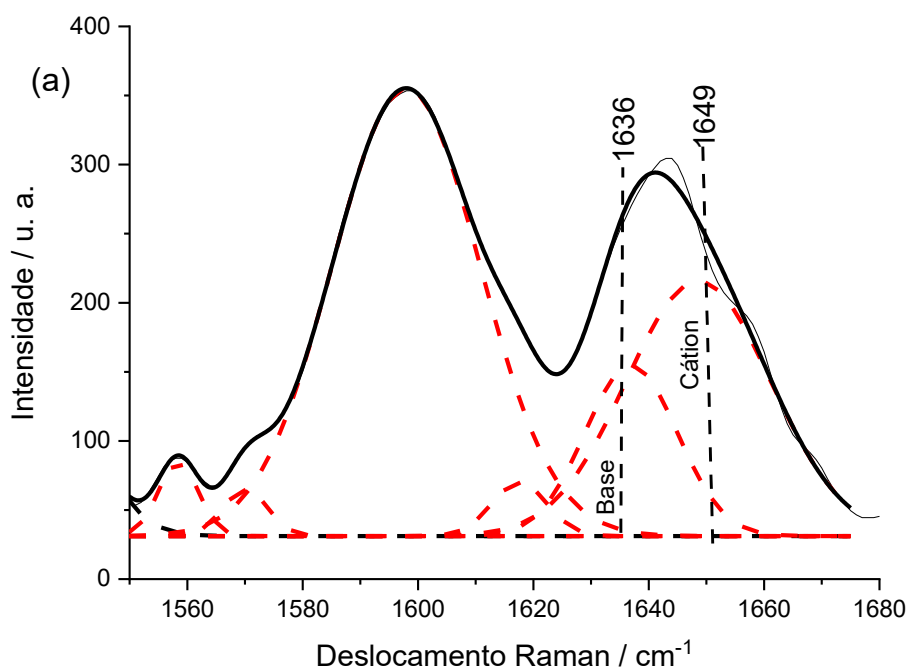
ZENEBO, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

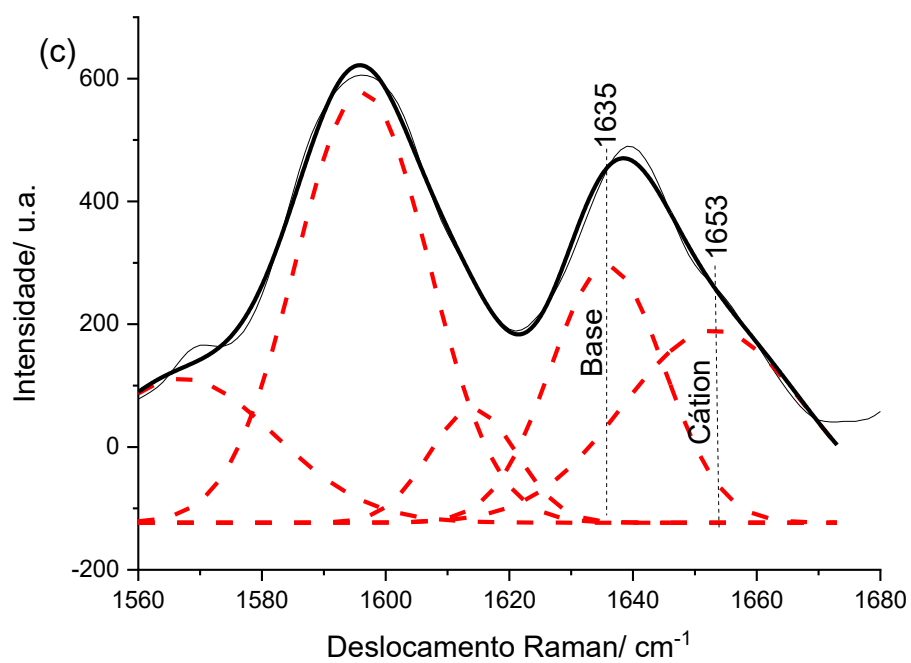
ZHAO et al. Carbon spheres supported visible-light-driven CuO-BiVO₄ heterojunction: preparation, characterization, and photocatalytic properties. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 115, p. 90-99, 2012

APÊNDICES

APÊNDICE A

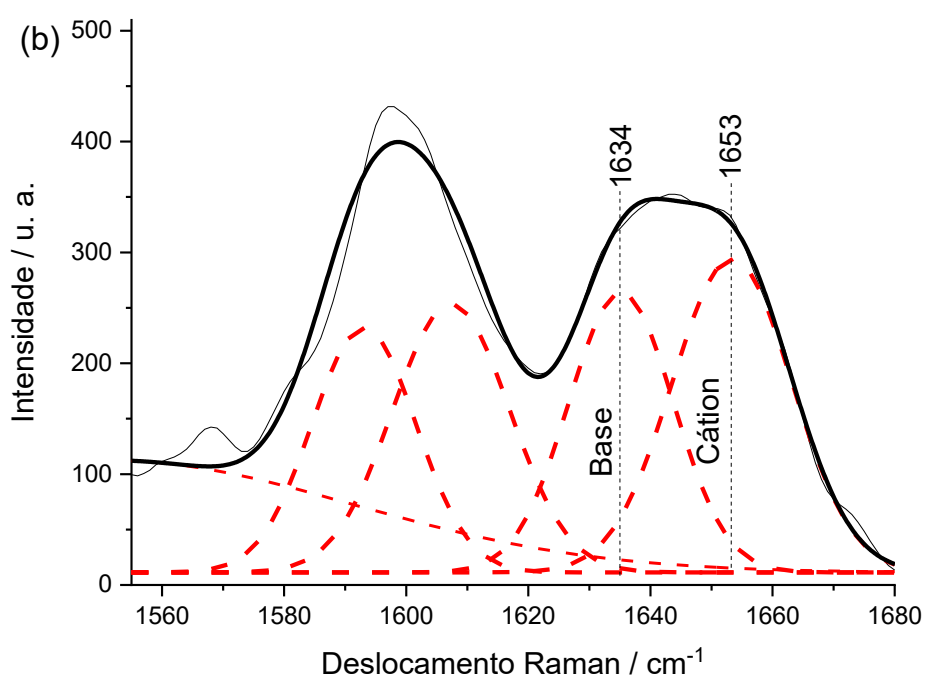
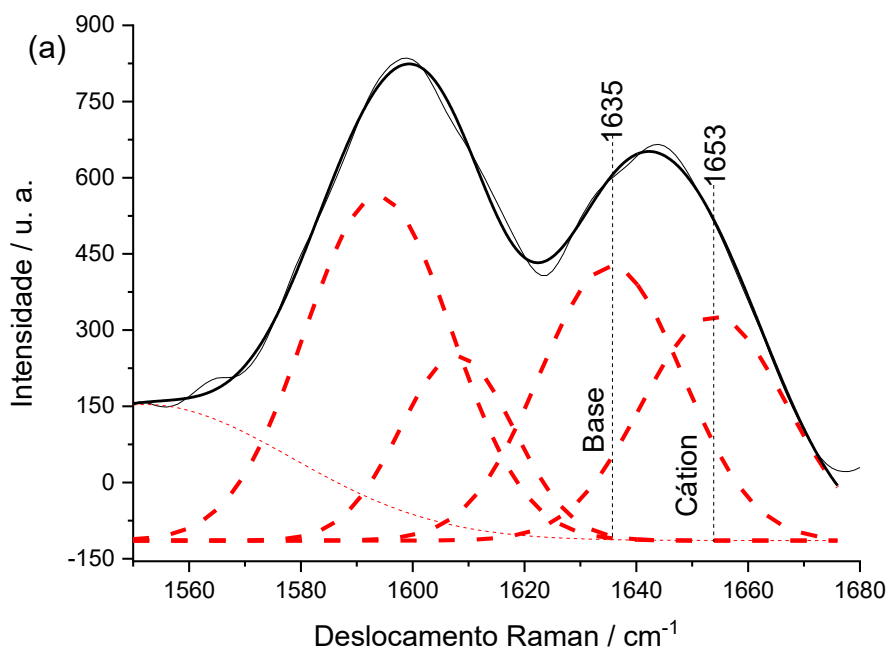
Espectros deconvoluídos na região de 1475 a 1700 cm^{-1} para os extratos de uva diluídos em (a) 5% e (b) 10 % (c) 15% em soluções de nanopartículas de Ag.

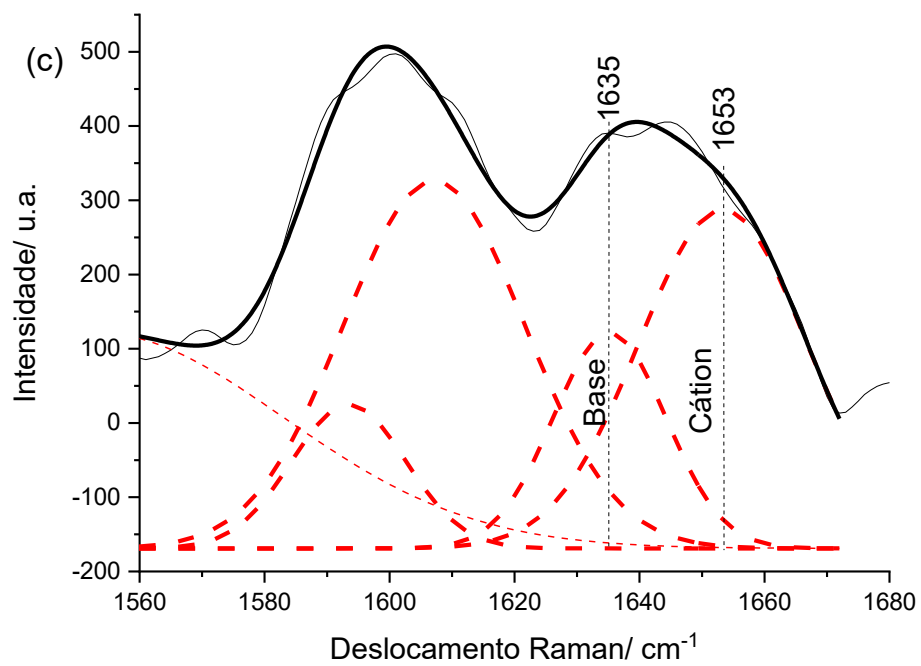




APÊNDICE B

Espectros deconvoluídos na região de 1475 a 1700 cm^{-1} para os extratos de uva diluídos em (a) 0,75% e (b) 0,5 % (c) 0,25% em soluções de nanopartículas de Ag sobre a superfície do TiO_2NTs .





APÊNDICE C

Espectros deconvoluídos na região de 1560 a 1680 cm^{-1} para os extratos de uva diluídos após degradação de 5 dias em soluções de nanopartículas de Ag sobre a superfície do TiO_2NTs .

