

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“AVALIAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN
INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE EM PAPEL FILTRO E
MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA QUANTIFICAÇÃO DE
FÁRMACOS”**

Loriz Francisco Sallum*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

*** bolsista CAPES/FAPESP (2012/04321-3)**

**São Carlos - SP
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S169ae Sallum, Loriz Francisco.
Avaliação da espectroscopia Raman intensificada por superfície em papel filtro e métodos quimiométricos na quantificação de fármacos / Loriz Francisco Sallum. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
85 f.

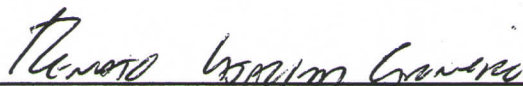
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Quimiometria. 2. Fármacos. 3. Nanopartículas. 4. Raman, Espectroscopia de. I. Título.

CDD: 543.072 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

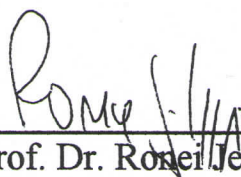
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico da candidata Loriz Francisco Sallum, realizada em 21 de fevereiro de 2014:



Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro



Profa. Dra. Cely Mieke Shinohara Izumi



Prof. Dr. Ronei Jesus Poppi

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais Fuad e Arlete, minha irmã Katherine e minha avó Alice por todo o apoio que recebi desde que entrei na faculdade. Também gostaria de agradecer ao meu namorado Artur pela paciência e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato pela contribuição na minha formação acadêmica e no auxílio no decorrer deste trabalho.

À minha amiga de apartamento e de laboratório, Patrícia, por toda a ajuda, pelas risadas e companhia para ir à academia,

Aos amigos do laboratório, Ana Flávia, Bolaji, Frederico, Marcão, Jorge, Leidaiany, Vitor, e ao pessoal do LABBES, Avaré, Bruna, Cyber, Geiser, Roberta por toda a ajuda e pelos momentos de descontração.

Ao pessoal do LIEC, Andressa, Chico, Renata, Pablo e especialmente ao Luiz, pela ajuda, discussões e auxílio com as micrografias.

Ao pessoal que esteve comigo desde a graduação Daiane, Elton, Erlon, Maila, Marina, Raphael e Suellen.

Às minhas amigas de escola, Cristiane e Juliana, que mesmo longe e com a correria do dia a dia, continuamos conversando e dando risadas.

Ao Prof. Dr. Emerson por ter emprestado a chapinha com controle de temperatura no início deste projeto e ao Prof. Dr. Caio por ajudar na aquisição dos espectros de infravermelho.

Aos Professores da graduação e da pós-graduação por auxiliar no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Às secretárias da Pós-Graduação, Luciani, Ariane e Cristina, pela atenção.

Aos membros da banca pelas sugestões de aprimoramento deste trabalho.

À CAPES, CNPq e FAPESP (2012/04321-3) pelo apoio financeiro deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – Parâmetros de estudo do planejamento fracionado 2_{IV}^{7-3} e os valores nos níveis alto (+1), baixo (-1) e ponto central (0).....	30
TABELA 2.2 – Relações geradoras utilizadas para construção do planejamento fatorial fracionado de resolução IV e as variáveis a que se referem.....	30
TABELA 2.3 – Condições reacionais de cada experimento do planejamento fatorial fracionado.	31
TABELA 2.4 – Parâmetros de estudo do planejamento composto central e os respectivos valores nos níveis (+1,41), (+1), (-1), (-1,41) e o ponto central (0).	33
TABELA 2.5 – Condições reacionais de cada experimento do planejamento composto central.	34
TABELA 3.1 – Tabela dos resultados do planejamento fracionado contendo as potências utilizadas para cada experimento, o valor da média das intensidades do sinal SERS em 1031 cm^{-1} e sua normalização para uma potência do laser de 3,16 mW.	39
TABELA 3.2 – Valores reais e absolutos dos contrastes de cada parâmetro do planejamento fracionado em ordem crescente.	40
TABELA 3.3 – Tabela dos resultados do planejamento composto central. A intensidade média refere-se ao sinal SERS em 1031 cm^{-1} para seis espectros, utilizando laser a 3,16 mW.....	43
TABELA 3.4 – Valores dos coeficientes linear e angular do modelo quadrático proposto com seus respectivos valores máximos e mínimos com intervalo de confiança de 90% e 95%.....	44

TABELA 3.5 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central.....	45
TABELA 3.6 – Valores otimizados dos parâmetros de síntese.....	52
TABELA 3.7 – Resultados obtidos na determinação de nicotinamida em amostra em gel empregando HPLC e SERS.....	64
TABELA 3.8 – Resultados obtidos na determinação de ácido acetilsalicílico em comprimido comercial empregando HPLC e SERS.....	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Diagrama de níveis de energia ilustrando o espalhamento Rayleigh, Stokes e Anti-Stokes.....	5
FIGURA 1.2 – Representação da oscilação dos plasmon de superfície localizados de nanopartículas metálicas ao incidir radiação eletromagnética e oscilação da nuvem de elétrons.....	8
FIGURA 1.3 – Representação do espalhamento Raman amplificado devido à adsorção do analito na superfície de nanopartículas esféricas.....	9
FIGURA 1.4 – Esquema ilustrativo das rotas de síntese top down e bottom up para formação de nanopartículas.....	11
FIGURA 1.5 – O sistema em estudo pode ser descrito por uma função na qual os fatores são as variáveis de entrada e as respostas são as variáveis de saída.	14
FIGURA 1.6 – Planejamento composto central com ponto central para dois fatores ($k = 2$).	17
FIGURA 1.7 – Estrutura molecular da nicotinamida.	18
FIGURA 1.8 – Estrutura molecular do ácido acetilsalicílico.	20
FIGURA 2.1 – Ilustração do procedimento realizado para síntese de nanopartículas de prata suportadas em papel filtro.....	28
FIGURA 2.2 – Espectro SERS da nicotinamida obtido utilizando o substrato sintetizado	32
FIGURA 3.1 – Gráfico de probabilidade normal dos valores dos efeitos, em porcentagem, de cada parâmetro do planejamento fatorial fracionado.	41

FIGURA 3.2 – Superfície de resposta do planejamento composto central utilizando os valores empíricos de intensidade do sinal SERS em 1031 cm^{-1} do espectro da nicotinamida com os valores obtidos nos experimentos adicionais.....	47
FIGURA 3.3 – Intensidade normalizada para $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ de ácido acetilsalicílico (a) e para $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ de nicotinamida (b) em diferentes tempos de adsorção: 1, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos.	48
FIGURA 3.4 – Espectro SERS do ácido acetilsalicílico obtido utilizando o substrato sintetizado.	48
FIGURA 3.5 – Intensidade normalizada para $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ de ácido acetilsalicílico (a) e para $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ de nicotinamida (b) em diferentes tempos de reação: 8, 10, 12, 14, 16 minutos.	50
FIGURA 3.6 – Micrografia das nanopartículas de prata depositadas em papel filtro em um tempo de reação de 16 minutos.	51
FIGURA 3.7 – Micrografia do papel filtro (a) e do papel filtro com nanopartículas de prata depositadas sobre a superfície (b).	53
FIGURA 3.8 – Gráfico de distribuição do tamanho das nanopartículas de prata depositadas sobre papel filtro nas condições ótimas da síntese.	53
FIGURA 3.9 – Padrão de difração das nanopartículas de prata depositadas sobre papel filtro nas condições ótimas da síntese.	54
FIGURA 3.10 – Espectro de energia dispersiva (EDS) das nanopartículas de prata depositadas sobre papel filtro nas condições ótimas da síntese.	55
FIGURA 3.11 – Espectro de infravermelho do papel filtro (a) e das nanopartículas de prata depositadas sobre papel filtro (b) nas condições ótimas da síntese.	56

- FIGURA 3.12 – Espectros SERS da nicotinamida diluída em pH 2 (a), 7 (b) e 10 (c), com potência de laser incidido de 3,16 mW..... 57
- FIGURA 3.13 – Ilustração da nicotinamida na forma neutra (a) e na forma protonada (b). 58
- FIGURA 3.14 – Espectro SERS de uma solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do padrão de nicotinamida com uma potência de laser incidida de 3,16 mW (a), espectro Raman do padrão de nicotinamida em pó com uma potência incidida de 31,6 mW (b) e espectro Raman da solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do padrão de nicotinamida com uma potência de laser incidida de 3,16 mW (c). 59
- FIGURA 3.15 – Espectro SERS de uma solução contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ da amostra comercial de nicotinamida com uma potência de laser incidida de 3,16 mW (a) e espectro Raman da amostra comercial de nicotinamida em gel com uma potência incidida de 316 mW (b). 61
- FIGURA 3.16 – Espectro SERS da nicotinamida em diferentes concentrações: $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (a); $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (b); $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (c); $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ (d); $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ (e) e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (f)..... 63
- FIGURA 3.17 – Curva de calibração da nicotinamida utilizando o substrato proposto..... 63
- FIGURA 3.18 – Espectro SERS de uma solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do padrão de ácido acetilsalicílico com uma potência de laser incidida de 3,16 mW (a), espectro Raman do padrão de ácido acetilsalicílico em pó com uma potência incidida de 31,6 mW (b) e espectro Raman da solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do padrão de ácido acetilsalicílico com uma potência de laser incidida de 3,16 mW (c). 66
- FIGURA 3.19 – Possível orientação do ácido acetilsalicílico em relação à superfície da nanopartícula de prata..... 67

FIGURA 3.20 – Espectro SERS de uma solução contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ da amostra comercial de ácido acetilsalicílico com uma potência de laser incidida de $3,16 \text{ mW}$ (a) e espectro Raman da amostra comercial de ácido acetilsalicílico em pó com uma potência incidida de $15,8 \text{ mW}$ (b).....	68
FIGURA 3.21 – Espectro SERS do ácido acetilsalicílico em diferentes concentrações: $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (a); $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (b); $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ (c); $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ (d); $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ (e) e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ (f).....	70
FIGURA 3.22 – Curva de calibração do ácido acetilsalicílico utilizando o substrato proposto.	70

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE EM PAPEL FILTRO E MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS NA QUANTIFICAÇÃO DE FÁRMACOS

A espectroscopia Raman tem sido bastante utilizada para análises farmacêuticas nas últimas décadas devido aos avanços desta técnica, relacionados ao desenvolvimento da eletrônica, óptica e estudos fundamentais. Graças às vantagens da técnica de amplificação do sinal Raman e a rápida aquisição dos dados, a SERS tem se tornado uma ferramenta analítica útil para quantificar princípios ativos, detectar interferentes, além de auxiliar em várias outras áreas. Neste projeto foram sintetizadas nanopartículas de prata com Reagente de Tollens utilizando papel filtro como substrato, sendo verificado o pré-tratamento dado ao substrato, influência de sua porosidade, a concentrações dos reagentes, o tempo e a temperatura da reação por planejamento experimental fracionado e planejamento composto central, obtendo a síntese com o maior fator de aumento do sinal SERS. A análise foi feita com um espectrômetro Raman com laser de comprimento de onda de 785 nm e as nanopartículas foram analisadas por difração de raio-X, espectroscopia de energia dispersiva e microscopia eletrônica de varredura. Para os modelos de calibração da nicotinamida e do ácido acetilsalicílico, escolheu-se o pico mais intenso como referência. Em resumo, o presente projeto investigou a detecção e quantificação dos fármacos em questão utilizando o substrato sintetizado. Para tal, foram utilizados planejamento experimental visando otimização da síntese do substrato para possível quantificação de princípios ativos na presença de excipientes em produtos comerciais.

ABSTRACT

EVALUATION OF SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY ON PAPER FILTER SUBSTRATE AND CHEMOMETRIC METHODS IN DETERMINATION OF DRUGS

Raman spectroscopy has been widely used for pharmaceutical analysis in recent decades due to advances of this technique, related to the development of electronics, optics and fundamental studies. As a consequence to the advantages of the technique of Raman signal enhancement and rapid data acquisition, SERS has become a useful analytical tool for quantifying active ingredients, detecting interferences, and assist in many other areas. In this work silver nanoparticles were synthesized by Tollens reagent using filter paper as the substrate, pre-treatment of the substrate influences its porosity, reactant concentrations, temperature and time of reaction being checked by fractional factorial design and central composite design, getting the synthesis with the highest enhancement factor in SERS signal. The analysis was performed with a Raman spectrometer with a laser wavelength of 785 nm and the nanoparticles were analyzed by X-ray diffraction, energy dispersive spectroscopy and scanning electron microscopy. For the calibration models of nicotinamide and acetylsalicylic acid, it was chosen the most intense peak as reference. In summary, the present work investigated the detection and quantification of drugs in question using synthesized substrate. To this end, experimental design aimed at optimizing the synthesis of the substrate for possible quantification of active principles in presence of excipients in commercial products.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Espectroscopia Raman	3
1.2 – Teoria da espectroscopia Raman	4
1.3 – Espectroscopia Raman amplificada por superfície	5
1.4 – Teoria da espectroscopia Raman amplificada por superfície	6
1.4.1 – Mecanismo eletromagnético	8
1.4.2 – Mecanismo químico	9
1.5 – Nanopartículas	10
1.6 – Substratos	12
1.7 – Planejamento experimental	14
1.7.1 – Planejamento fatorial fracionado	15
1.7.2 – Planejamento composto central	16
1.8 – Nicotinamida	17
1.9 – Ácido acetilsalicílico	19
1.10 – Objetivos	23
2 - PARTE EXPERIMENTAL	24
2.1 – Reagentes e soluções	25
2.2 – Amostras analisadas	26
2.2.1 – Preparação da amostra para determinação de nicotinamida	26

2.2.2 – Preparação da amostra para determinação de ácido acetilsalicílico	26
2.3 – Instrumentação	27
2.4 – Otimização da preparação do substrato e metodologia	27
2.4.1 – Planejamento fatorial fracionado	29
2.4.2 – Planejamento composto central	33
2.4.3 – Estudo da variação da intensidade do sinal com o tempo de adsorção	34
2.4.4 – Estudo da variação da intensidade do sinal com o tempo de reação	35
2.4.5 – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de nicotinamida	35
2.4.6 – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de ácido acetilsalicílico	36
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.1 – Planejamento experimental fatorial fracionado	38
3.2 – Planejamento composto central	42
3.3 – Variação do sinal com o tempo de adsorção.....	47
3.4 – Variação do sinal com o tempo de reação	49
3.5 – Caracterização das nanopartículas de prata suportadas em papel filtro	52
3.6 – Nicotinamida	57
3.6.1 – Estudo da orientação da nicotinamida em função do pH	57

3.6.2 – Espectro SERS do padrão e da amostra.....	59
3.6.3 – Construção da curva analítica	62
3.6.4 – Determinação de nicotinamida em amostra comercial	64
3.7. Ácido acetilsalicílico	65
3.7.1 – Espectro SERS do padrão e da amostra.....	65
3.7.2 – Construção da curva analítica	69
3.7.3 – Determinação de ácido acetilsalicílico em amostra comercial	71
4 – CONCLUSÕES	73
5 – REFERÊNCIAS	77

Capítulo 1- INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

Desde a observação da intensificação do sinal Raman devido à adsorção de moléculas em superfícies metálicas em 1974¹, a Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (SERS, do inglês **S**urface **E**nanced **R**aman **S**pectroscopy) ganhou uma intensa atividade de pesquisa em várias áreas. Esse interesse passou do fundamento para aplicações, e uma grande quantidade de artigos foram publicados em diversas áreas como química, físico-química, física do estado sólido, entre outros².

Apesar do entendimento teórico dos mecanismos de aumento do sinal não estarem definidos e ainda estarem em desenvolvimento, dados experimentais recentes encontrados na literatura têm demonstrado que a SERS vem se tornando um instrumento analítico útil para diferentes análises e obtenção de conclusões sobre moléculas presentes em baixas quantidades, podendo ser utilizada para detectar até uma única molécula^{3,4}.

Diversas vantagens como baixos limites de detecção, resposta em tempo real, capacidade de análise quantitativa e qualitativa, detecção de vários componentes simultaneamente e análise de traços tem sido reportadas ao utilizar a técnica SERS⁵. Esta técnica aumenta a intensidade do sinal Raman de soluções aquosas diluídas, é sensível quanto a orientação das moléculas adsorvidas na superfície metálica e provê informações importantes sobre a mudança da identidade molecular da substância e sua orientação em relação ao substrato em diferentes condições, como pH e concentração⁶.

A utilização da SERS vem se mostrando extremamente eficiente no estudo de fármacos utilizando diversos substratos, por fornecer uma rápida e cada vez mais precisa quantificação de seus ingredientes ativos. Em particular, a utilização de filtro de papel como substrato de nanopartículas de prata torna-se atrativo devido à facilidade de manipulação, baixo custo e por ser um material

reciclável⁷⁻⁹. No entanto, problemas relatados na aplicação desta técnica para várias aplicações analíticas provem da dificuldade de se obter substratos reprodutíveis para várias finalidades de uso. Muitas abordagens têm sido feitas para superar alguns problemas relacionados à utilização de nanopartículas, como utilização de filmes orgânico para evitar sua degradação ou utilização de um sistema em fluxo para renovação de coloides¹⁰.

A proposta central deste trabalho foi a fabricação de um substrato SERS de baixo custo e fácil manipulação para aplicação analítica, sendo que o substrato consiste na deposição de nanopartículas de prata, sintetizadas pelo método de Tollens, sobre a superfície de um papel filtro. A síntese foi otimizada para obter um maior fator de aumento da intensidade do sinal SERS e, com isso, construir uma curva de calibração para alguns fármacos e posterior quantificação em amostra comerciais.

1.1 – Espectroscopia Raman

A Espectroscopia Raman é uma técnica na qual fótons de luz monocromática incidida sobre a amostra são espalhados pelas transições vibracionais e rotacionais das moléculas fornecendo informações importantes da mesma a nível molecular, que podem ser consideradas sua “impressão digital”¹¹. Este fenômeno foi previsto teoricamente pelo físico australiano Smekal em seu trabalho “The quantum theory of dispersion” publicado em 1923 e verificado experimentalmente em 1928 por Raman e Krishnan, feito que resultou em um prêmio Nobel de Física recebido por Raman em 1930¹². A partir disto, este fenômeno tem sido referido como espectroscopia Raman.

No experimento original a radiação solar, fonte de luz não coerente, foi focalizada por um telescópio em uma amostra e um sistema de filtros foi utilizado para mostrar a existência de radiação espalhada com frequências diferentes daquela

da luz incidente¹³. A evolução da espectroscopia Raman ocorreu lentamente entre 1930 e 1950, pois, com sua descoberta, muitos estudos teóricos foram realizados. O desenvolvimento do laser foi um fator fundamental para o avanço da técnica e, avanços tecnológicos como desenvolvimento de filtros, detectores, fibras óticas e computadores que auxiliaram a realização de aquisições rápidas, com qualidade elevada, obtendo uma melhora na relação sinal-ruído e diminuição do tamanho do equipamento^{14,15}.

Atualmente, a Espectroscopia Raman é uma técnica analítica rápida, não destrutiva e não invasiva na qual se obtêm o espectro vibracional com as informações químicas de praticamente qualquer matriz em qualquer estado da matéria¹⁶. No entanto, é gerado um sinal pouco intenso, o que faz com que haja limitações para sua aplicação, devido à baixa sensibilidade desta técnica¹⁷.

1.2 – Teoria da espectroscopia Raman

Quando uma amostra é irradiada com uma potente fonte de laser de radiação monocromática visível ou no infravermelho próximo, a maior parte da radiação é espalhada pela amostra no mesmo comprimento da fonte de luz (espalhamento Rayleigh). No entanto, aproximadamente 0,0001% dos fótons reemitidos são de comprimentos de onda maior ou menor que o da fonte¹⁸.

Na Figura 1.1, uma molécula no nível vibracional fundamental ($v = 0$) é irradiada por um feixe de luz monocromático de energia $h\nu_0$. O campo elétrico do feixe de luz interage com a molécula induzindo temporariamente sua polarização, aumentando a energia da molécula, que passa para um estado intermediário (ou virtual) de nível de energia. A relaxação do estado virtual ocorre quase instantaneamente e, predominantemente, para o nível fundamental, resultando no espalhamento Rayleigh.

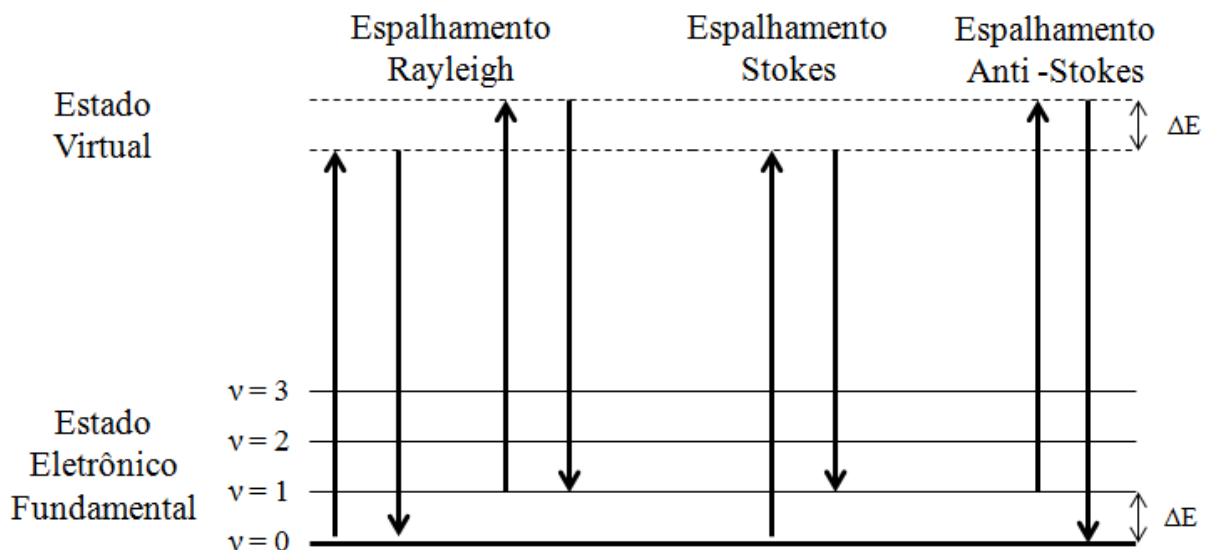


FIGURA 1.1 – Diagrama de níveis de energia ilustrando o espalhamento Rayleigh, Stokes e Anti-Stokes.

Quando a relaxação ocorre para um estado excitado vibracionalmente ($v = 1$), a radiação espalhada é de frequência menor que a radiação incidida e tem-se o espalhamento Stokes. Moléculas que estão em um nível vibracional excitado ($v = 1$) também espalham radiação inelasticamente com frequência maior que da radiação da fonte, chamada de espalhamento Anti-Stokes. O espectro Raman consiste do espalhamento Stokes e anti-Stokes, no entanto, as linhas anti-Stokes são muito menos intensas que as linhas Stokes já que uma quantidade muito pequena de moléculas se encontra em um estado eletrônico excitado. Assim, apenas a parte Stokes é geralmente utilizada no espectro Raman¹⁸.

1.3 – Espectroscopia Raman amplificada por superfície

As limitações observadas na Espectroscopia Raman foram superadas com a descoberta acidental da Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície em 1974 pelo químico Martin Fleischmann, durante análises de piridina em superfícies rugosas de eletrodos de prata imersos em solução aquosa de cloreto. O

objetivo do trabalho era o desenvolvimento de uma sonda para estudar processos eletroquímicos *in situ* aumentando a área superficial do eletrodo por rugosidade e, com isto, o número de moléculas adsorvidas disponíveis para estudo^{1,2}. A resposta foi um sinal Raman de alta qualidade resultando, em 1977, na publicação de duas teorias independentes: a teoria eletromagnética, proposta por Jeanmarie e Vanduyne¹⁹ e a teoria química, proposta por Albrecht e Creighton²⁰ sobre a causa da intensificação do sinal Raman. Jeanmarie e Van Duyne demonstraram que a magnitude do sinal Raman é maior quando o espalhamento se dá perto ou na superfície rugosa de um substrato de metal nobre, essencialmente Au, Ag e Cu²¹.

A SERS mostrou-se eficiente na detecção de moléculas em baixa concentração, de nano-molar a pico-molar¹¹, além de não haver necessidade de se fazer um pré-processamento da amostra. Os dados são obtidos através da adsorção da amostra de interesse sobre, por exemplo, superfície rugosa de um eletrodo de prata²², coloides²³ e filmes²⁴ de prata, e deposição de nanopartículas de prata sobre alumina²⁵, vidro²⁶ e papel²⁷, entre outros. Além disso, sua alta sensibilidade permite um estudo de baixas concentrações, obtendo informações relacionadas ao mecanismo de adsorção dos adsorbatos além de identificar os grupos funcionais que estavam em contato com o metal²⁸.

1.4 – Teoria da espectroscopia Raman amplificada por superfície

Os mecanismos do aumento do sinal SERS continuam sendo um tópico de pesquisa ativo²¹, pois este ainda não é completamente entendido. Desde o descobrimento deste fenômeno vários modelos teóricos foram propostos para explicar o efeito SERS, sendo o modelo eletromagnético e modelo químico os mais aceitos pela comunidade científica²⁹, e ambos vêm sendo utilizados para explicar o grande aumento observado experimentalmente.

Na teoria eletromagnética, o analito se encontra próximo da superfície metálica, que apresenta uma intensificação do campo eletromagnético próximo a superfície devido à ressonância dos plasmons de superfície localizados (localized surface plasmon resonance³⁰), e a interação dos plasmons com a molécula de interesse gera o espectro SERS. A ressonância dos plasmons localizados de superfície é a oscilação coletiva e simultânea dos elétrons da banda de condução do metal que surge quando a radiação eletromagnética, com mesma frequência da frequência natural da oscilação dos elétrons da superfície, é incidida na superfície da nanopartícula. Na teoria química, o adsorbato se liga quimicamente na superfície e a excitação ocorre pela transferência de elétrons do metal para a molécula e de volta para o metal, causando modificações na polarizabilidade da molécula. O aumento químico é possível apenas da primeira camada ligada ao metal, enquanto que para o aumento eletromagnético pode ocorrer na segunda ou outras camadas¹³.

O aumento total do sinal pode ser uma combinação dos dois efeitos dependendo das condições experimentais, sendo difícil identificar a magnitude da contribuição de cada modelo separadamente²⁸, que dependem da natureza do adsorbato, das propriedades químicas e ópticas da superfície e preparação da amostra¹⁵. Além disso, características relacionadas aos substratos metálicos também influenciam no aumento do sinal SERS. A concentração das nanopartículas metálicas também possui um efeito no aumento da intensidade do sinal SERS. Dependendo da concentração do metal, há a formação de hot spots³¹ na junção entre duas ou mais nanopartículas, no qual o fator do aumento eletromagnético pode aumentar consideravelmente³². A rugosidade da superfície metálica é um fator essencial para que se observe o efeito SERS, já que o aumento ocorre quando o analito é adsorvido próximo às irregularidades da superfície³³.

1.4.1 – Mecanismo eletromagnético

Este mecanismo é o que mais contribui para o espalhamento Raman amplificado por superfície e a descrição mais simples desta teoria é baseada no modelo de nanopartículas esféricas. Essa teoria explica intensificações a longas distâncias, sendo que o espectro obtido é similar àquele obtido das moléculas em solução, pois não há contato entre o metal e o analito além de neste tipo de mecanismo não haver uma perturbação substancial na molécula espalhadora²⁹. No caso do mecanismo eletromagnético, deve ser considerado que quanto mais polarizável for uma molécula, maior será sua sensibilidade ao campo elétrico intensificado pela superfície²⁹.

Como descrito anteriormente, o aumento eletromagnético ocorre devido aos plasmon de superfície localizados, na qual há a oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução do metal ao incidir a radiação eletromagnética (Figura 1.2). As moléculas confinadas no campo eletromagnético gerado pelas superfícies plasmons ressonantes localizadas contribuem para um fator de aumento maior que 10^4 ²¹.

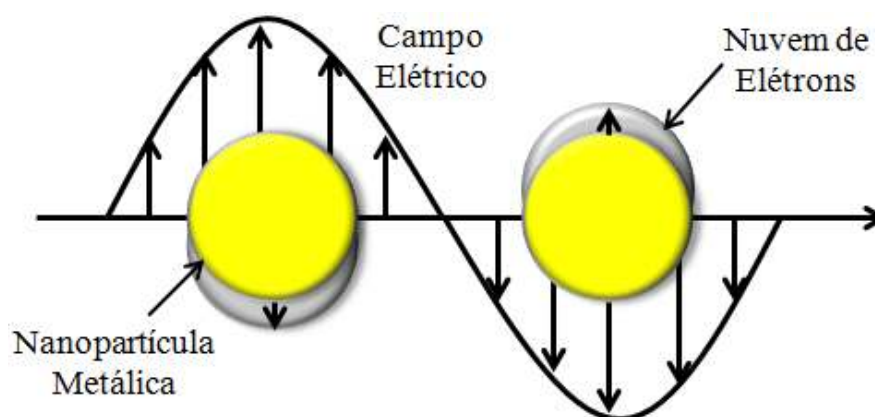


FIGURA 1.2 – Representação da oscilação dos plasmon de superfície localizados de nanopartículas metálicas ao incidir radiação eletromagnética e oscilação da nuvem de elétrons.

A frequência da oscilação ressonante, na qual os elétrons de condução de uma nanoestrutura metálica absorvem e espalham a radiação com maior eficiência, depende:

- Da natureza do metal²¹.
- Da forma e tamanho do metal³⁴.
- Da distribuição do tamanho³⁴.
- Do meio onde estão as partículas³⁴.

1.4.2 – Mecanismo químico

É um processo que aumenta a polarizabilidade da molécula, envolvendo um mecanismo de transferência de carga ou uma ligação química entre o metal e o adsorbato. A Figura 1.3 ilustra o espalhamento Raman amplificado relativo ao analito adsorvido na superfície de nanopartículas esféricas ao incidir o laser.

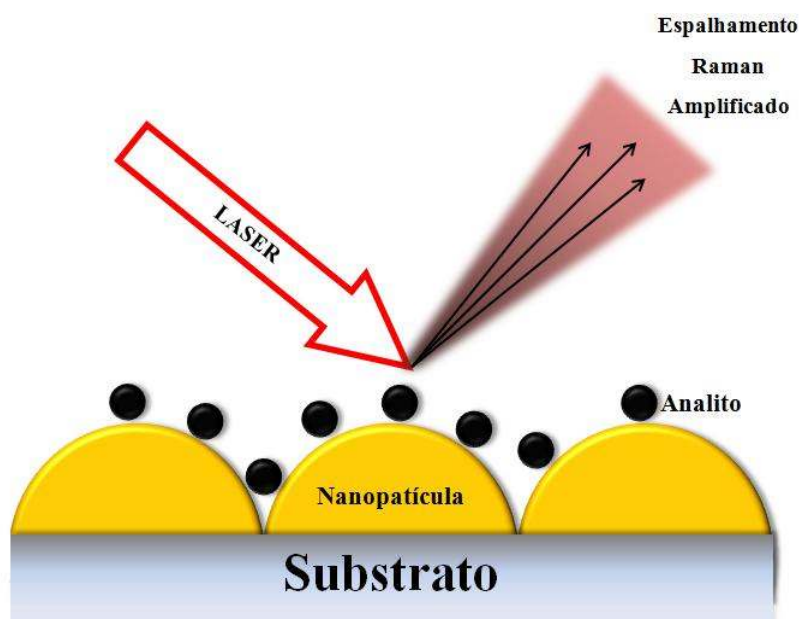


FIGURA 1.3 – Representação do espalhamento Raman amplificado devido à adsorção do analito na superfície de nanopartículas esféricas.

Neste modelo, um elétron do metal excitado por um fóton incidente é transferido para a molécula adsorvida. Quando ocorre a relaxação da molécula, o elétron retorna para o metal resultando uma molécula neutra vibracionalmente excitada e ocorre a emissão de um fóton³⁵.

Neste caso, há contato da molécula com a superfície e esta interação pode se dar pela formação de complexos de transferência de carga, ligações químicas convencionais com a superfície, ou ainda através de interações eletrostáticas (par iônico)²⁹. Os espectros obtidos podem divergir daqueles obtidos em solução, havendo mudanças em intensidades relativas, meia-largura, deslocamentos de frequências e até aparecimento de novas bandas²⁹.

Este mecanismo depende do sítio de adsorção, da geometria da ligação e dos níveis de energia da molécula adsorvida, provendo informações sobre a interação de quimissorção entre o analito e o metal. No entanto este modelo só é aplicado quando existe este tipo de interação³⁵, sendo que sua contribuição para o aumento da intensidade do sinal Raman é de 10 a 10^3 .

A natureza do adsorbato também é importante dentro do modelo químico já que a interação direta com a superfície depende da existência de átomos ou grupo de átomos que tenham afinidade química com a mesma²⁹. Moléculas que possuem par de elétrons livres e/ou elétrons π , como as que contêm átomos de enxofre, nitrogênio, anel aromático e grupo carboxílico, por exemplo, são particularmente promissoras na observação do efeito³⁶.

1.5 – Nanopartículas

As nanopartículas, principalmente as de ouro e prata, ganharam destaque devido suas propriedades óticas³⁷, elétricas³⁸, catalíticas³⁹ e biológicas⁴⁰ diferirem daquelas apresentadas pelos mesmos materiais em escala macroscópica

(bulk). Estas propriedades estão relacionadas com a composição, tamanho e forma das nanopartículas³⁷.

Para obtenção deste tipo de material, podem ser utilizados dois tipos de rotas de síntese, o top down e o bottom up (Figura 1.4).

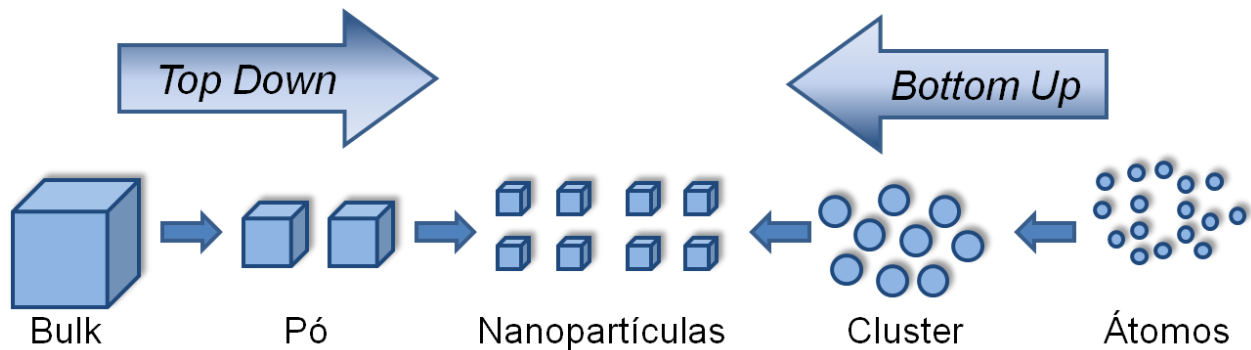


FIGURA 1.4 – Esquema ilustrativo das rotas de síntese top down e bottom up para formação de nanopartículas.

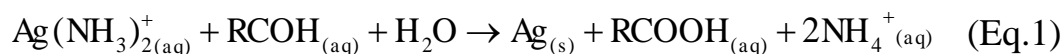
Nos métodos top down⁴¹, o material em escala macroscópica é submetido a processos físicos, no qual o material é quebrado até que as partículas finais tenham um tamanho nanométrico. Litografia⁴² e ablação a laser⁴³ são exemplos deste tipo de preparação. Os métodos bottom up são aqueles em que átomos, normalmente originados das reduções de íons, são aglomerados para formar uma estrutura maior de escala nanométrica. Estes métodos são baseados em reações químicas e são preferidos por serem mais simples e possibilitarem um maior controle do tamanho e forma do material nanométrico no processo de fabricação.

Em relação às sínteses químicas, estudos mostraram que o tamanho, morfologia, estabilidade e propriedades químicas e físicas das nanopartículas metálicas são fortemente influenciadas pelas condições experimentais e pela interação do íon metálico com o agente redutor⁴⁴. As nanopartículas de prata apresentam uma maior eficiência da excitação plasmon dentre os metais (Ag, Au e

Cu) que possuem plasmons ressonantes na região do visível, ou seja, elas conseguem capturar mais a luz incidida do que seria possível devido seu tamanho¹⁷.

Os procedimentos mais comuns encontrados na literatura para obtenção de nanopartículas de prata são por redução dos íons metálicos com borohidreto de sódio (Creighton)⁴⁵ ou citrato de sódio (Lee-Meisel)⁴⁶, no entanto, métodos mais recentes propõem o uso de outros agentes redutores, como glucose⁴⁷.

O método de Tollens (reagente de Tollens), conhecido como reação de espelho de prata, utiliza como agente redutor a glucose, que reduz os íons de prata a Ag^0 gerando as nanopartículas em apenas um passo (Eq. 1).



Em diversos trabalhos da literatura há a utilização do procedimento de Tollens modificado, no qual outros sacarídeos, como a maltose e lactose, são empregados como agentes redutores⁴⁸. Foi possível a obtenção de filmes com nanopartículas de tamanho de 50 a 200 nm, hidrosóis de prata com tamanho da ordem de 20 a 50 nm, sendo que os dissacarídeos produziram nanopartículas de tamanho menor que os monossacarídeos⁴⁸, evidenciando que a natureza do agente redutor influencia no tamanho e distribuição das partículas⁴⁹.

1.6 – Substratos

Desde a descoberta do efeito SERS, vários tipos de substratos foram testados e muitos estudos têm sido direcionados para a fabricação de um substrato ideal para SERS que seja de baixo custo, sensível, reprodutível, fácil manipulação e estável por um longo tempo de estocagem⁵⁰. Coloides metálicos são os substratos mais comumente utilizados, mas possuem baixa reprodutibilidade e estabilidade,

fazendo com que sua utilização para fins analíticos seja mais complexa, como em análise em fluxo¹⁰.

Para minimizar essa complexidade, a imobilização de nanopartículas metálicas em substrato sólido vem sendo extensivamente estudada. Principalmente devido ao interesse analítico, buscou-se a criação de substratos que fossem estáveis, fáceis de preparar, manipular e de baixo custo. A utilização do papel filtro com nanopartículas está se mostrando eficiente em análises rotineiras, sendo que a extensão de penetração das nanopartículas no papel é controlada pela porosidade (estrutura) e hidrofobicidade do papel utilizado⁵¹. Laserna e colaboradores^{52,53,54} reportaram diversas propriedades e morfologia das nanopartículas depositadas sobre papel filtro, além de apresentarem espectros reprodutíveis das moléculas de ácido aminobenzóico, acridina, entre outras.

Ngo e colaboradores⁷ fabricaram um substrato SERS, mergulhando o papel filtro em suspensão coloidal de nanopartículas de ouro. Este estudo foi realizado com diferentes tamanhos de partículas e em diferentes concentrações. Foi observado que a distribuição das nanopartículas na superfície celulósica não foi uniforme, além de haver pouca agregação entre elas. Foi concluído que a distribuição obtida das nanopartículas sobre o substrato produziu diferentes aumentos no sinal SERS, pois a cobertura não foi uniforme e não havia partículas agregadas para a formação de hot spots, que aumenta significativamente o sinal SERS. Para superar este problema, Cheng e colaboradores²⁷, propuseram outra metodologia, na qual o papel filtro é imerso na solução da reação de formação das nanopartículas de prata e só é retirado após o termino da síntese. Com este método, foi observado um alto grau de uniformidade e recobrimento da superfície do papel além de haver agregação das nanopartículas, o que aumenta a intensidade do sinal SERS.

1.7 – Planejamento experimental

A eficiência dos processos químicos podem ser melhorados com a otimização das variáveis que influenciam no processo, geralmente com realização de experimentos de rastreio que identifica os fatores significantes e que tem grande influencia sobre a resposta experimental. O objetivo, ao se realizar os experimentos, é descobrir a função que descreve o sistema, ou pelo menos, obter uma aproximação satisfatória para ela para escolher as melhores condições de operação do sistema⁵⁵. A Figura 1.5 ilustra uma situação em que certa quantidade k de fatores, atuando sobre o sistema de interesse, produz um número de respostas j . O sistema, portanto, atua como uma função, desconhecida inicialmente, que produz as respostas observadas a partir dos valores das variáveis de entrada (fatores). Com os valores de entrada e saída, é possível descobrir ou obter uma aproximação da função que descreve o sistema, proporcionando um melhor entendimento do processo em estudo e a operação do sistema em sua condição ótima.

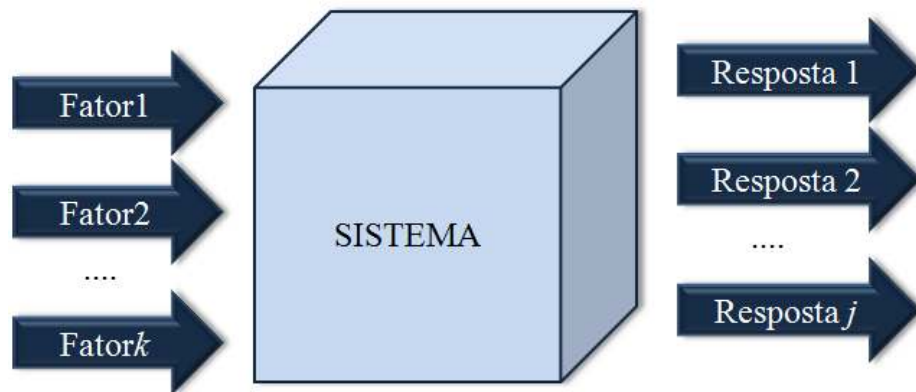


FIGURA 1.5 – O sistema em estudo pode ser descrito por uma função na qual os fatores são as variáveis de entrada e as respostas são as variáveis de saída.

Os fatores de um planejamento experimental são, normalmente, variáveis que o experimentador consegue controlar, podendo ser quantitativos ou

qualitativos⁵⁵. O método mais utilizado é o univariado, no qual consiste em selecionar uma configuração experimental de partida com valores para cada fator e então variar o valor de apenas um fator por vez, dentro de certa faixa, mantendo os outros constantes⁵⁶. No entanto, a desvantagem deste método é impossibilidade de estudar a interação entre os fatores, podendo levar a uma escolha incorreta de combinação dos valores dos parâmetros gerando uma resposta que pode não ser a ótima. Como este fato é desconhecido por grande parte dos experimentalistas ela é usada intensivamente⁵⁷.

Para levar em consideração a interação entre os fatores, são utilizados planejamentos multivariados, tais como o fatorial, composto central, Doehlert e outros, nos quais os fatores são variados simultaneamente, sendo possível investigar interações entre os parâmetros que influenciam nas repostas de interesse.

Como o número de ensaios possui um crescimento exponencial (2^k , onde k é o número de fatores), um número de fatores $k > 4$ torna a quantidade de experimentos requeridos impraticáveis para muitas aplicações⁵⁸. Para superar este problema é aplicado o experimento experimental fracionado, no qual apenas uma parte dos experimentos do planejamento total é realizada, identificando fatores significantes com o número mínimo de experimentos⁵⁷.

1.7.1 – Planejamento fatorial fracionado

Algumas vezes o planejamento fatorial completo não pode ser aplicado devido ao grande número de experimentos a ser realizado, podendo não ser vantajoso pelo tempo e gasto requeridos. Nestes casos a alternativa é aplicar o planejamento experimental fracionado já que não é necessário testar todas as combinações dos níveis dos fatores para estimar os efeitos importantes. Ao realizar este tipo de planejamento, alguns efeitos podem se confundir com outros, assim, deve-se garantir que efeitos de primeira ordem (efeito dos parâmetros isolados) não

se confundam com efeitos de ordem superior (efeitos provenientes da interação entre os parâmetros).

As confusões dos efeitos do planejamento fatorial fracionado são denominadas "resoluções", e estes são classificados de acordo com os padrões de associação que eles produzem. Os planejamentos de resolução III, IV e V são particularmente importantes e estão descritos abaixo⁵⁹:

a) Planejamento de resolução III - Nenhum efeito principal está associado com outro efeito principal, mas os efeitos principais estão associados com interações de segunda ordem e interações de segunda ordem podem estar associadas entre si.

b) Planejamento de resolução IV - Nenhum efeito principal está associado com qualquer outro efeito principal ou qualquer interação de segunda ordem, mas interações de segunda ordem estão associadas entre si.

c) Planejamento de resolução V - Nenhum efeito principal ou interação de segunda ordem está associado com qualquer outro efeito principal ou interação de segunda ordem, mas interações de primeira ordem estão associadas a interações de quarta ordem e interações de segunda ordem estão associadas com interações de terceira ordem.

1.7.2 – Planejamento composto central

Quando se deseja modelar um sistema, existem situações em que o modelo linear não é mais útil, então, torna-se necessário um modelo quadrático. O planejamento composto central é um dos mais utilizado dentre os planejamentos de experimentos de segunda ordem, sendo o planejamento estrela um planejamento do tipo composto central de dois fatores.

Para determinar todos os parâmetros da função o planejamento completo 2^k deve ser ampliado e, para isto, são necessários mais pontos, girados de

45° em relação aos pontos do planejamento inicial⁵⁵ (Figura 1.6). Geralmente são realizados experimentos em replicata no ponto central, para estimar o erro puro do modelo.

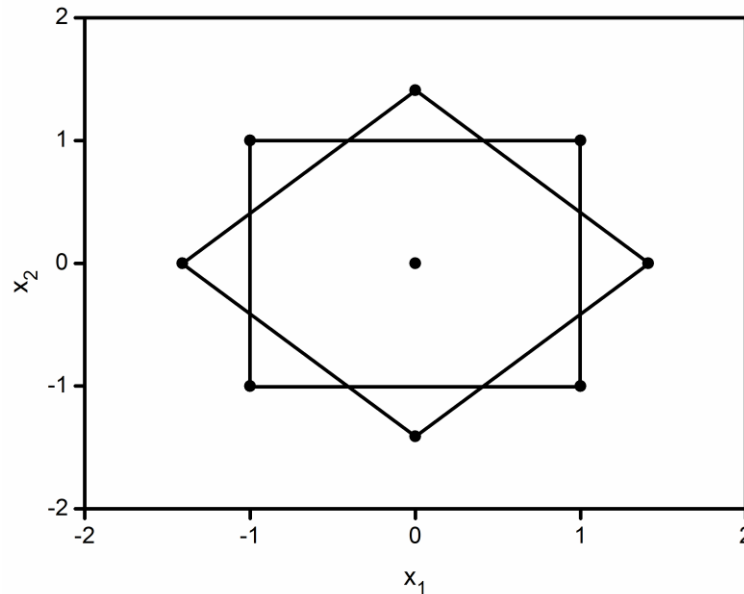


FIGURA 1.6 – Planejamento composto central com ponto central para dois fatores ($k = 2$).

No caso de um planejamento composto central para duas variáveis, o resultado é uma distribuição octogonal, com os novos pontos a uma distância $\sqrt{2}$ unidades do ponto central. Assim, todos os pontos do planejamento estão equidistantes do ponto central e a estimativa do erro pode ser distribuída igualmente por todo o modelo.

1.8 – Nicotinamida

Nicotinamida (Figura 1.7), também conhecida como niacinamida ou piridina-3-carboxamida, é uma amida derivada do ácido nicótico (niacina, vitamina PP ou B₃)⁶ e é um nutriente essencial, precursor da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), que

revertem os sintomas da pelagra⁶⁰, doença caracterizada por fraqueza, diarreia, dermatite e distúrbios do sistema nervoso⁶¹.

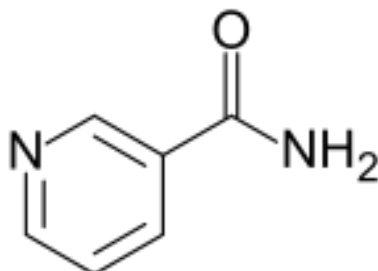


FIGURA 1.7 – Estrutura molecular da nicotinamida.

Ela tem demonstrado ações anti-inflamatórias benéficas em pacientes com inflamações na pele e acne⁶². Além disso, outros estudos também demonstraram que a nicotinamida diminui a ansiedade⁶³, previne a imunossupressão causada pela radiação UVA e UVB⁶⁴ podendo ser adicionada em bloqueadores solar⁶⁵, é um eficiente clareador de pele para uso tópico⁶⁶, possui propriedades antioxidantes⁶⁷, anti-carcinogênicas⁶⁵ e previne diabetes tipo I⁶⁸.

Está presente em uma grande variedade de processos biológicos incluindo produção de energia metabólica, síntese de ácidos graxos, colesterol e hormônios, transdução de sinal e manutenção da integridade do genoma⁶. Em altas doses a nicotinamida pode ser tóxica em adultos e para pessoas com diabetes, asma, doenças do fígado e úlcera⁶⁵.

A nicotinamida tem sido investigada por várias técnicas e métodos computacionais e já se tem reportado na literatura espectros Raman do estado sólido e em solução aquosa em diferentes pHs, mas poucos estudos foram feitos em SERS⁶.

A adsorção da nicotinamida em alumina recoberta com nanopartículas de prata⁶ e em coloides de prata⁶⁹ foi estudada em diferentes pHs via SERS. Em

ambos os casos, a molécula foi adsorvida na superfície dos substratos, e foi observada uma variação no espectro SERS com a variação do pH da solução do fármaco, revelando que duas espécies moleculares diferentes adsorvem na superfície da prata, a neutra, em pHs mais altos e a forma protonada, em pHs mais baixos. Com isto, ocorre uma mudança na orientação em relação à superfície dos coloides. A forma neutra da nicotinamida interage com a nanopartícula pelo nitrogênio do anel e isto é verificado pelo espectro SERS, que mostra uma banda intensa em 1029 cm^{-1} , que diminui drasticamente se a espécie protonada está adsorvida. Esta adsorve na superfície do coloide pelo grupo amida presente na molécula.

Outro estudo SERS com nicotinamida foi realizado para comparar a eficiência do aumento da intensidade em diferentes substratos para determinar a melhor condição de detecção da nicotinamida⁷⁰. Os espectros SERS da vitamina PP em coloides de ouro e prata e filme de ilhas de prata foram comparados com o espectro FT-Raman do sólido e notou-se que o substrato mais eficiente para o aumento da intensidade foi o coloide de ouro.

Também foi realizada uma análise quantitativa de nicotinamida em comprimidos de vitamina utilizando a técnica SERS em alumina revestida com nanopartículas de prata⁶¹. Neste estudo conseguiu-se quantificar a nicotinamida em baixas quantidades (ppm) em complexos comerciais de vitamina B₃.

1.9 – Ácido acetilsalicílico

O ácido acetilsalicílico (Figura 1.8) é um fármaco não esteroideal com propriedade anti-inflamatória, antipirética e analgésica⁷¹. É, em estado puro, um pó de cristalino branco ou cristais incolores, pouco solúvel na água e facilmente solúvel em álcool.

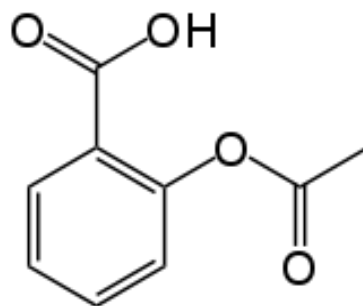


FIGURA 1.8 – Estrutura molecular do ácido acetilsalicílico.

Foi sintetizada por Hoffman em 1897 e introduzida para uso medicinal dois anos depois com o nome de aspirina⁷², sendo a droga mais prescrita e utilizada em todo mundo, especialmente para tratamento de dor e distúrbios e doenças inflamatórias⁷¹. Além disso, sintomas de doenças autoimunes são tratadas com altas doses deste medicamento⁷³.

A aspirina é um medicamento de baixo custo para o tratamento preventivo de doenças cardiovasculares. Com ingestão de baixas doses por dia, ela tem o potencial de reduzir a taxa eventos vasculares recorrentes, diminuindo o risco de infarto do miocárdio, e diminuindo o risco de problemas gastrointestinais causados por doses altas, já que, longos tempos de uso e altas doses deste fármaco aumenta-se o risco de desenvolver ferimentos nesta região⁷³. Intoxicações acidentais em crianças ocorrem já que há uma facilidade no acesso a esta droga⁷².

Mesmo sendo um dos fármacos mais importantes historicamente, até a presente data foram encontrados apenas dois artigos na literatura, descritos ao longo desta seção, investigam seu efeito SERS⁷⁴. Como a água é o solvente mais comum em análises SERS, a maior parte dos compostos estudados é solúvel em água. Para compostos insolúveis em água, condições específicas devem ser escolhidas para conseguir transferir as moléculas para os sítios ativos do substrato. Garrell⁷⁶ e colaboradores prepararam nanopartículas de prata em diferentes solventes não aquosos por redução de nitrato de prata com borohidreto de sódio e

mostraram que alguns deles poderiam ser utilizados em SERS. Hutchinson⁷⁷ e colaboradores utilizaram solventes orgânicos miscíveis em água para fabricar nanopartículas de prata para serem utilizadas em análises SERS. Diferentes métodos são apresentados na literatura, contudo, não houve realização de testes para verificar atividade SERS⁷⁵.

Para obtenção do espectro SERS do ácido acetilsalicílico, Wang e colaboradores⁷⁵ utilizaram um método de extração baseado na afinidade entre o analito e a superfície da nanopartícula de prata. Os hidrossóis de prata foram preparados por redução do nitrato de prata com borohidreto de sódio. Para dissolver o ácido acetilsalicílico, foi utilizado clorofórmio. A solução do analito foi misturada com a solução de hidrossóis de prata e, após deixar a mistura separar em duas fases, a fase aquosa foi retirada e analisada via SERS.

Foi observado que as posições dos picos do espectro SERS foram equivalentes aos que aparecem no espectro Raman normal, porém foi possível notar diferenças entre os dois. Além disso, muitos picos que aparecem no espectro Raman do ácido acetilsalicílico sólido desapareceram no espectro SERS, enquanto outros picos se tornaram mais intensos.

Em outro trabalho⁷⁴, foram feitos filmes de prata para estudo SERS preparados por deposição a vapor em superfície de CaF_2 , em câmara de vácuo. Pipetou-se a solução do adsorbato deixando o solvente evaporar, formando uma monocamada do analito no filme de prata. O acetilsalicílico foi depositado no filme de prata com acetona, metanol e n-heptano para observar variações nas propriedades de adsorção do adsorbato.

Todos os espectros SERS foram diferentes do espectro Raman da aspirina em pó. Todos os picos que aparecem no espectro SERS para cada um dos solventes orgânicos estão na mesma frequência, mas há algumas diferenças sutis na intensidade relativa entre eles, fato atribuído pela diferença de morfologia dos

substratos. As similaridades observadas em todos os espectros SERS confirmam que o ácido acetilsalicílico foi adsorvido no filme de prata em sua forma iônica, independentemente da polaridade ou propriedade prótica e aprótica do solvente. A presença de modos vibracionais no plano e fora do plano no espectro SERS e a ausência do estiramento C=O do grupo éster em 1750 cm^{-1} implica que o íon acetilsalicílico adsorve na superfície pelo grupo COO^- .

Firkala⁷⁸ e colaboradores recentemente aplicaram a técnica SERS para analisar a distribuição espacial de baixas concentrações de ácido acetilsalicílico em comprimidos manipulados. Foram utilizados coloides de prata, que foram gotejados na superfície do comprimido, além de utilizar ferramentas quimiométricas para o tratamento das imagens. A técnica se mostrou promissora para a detecção do princípio ativo em baixas concentrações, mas não houve quantificação do analito em questão na amostra analisada.

1.10 – Objetivos

O objetivo geral deste trabalho está relacionado com o desenvolvimento de um procedimento analítico para determinação de princípios ativos em produtos comerciais utilizando espectroscopia Raman amplificada por superfície, já que na literatura há poucos relatos de trabalhos que empregam esta técnica para quantificação. De forma mais detalhada, o objetivo do trabalho pode ser dividido em:

- ❖ Otimização da síntese de nanopartículas de prata para maximização da intensidade de sinal utilizando o reagente de Tollens e papel filtro como superfície de deposição das nanopartículas.

- ❖ Desenvolvimento de um procedimento analítico para análise de nicotinamida e ácido acetilsalicílico em produtos farmacêuticos utilizando a técnica proposta. Verificação da influência de interferentes presentes nas amostras.

- ❖ Quantificação de nicotinamida e ácido acetilsalicílico nas amostras comerciais e comparação com o método por cromatografia líquida de alta eficiência

Capítulo 2- PARTE EXPERIMENTAL

2 – PARTE EXPERIMENTAL

2.1 – Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico (PA), e todas as soluções foram preparadas em água deionizada à temperatura ambiente. As soluções de nitrato de prata (Vetec, 99,8%), glucose (Synth, 99,8%) e hidróxido de amônio (Synth, 27,0%), foram preparadas previamente ao uso nas concentrações de cada experimento do planejamento experimental.

A solução estoque de nicotinamida na concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,1221 g de nicotinamida (Aarti Drugs Ltd.) em 10 mL de água deionizada e as demais soluções foram preparadas a partir desta diluindo-se em água deionizada. A solução estoque de ácido acetilsalicílico na concentração de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ foi preparada dissolvendo-se 0,1801 g de ácido acetilsalicílico (All Chemistry) em 10 mL de etanol (Chemis, 99,5%) e as demais soluções foram preparadas a partir desta diluindo-se em etanol.

Foram preparadas soluções estoque de hidróxido de sódio (Synth, 97%) e ácido clorídrico (Synth, 33%) de concentrações $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ para ajustar o pH das soluções de nicotinamida em diferentes concentrações.

Foram utilizadas micropipetas volumétricas de 100 e 1000 μL e 5 mL, todas com ponteiros descartáveis de polietileno. Todo o material utilizado (béqueres, balão volumétrico, etc.), passou por um procedimento de limpeza adotado com o intuito de assegurar a ausência que qualquer resíduo que pudesse interferir nas medidas e na formação das nanopartículas. Para isto, foi utilizada uma solução de HNO_3 (Synth, 63%) e posterior lavagem com detergente e água deionizada.

2.2 – Amostras analisadas

A amostra de nicotinamida em gel (Papules[®]) e comprimido de ácido acetilsalicílico (AAS[®] Adulto) utilizado para a determinação dos princípios ativos foram obtidos em farmácia local.

O gel de nicotinamida, além do princípio ativo, possui em sua formulação glicerina, propilenoglicol, carbomero, metilparabeno essência de alecrim, álcool a 96°GL e água destilada, usados como excipientes. O comprimido de ácido acetilsalicílico, além do princípio ativo, possui em sua formulação amido de milho e croscarmelose sódica como excipientes.

2.2.1 – Preparação da amostra para determinação de nicotinamida

Utilizou-se como amostra um medicamento na forma de gel vendido comercialmente de concentração 4,0 mg de nicotinamida por grama do gel. Uma massa de 0,0763 g pesada em balança analítica foi transferida para um béquer de 10 mL e adicionada água deionizada. Em seguida, o béquer foi deixado em ultrassom por 30 minutos, dissolvendo completamente a amostra. Completou-se o volume para 25 mL em um balão volumétrico.

2.2.2 – Preparação da amostra para determinação de ácido acetilsalicílico

Utilizou-se como amostra comprimidos vendidos comercialmente contendo 500 mg de ácido acetilsalicílico por comprimido. Para preparação da solução estoque, dez comprimidos foram macerados e uma massa de 0,0261 g foi transferida para um béquer de 10 mL e adicionado etanol. Em seguida, o béquer foi deixado em ultrassom por 30 minutos e a solução foi filtrada para retirar o

sobrenadante. Completou-se o volume com etanol para 25 mL em um balão volumétrico.

2.3 – Instrumentação

As medidas espectrométricas foram realizadas em um espectrômetro Raman B&W Tek modelo BWS 415-785H interfaciado a um computador e gerenciado pelo software B&WSpec 3.27.

Foi utilizada uma chapa de aquecimento IKA[®]C-MAG, modelo HS 7 para realização do aquecimento da síntese e um ultrassom Ultracleaner modelo 1400 para limpeza do substrato e diluição das amostras.

Para as medidas de pH das soluções foi utilizado um pHmetro Hanna, modelo pH 21. Todas as pesagens foram feitas utilizando-se uma balança analítica BEL Engineering, modelo Mark 210A com precisão de $\pm 0,1$ mg.

Para caracterização do substrato, foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura Philips XL-30 do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa/UFSCar), um difratômetro de raio-X Shimadzu XDR 6000 (LIEC/UFSCar) e um espectrômetro de infravermelho Agilent Scalibur 640. Para as análises quantitativas do método de referência, foi utilizado um HPLC Agilent Technology 1200 Series com detector UV-Vis.

2.4 – Otimização da preparação do substrato e metodologia

A síntese de nanopartículas de prata adsorvidas em papel filtro comercial foi feita a partir do método de Tollens, similar à parte experimental descrita no artigo de Cheng²⁷ e colaboradores. No entanto, foram realizados planejamentos experimentais com o intuito de maximizar o sinal SERS gerado. Nesta etapa, foi

utilizada uma solução de nicotinamida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para monitorar o sinal SERS em cada síntese.

Inicialmente, foi deixado um béquer com água deionizada em banho-maria e foi adicionada, primeiramente, a solução de nitrato de prata ao béquer e esperou-se a solução atingir à temperatura adequada. Após, adicionou-se a solução de hidróxido de amônio formando um precipitado marrom, que logo foi dissolvido, e a solução tornou-se novamente incolor. Ao fim, foi adicionada a solução de glucose, previamente aquecida à temperatura da reação, seguida da imersão do papel filtro, pré-tratado e cortado em $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$, posicionado verticalmente no béquer com auxílio de uma pinça. A solução foi deixada em agitação de 850 rpm para obter uma cobertura uniforme no papel filtro. A Figura 2.1 ilustra o procedimento descrito anteriormente.

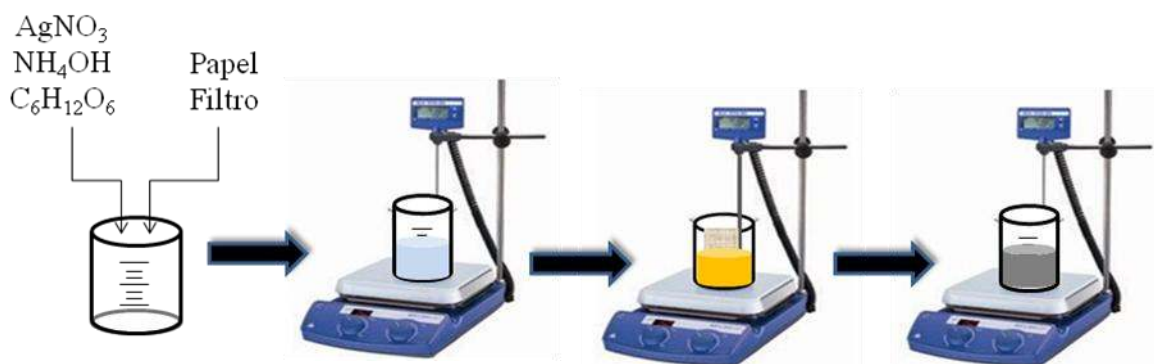


FIGURA 2.1 – Ilustração do procedimento realizado para síntese de nanopartículas de prata suportadas em papel filtro.

Terminada a reação, o papel filtro coberto com nanopartículas de prata foi retirado da solução, lavado com água deionizada em ultrassom por dez minutos e em metanol por um minuto. O substrato foi deixado secar em temperatura ambiente e, logo após, foi colocado em uma solução de nicotinamida de concentração $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O substrato foi mantido imerso na solução por uma

hora para adsorção do fármaco. Após este tempo, o substrato foi retirado da solução e deixado secar, durante vinte minutos, em temperatura ambiente e foram adquiridos os espectros logo em seguida.

2.4.1 – Planejamento fatorial fracionado

Para conseguir maximizar o aumento do sinal SERS e verificar quais variáveis eram as mais influentes na síntese, foi realizado um planejamento experimental fatorial fracionado 2_{IV}^{7-3} . Este planejamento foi classificado como 2_{IV}^{7-3} pois os parâmetros foram variados em dois níveis, alto e baixo, e três variáveis que foram supostas menos significativas foram combinações das variáveis restantes (supostas como sendo mais significativas). Além disso, este planejamento possui resolução IV, pois nenhum efeito principal está associado com qualquer outro efeito principal ou qualquer interação de segunda ordem, mas interações de segunda ordem estão associadas entre si.

Os parâmetros estudados no planejamento fatorial fracionado foram: concentração dos reagentes, tempo e temperatura da reação, tipo e pré-tratamento do papel filtro. Eles estão listados na Tabela 2.1 com seus respectivos valores no nível mais baixo, mais alto e no ponto central. O ponto central foi feito em triplicata utilizando os valores citados no trabalho de Cheng e colaboradores²⁷. Optou-se por utilizar o planejamento fatorial fracionado para reduzir o número de experimentos. Para isto, três variáveis foram escolhidas para serem combinações entre as variáveis restantes. A Tabela 2.2 apresenta as relações geradoras utilizadas para definir os níveis, em cada experimento, das três variáveis escolhidas como sendo as menos significativas e a Tabela 2.3, as condições em que foi realizado cada experimento.

TABELA 2.1 – Parâmetros de estudo do planejamento fracionado 2^{7-3}_{IV} e os valores nos níveis alto (+1), baixo (-1) e ponto central (0).

Nível	A	B	C	D	E	F	G
1	75	450	750	8	65	HNO ₃	Quantitativo (7–12 μm)
0	50	300	500	6	55	NH ₄ OH	Qualitativo (4–12 μm)
-1	25	150	250	4	45	–	Quantitativo (1–2 μm)

A = [AgNO₃] (mmol L⁻¹), B = [NH₄OH] (mmol L⁻¹), C = [C₆H₁₂O₆] (mmol L⁻¹), D = Tempo de reação (min), E = Temperatura da reação (°C), F = Pré-tratamento do papel filtro (10% v/v), G = Tipo de papel filtro.

TABELA 2.2 – Relações geradoras utilizadas para construção do planejamento fatorial fracionado de resolução IV e as variáveis a que se referem.

Relação Geradora	Interação	Variável
I ₁	BCDE	E
I ₂	ACDF	F
I ₃	ABDG	G

A = [AgNO₃] (mmol L⁻¹), B = [NH₄OH] (mmol L⁻¹), C = [C₆H₁₂O₆] (mmol L⁻¹), D = Tempo de reação (min), E = Temperatura da reação (°C), F = Pré-tratamento do papel filtro (10% v/v), G = Tipo de papel filtro.

TABELA 2.3 – Condições reacionais de cada experimento do planejamento fatorial fracionado.

Experimento	A	B	C	D	E	F	G
1	25	150	250	4	45	–	1–2
2	25	150	250	8	65	HNO ₃	7–12
3	25	150	750	4	65	HNO ₃	1–2
4	25	150	750	8	45	–	7–12
5	25	450	250	4	65	–	7–12
6	25	450	250	8	45	HNO ₃	1–2
7	25	450	750	4	45	HNO ₃	7–12
8	25	450	750	8	65	–	1–2
9	75	150	250	4	45	HNO ₃	7–12
10	75	150	250	8	65	–	1–2
11	75	150	750	4	65	–	7–12
12	75	150	750	8	45	HNO ₃	1–2
13	75	450	250	4	65	HNO ₃	1–2
14	75	450	250	8	45	–	7–12
15	75	450	750	4	45	–	1–2
16	75	450	750	8	65	HNO ₃	7–12

A = [AgNO₃] (mmol L⁻¹), B = [NH₄OH] (mmol L⁻¹), C = [C₆H₁₂O₆] (mmol L⁻¹), D = Tempo de reação (min), E = Temperatura da reação (°C), F = Pré-tratamento do papel filtro (10% v/v), G = Tipo de papel filtro (µm).

Para a análise dos dados, foi utilizado o valor de intensidade do pico em 1031 cm⁻¹, já que este apresentou a maior intensidade de sinal no espectro da nicotinamida, como mostra a Figura 2.2.

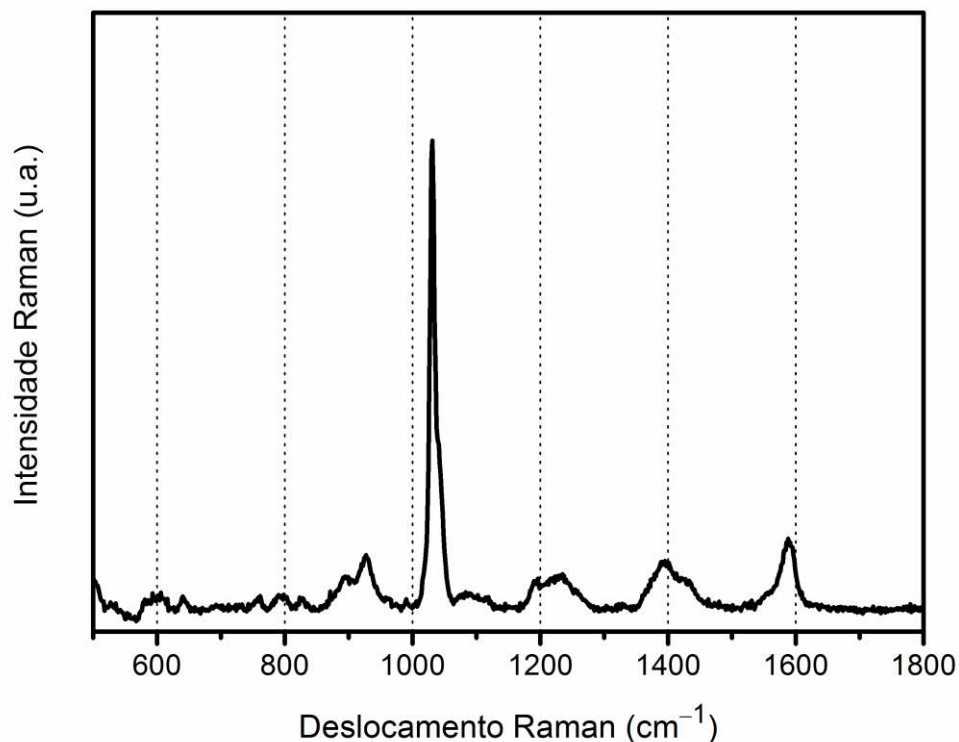


FIGURA 2.2 – Espectro SERS da nicotinamida obtido utilizando o substrato sintetizado.

Em cada experimento foram adquiridos dez espectros, sendo retirados os dois maiores e os dois menores valores de intensidade, resultando apenas seis valores de intensidade, com os quais foi calculada a média. Foi adotada esta estratégia para obter um valor mais representativo de todo substrato. Não foi adquirida uma maior quantidade de espectros já que, em tempos muito longos, a intensidade do sinal do espectro diminuía consideravelmente. Devido à variação de coloração do papel com nanopartículas em cada experimento, diferentes valores de potência do laser foram incididas sobre o substrato para cada análise, para evitar fundo térmico e queima do substrato. Para comparação dos resultados finais do planejamento, os valores de intensidade foram normalizados para uma potência de laser de 3,16 mW.

2.4.2 – Planejamento composto central

A concentração de nitrato de prata e de glucose foram as variáveis para o planejamento composto central (CCD) por terem se apresentado as mais importantes no planejamento fracionado. Os parâmetros: concentração de hidróxido de amônio, tempo de reação, temperatura e tipo de papel filtro, foram fixados utilizando os valores utilizados no melhor experimento do planejamento fatorial fracionado. O pré-tratamento com hidróxido de amônio foi escolhido já que o tratamento com ácido nítrico danificava a estrutura do papel sendo que este se desintegrava com facilidade.

A Tabela 2.4 lista os valores dos parâmetros em cada nível do CCD.

TABELA 2.4 – Parâmetros de estudo do planejamento composto central e os respectivos valores nos níveis (+1,41), (+1), (-1), (-1,41) e o ponto central (0).

Nível	[AgNO ₃] (mmol L ⁻¹)	[C ₆ H ₁₂ O ₆] (mmol L ⁻¹)
-1,41	40	396
-1	50	500
0	75	750
1	100	1000
1,41	110	1103

Os valores de concentração de nitrato de prata e de glucose no ponto central do CCD foram aqueles que geraram o melhor resultado no planejamento fracionado. Este novo planejamento foi composto por oito experimentos e mais três experimentos relativos ao ponto central. As condições em que foi realizado cada experimento estão apresentadas na Tabela 2.5.

TABELA 2.5 – Condições reacionais de cada experimento do planejamento composto central.

Experimento	[AgNO ₃] (mmol L ⁻¹)	[C ₆ H ₁₂ O ₆] (mmol L ⁻¹)
1	50	500
2	50	1000
3	100	500
4	100	1000
5	40	750
6	110	750
7	75	396
8	75	1103

Para a análise dos dados, foi utilizado o valor de intensidade do pico em 1031 cm⁻¹ que aparece no espectro da nicotinamida.

Da mesma maneira que no planejamento fracionado, foram adquiridos dez espectros em cada experimento sendo retirados os dois maiores e os dois menores valores de intensidade, resultando seis valores de intensidade, com os quais foi calculada a média. Devido a pouca variação de coloração do substrato em cada experimento, foi incidida uma potência do laser de 3,16 mW em todas as análises, devido à coloração cinza escuro do papel.

2.4.3 – Estudo da variação da intensidade do sinal com o tempo de adsorção

Foi feita uma solução padrão de ácido acetilsalicílico e nicotinamida, ambos em uma concentração de 1,0 mmol L⁻¹. Com a melhor reação obtida pelo CCD, foi sintetizado o substrato e esse cortado verticalmente em seis partes, que foram colocadas, em ordem aleatória, em seis béqueres contendo a solução do

princípio ativo em estudo. Os papéis foram retirados de cada béquer em diferentes tempos (0, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos), deixados secar e analisados por espectroscopia Raman.

2.4.4 – Estudo da variação da intensidade do sinal com o tempo de reação

A fim de analisar o tempo necessário que se deve deixar o substrato imerso na solução do princípio ativo para se ter a máxima adsorção do analito, o papel filtro coberto com nanopartículas foi cortado verticalmente em seis partes iguais e imersos, em ordem aleatória, em seis béqueres contendo uma solução de concentração 1 mmol L^{-1} do analito estudado.

Cada tira de papel foi removida da solução em diferentes tempos de adsorção (1, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos). Após o tempo de adsorção, eles foram deixados secar em temperatura ambiente por 20 minutos, para a nicotinamida, e 10 minutos, para o ácido acetilsalicílico. Foi feita a análise por espectroscopia Raman utilizando um tempo de integração de 30 segundos e uma potencia de laser de 3,16 mW. Para cada tempo de adsorção, foram adquiridos 12 espectros do substrato. Os dois valores de intensidade mais altos e os dois mais baixos foram retirados, e com os oito espectros restantes foram calculadas as intensidades médias para cada tempo de adsorção.

2.4.5 – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de nicotinamida

O método utilizado foi Cromatografia líquida, adaptado da literatura⁷⁹. A fase móvel consistiu de 20 mmol L^{-1} de acetato de amônio ajustado para pH 5,0 com ácido acético – acetonitrila (80: 20, v/v) e vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura

de 25°C, tempo de corrida 20 min, sendo o tempo de retenção para a nicotinamida de aproximadamente 2 minutos. As soluções para construção da curva analítica foram preparadas diluindo-se a solução estoque na fase móvel. A faixa da curva analítica foi de 0,08 mmol L⁻¹ a 0,8 mmol L⁻¹.

2.4.6 – Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinação de ácido acetilsalicílico

O método utilizado foi cromatografia líquida, adaptado da literatura⁸⁰. A fase móvel consistiu de acetonitrila – água (20:80) ajustada para pH 2,5 com ácido fosfórico, temperatura de 25°C, tempo de corrida de 10 minutos, fluxo foi de 1 mL min⁻¹, sendo o tempo de retenção para o AAS de 7 minutos. As soluções para construção da curva analítica foram preparadas diluindo-se a solução estoque na fase móvel. A faixa da curva analítica foi de 0,06 mmol L⁻¹ a 0,55 mmol L⁻¹.

Capítulo 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão apresentados os resultados obtidos nos experimentos realizados no planejamento fatorial fracionado, no planejamento composto central e na quantificação de nicotinamida e ácido acetilsalicílico em produtos comerciais. Os resultados estão acompanhados de uma breve discussão e, quando necessário, de observações experimentais.

3.1 – Planejamento experimental fatorial fracionado

Os dados obtidos a partir dos espectros de cada planejamento estão apresentados na Tabela 3.1, com as respectivas potências de laser utilizadas em cada análise, o valor da média das intensidades de seis espectros para cada experimento e este valor normalizado para uma potência do laser de 3,16 mW.

A partir dos resultados obtidos para o planejamento fatorial fracionado, foi feita uma análise para verificar quais os parâmetros estudados tinham maior influência experimental. Para tal, os valores dos efeitos de cada parâmetro analisado e de suas interações foram calculados e estão apresentados na Tabela 3.2 em ordem de significância e ilustrados na Figura 3.1.

TABELA 3.1 – Tabela dos resultados do planejamento fracionado contendo as potências utilizadas para cada experimento, o valor da média das intensidades do sinal SERS em 1031 cm^{-1} e sua normalização para uma potência do laser de 3,16 mW.

Experimento	Potência do Laser (mW)	Intensidade media (u.a.)	Intensidade normalizada (u.a.)
Ponto Central 1	15,8	2792	558
+Ponto Central 2	15,8	1582	316
Ponto Central 3	15,8	1921	384
1	94,8	860	29
2	63,2	130	7
3	31,6	21688	2169
4	3,16	6676	6676
5	47,4	3287	219
6	63,2	281	14
7	63,2	63	31
8	3,16	4284	4284
9	15,8	493	99
10	15,8	1022	205
11	3,16	14311	14312
12	3,16	16706	16706
13	31,6	885	89
14	15,8	4403	881
15	15,8	6100	1220
16	3,16	13699	13699

O experimento 12 do planejamento fatorial fracionado (Tabela 3.1) apresentou o maior valor de intensidade do sinal. Neste experimento foram utilizados 75 mmol L⁻¹ de nitrato de prata, 150 mmol L⁻¹ de hidróxido de amônio, 750 mmol L⁻¹ de glucose, com um tempo de reação de 8 minutos a uma temperatura de 45°C para sintetizar nanopartículas de prata depositadas em papel filtro quantitativo, de porosidade 1–2 µm, pré-tratado com ácido nítrico (10%, v/v) por 3 horas.

TABELA 3.2 – Valores reais e absolutos dos contrastes de cada parâmetro do planejamento fracionado em ordem crescente.

Efeitos	Valor real	Valor (% , utilizando valores absolutos)
[C ₆ H ₁₂ O ₆]	7191	40,4
[AgNO ₃]	4226	14
[C ₆ H ₁₂ O ₆] e [AgNO ₃]	3975	12,3
Tempo	3042	7,2
[C ₆ H ₁₂ O ₆] e Tempo	2874	6,5
[NH ₄ OH] e [C ₆ H ₁₂ O ₆]	-2690	5,7
[NH ₄ OH]	-2474	4,8
[C ₆ H ₁₂ O ₆], [AgNO ₃] e [NH ₄ OH]	-1501	1,8
Tipo de Papel	1397	1,5
[AgNO ₃] e [NH ₄ OH]	-1384	1,5
[AgNO ₃] e Tipo de papel	1295	1,3
[AgNO ₃] e Temperatura	1180	1,1
Temperatura	1169	1,1
[AgNO ₃] e Tempo	901	0,6
Pré-Tratamento	620	0,3

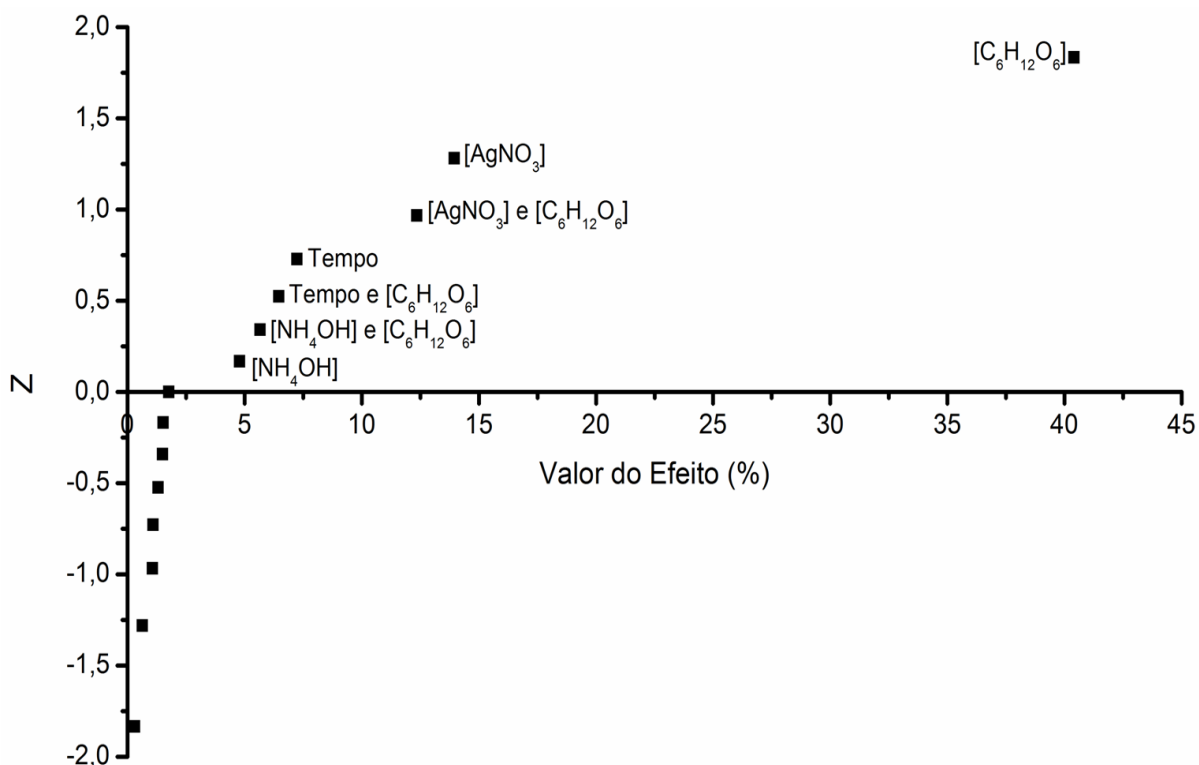


FIGURA 3.1 – Gráfico de probabilidade normal dos valores dos efeitos, em porcentagem, de cada parâmetro do planejamento fatorial fracionado.

De acordo com os valores apresentados na Tabela 3.2 e com a Figura 3.1, é possível afirmar que o fator mais significativo para obtenção do aumento da intensidade do sinal SERS foi a concentração de glucose. Logo em seguida, a concentração de nitrato de prata, a interação entre a concentração de glucose e de nitrato de prata, o tempo de reação e sua interação com a concentração de prata também foram significativos. Ademais, o valor real dos efeitos de cada um destes parâmetros foi positivo, isto é, quanto maior o valor de cada um dos fatores, maior será a intensidade do sinal SERS.

3.2 – Planejamento composto central

Para a execução dos experimentos do planejamento composto central, foi avaliada apenas a concentração de nitrato de prata e glucose, já que estes fatores, e a interação entre eles foram os mais significativos do planejamento fatorial fracionado. Assim, os valores da concentração de hidróxido de amônio, tempo e temperatura da reação e tipo de papel filtro foram fixados de acordo com os valores utilizados no melhor experimento do planejamento fatorial fracionado. No entanto, o pré-tratamento do papel filtro foi modificado, utilizando hidróxido de amônio (10%, v/v) em vez do tratamento com ácido nítrico, já que com o tratamento ácido, o papel ficou com sua superfície danificada, além do que o planejamento fracionado não mostrou importância com relação ao tipo de pré-tratamento.

Os valores da intensidade SERS obtidos para cada experimento do planejamento composto central se encontram na Tabela 3.3. Observa-se que o melhor resultado foi obtido no experimento 1.

TABELA 3.3 – Tabela dos resultados do planejamento composto central. A intensidade média refere-se ao sinal SERS em 1031 cm^{-1} para seis espectros, utilizando laser a 3,16 mW.

Experimento	Intensidade média (u.a.)
Ponto Central 1	19222
Ponto Central 2	21699
Ponto Central 3	16283
1	26129
2	21008
3	11263
4	19558
5	22235
6	19817
7	15953
8	21228

Um modelo quadrático (Eq. 1) foi proposto para este sistema e os valores dos coeficientes angulares e linear foram calculados para um intervalo de 90% e 95% de confiança (Tabela 3.4).

$$Y = B_0 + B_{Ag}X_{Ag} + B_{Glu}X_{Glu} + B_{Ag-Glu}X_{Ag}X_{Glu} + B_{Agq}X_{Ag}^2 + B_{Gluq}X_{Glu}^2 \quad (\text{Eq.1})$$

TABELA 3.4 – Valores dos coeficientes linear e angular do modelo quadrático proposto com seus respectivos valores máximos e mínimos com intervalo de confiança de 90% e 95%.

Coeficiente	Valor	90%		95%	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
b_0	19068	15861	22274	14977	23159
b_{Ag}	-2467	-4431	-503	-4972	38
b_{Glu}	1329	-635	3293	-1176	3834
b_{Ag-Glu}	3354	577	6131	-189	6897
b_{Agq}	899	-1438	3237	-2083	3881
b_{Gluq}	-318	-2655	2019	-3300	2663

A 95% de confiança, todos os valores dos coeficientes, exceto o coeficiente linear, estão dentro de uma faixa que passam pelo zero. A 90% de confiança, somente o coeficiente linear e os coeficientes angulares b_{Ag} e b_{Ag-Glu} não passam pelo zero. Com isto, a 95% de confiança, pode ser concluído que nenhum dos coeficientes do modelo quadrático contribui significativamente para o modelo, ou seja, a construção de uma superfície de resposta a partir do modelo quadrático proposto (Eq. 1) não é adequada para representar os dados reais, já que ela não prediz os valores de intensidade observados. Ainda assim, para comprovar esta afirmação, foi construída uma tabela ANOVA (Tabela 3.5) para verificar o ajuste quadrático do modelo proposto.

TABELA 3.5 – Tabela ANOVA referente ao modelo quadrático proposto para o planejamento composto central.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$1,14 \cdot 10^8$	5	$2,29 \cdot 10^7$
Resíduos	$3,80 \cdot 10^7$	5	$7,60 \cdot 10^6$
Falta de Ajuste	$2,33 \cdot 10^7$	3	$7,76 \cdot 10^6$
Erro puro	$1,47 \cdot 10^7$	2	$7,35 \cdot 10^6$
TOTAL	$1,52 \cdot 10^8$	10	
r^2	0,75		
$r^2_{\text{máx}}$	0,90		
Teste F Regressão	3,01	$F_{\text{tabelado}} (5,5)$	5,05
Teste F falta de ajuste	1,06	$F_{\text{tabelado}} (3,2)$	19,16

De acordo com os valores apresentados na Tabela 3.5, a equação quadrática proposta (Eq. 1) consegue explicar apenas 61% do valor observado. Foi realizado o teste F da regressão e da falta de ajuste para averiguar a adequabilidade do modelo. O teste F para a regressão determina se a variância explicada pela regressão é significativamente maior que a variância dos resíduos. O teste F para falta de ajuste verifica se a variância dos erros vem principalmente da falta de ajuste ou do erro puro.

Conforme a Tabela 3.5, o valor obtido para o teste F da regressão não foi muito maior que o valor de F_{tabelado} , indicando que o modelo contribui pouco para a variância da resposta. Ainda, o valor obtido para o teste F da falta de ajuste do modelo de regressão foi menor que o F_{tabelado} , informando que a equação utilizada

não é adequada, já que o modelo não se ajusta adequadamente aos valores observados, apresentando alta falta de ajuste.

Sendo assim, a Eq.1 proposta não foi utilizada para a construção da superfície de resposta devido à falta de ajuste e dificuldade de predição dos valores observados. Como os valores da intensidade não se comportaram de maneira quadrática em relação às variáveis estudadas não foi possível modelar o sistema. Devido a este fato, a superfície apresentada na Figura 3.2 foi construída a partir dos valores reais obtidos nos experimentos realizados no planejamento composto central. No entanto, foi possível obter uma resposta ótima, que se encontra no extremo inferior esquerdo da superfície da Figura 3.2 com um aumento de 63 vezes em relação ao valor obtido no ponto central do planejamento fatorial fracionado. Para averiguar se este era realmente o ponto ótimo e não um máximo local, três experimentos adicionais foram realizados em torno deste ponto. É possível notar que os valores da intensidade dos experimentos adicionais decaem, o que confirma que o experimento 1 é o ponto ótimo do planejamento composto central.

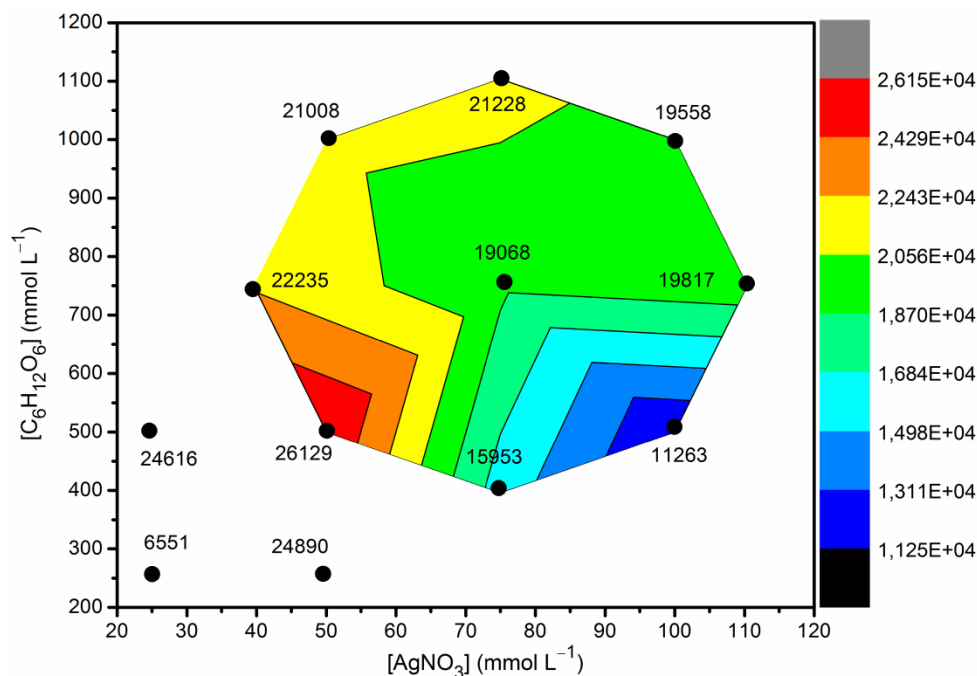


FIGURA 3.2 – Superfície de resposta do planejamento composto central utilizando os valores empíricos de intensidade do sinal SERS em 1031 cm^{-1} do espectro da nicotinamida com os valores obtidos nos experimentos adicionais.

3.3 – Variação do sinal com o tempo de adsorção

O tempo de adsorção da nicotinamida e do ácido acetilsalicílico foram investigados separadamente para avaliar o tempo ideal na qual a intensidade do sinal SERS seria ótima. O resultado deste estudo pode ser observado na Figura 3.3. A intensidade do sinal SERS foi monitorada em 1031 cm^{-1} para a nicotinamida e em 806 cm^{-1} para o ácido acetilsalicílico, já que este fármaco apresentou uma maior intensidade do sinal nesta região, como mostra a Figura 3.4.

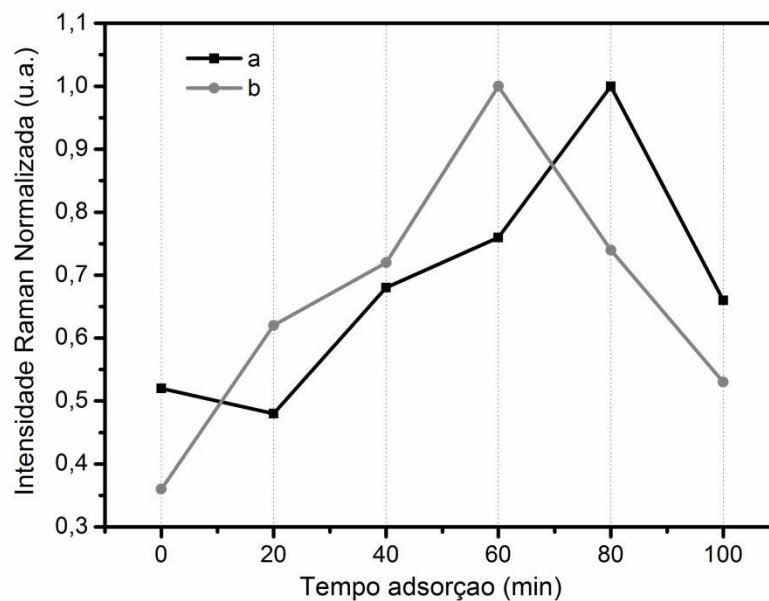


FIGURA 3.3 – Intensidade normalizada para solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido acetilsalicílico (a) e para solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de nicotinamida (b) em diferentes tempos de adsorção: 1, 20, 40, 60, 80 e 100 minutos.

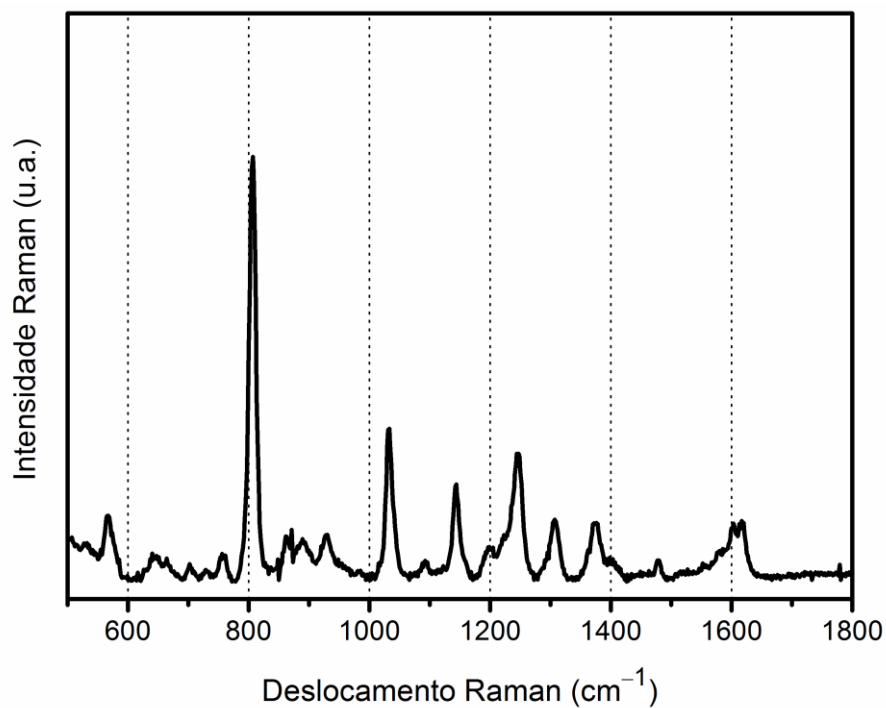


FIGURA 3.4 – Espectro SERS do ácido acetilsalicílico obtido utilizando o substrato sintetizado.

É possível perceber na Figura 3.3 que a intensidade, para ambos os analitos, aumenta a medida que o tempo de adsorção aumenta, chegando a um valor máximo em um tempo de adsorção de 60 minutos para a nicotinamida e de 80 minutos para o ácido acetilsalicílico. Isto ocorre já que a concentração do analito adsorvido na superfície do substrato cresce em função do tempo. No entanto, a partir de um valor máximo de intensidade, o sinal decresce a medida que o tempo de adsorção aumenta, provavelmente devido a oxidação das nanopartículas e/ou degradação do analito.

3.4 – Variação do sinal com o tempo de reação

O tempo de reação de síntese das nanopartículas de prata foi estudado no planejamento fatorial fracionado, no qual seu valor máximo era 8 minutos. De acordo com a Tabela 3.2, apresentada na seção 3.1, esta variável apresentou um efeito positivo sobre o valor de intensidade do sinal. Por conseguinte, o tempo de reação da síntese do substrato foi analisado para valores maiores daqueles propostos pelo planejamento, a fim de verificar a possibilidade de obtenção de um maior aumento do sinal SERS.

A variação da intensidade do sinal da nicotinamida e do ácido acetilsalicílico em relação ao tempo de reação é apresentada na Figura 3.5. A intensidade do sinal SERS foi monitorada em 1031 cm^{-1} para a nicotinamida e em 806 cm^{-1} para o ácido acetilsalicílico. É possível observar que a intensidade do pico monitorado cresce à medida que o tempo de reação aumenta, chegando a um valor máximo em 12 minutos de reação, tanto para a nicotinamida quanto para o ácido acetilsalicílico.

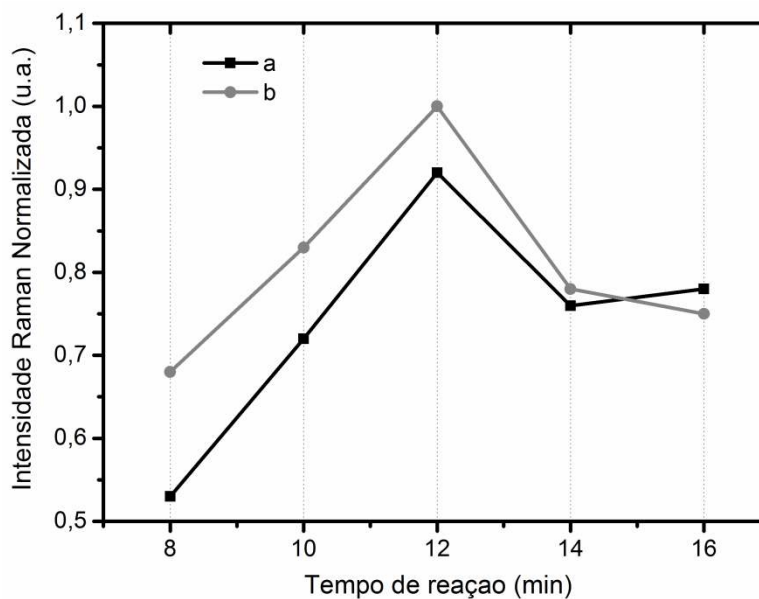


FIGURA 3.5 – Intensidade normalizada para solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido acetilsalicílico (a) e para solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de nicotinamida (b) em diferentes tempos de reação na preparação do substrato: 8, 10, 12, 14, 16 minutos.

Com o aumento do tempo de reação, o tamanho das nanopartículas aumenta, atingindo um tamanho ótimo em 12 minutos de reação. Além disso, pode haver formação de hot spots, que é uma das condições para observar aumento da intensidade SERS. Em contrapartida, em tempos de reação muito longos, as nanopartícula se tornam muito grandes e há aglomerações entre elas, causando uma diminuição da intensidade do pico, fato que pode ser constatado como mostra a micrografia da Figura 3.6.

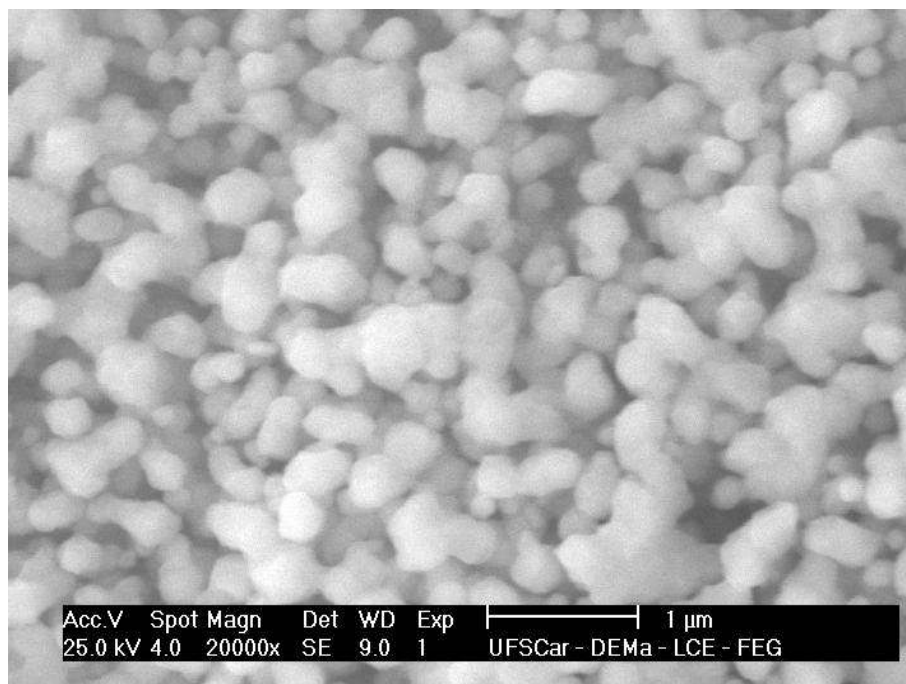


FIGURA 3.6 – Micrografia das nanopartículas de prata depositadas em papel filtro em um tempo de reação de 16 minutos.

A Tabela 3.6 apresenta os parâmetros reacionais ótimos para síntese do substrato, o qual foi caracterizado e utilizado nas análises quantitativas dos fármacos, utilizando o tempo de adsorção ótimo de cada analito.

TABELA 3.6 – Valores otimizados dos parâmetros de síntese.

Parâmetros	Valor
[AgNO ₃]	50 mmol L ⁻¹
[NH ₄ OH]	150 mmol L ⁻¹
[C ₆ H ₁₂ O ₆]	500 mmol L ⁻¹
Tempo de reação	12 minutos
Temperatura	45°C
Pré-Tratamento	NH ₄ OH
Tipo de Papel	Quantitativo (1–2 µm)
Tempo de adsorção nicotinamida	60 minutos
Tempo de adsorção ácido acetilsalicílico	80 minutos

3.5 – Caracterização das nanopartículas de prata suportadas em papel filtro

Foi realizada uma micrografia do papel filtro antes e após deposição em papel filtro das nanopartículas de prata sintetizadas pelo método de Tollens com os parâmetros experimentais otimizados. É possível perceber pela Figura 3.7 que há uma densidade alta de nanopartículas de prata sobre o papel filtro, com uma média de 30.000 partículas por mm², e a distribuição de 95% das partículas, de acordo com a Figura 3.8, está entre 94 a 275 nm, com um tamanho médio de (180 ± 60) nm.

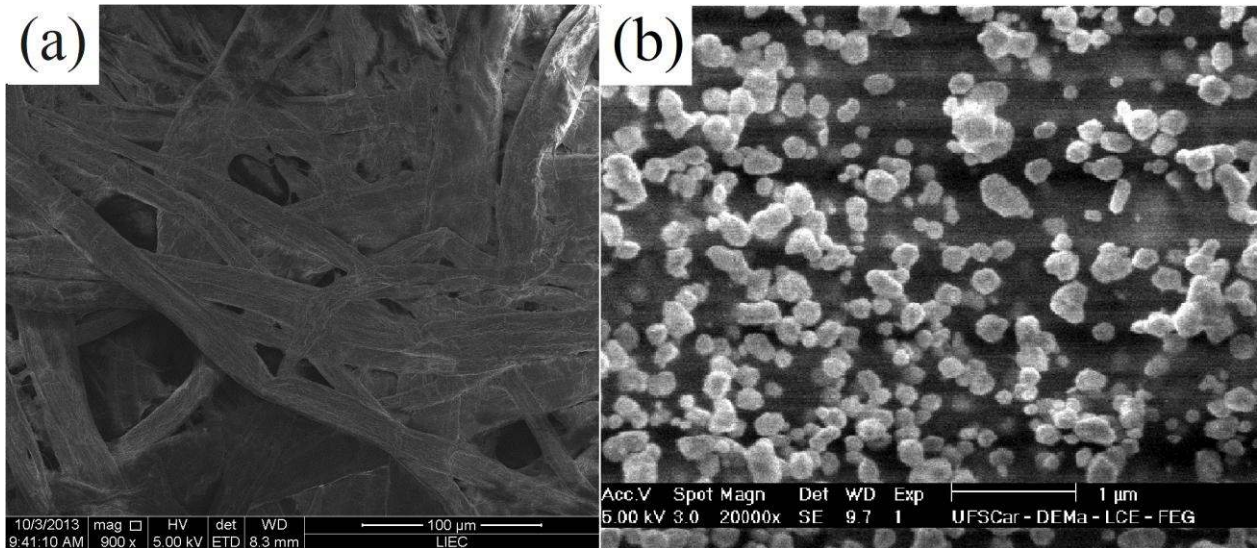


FIGURA 3.7 – Micrografia do papel filtro (a) e do papel filtro com nanopartículas de prata depositadas sobre a superfície.

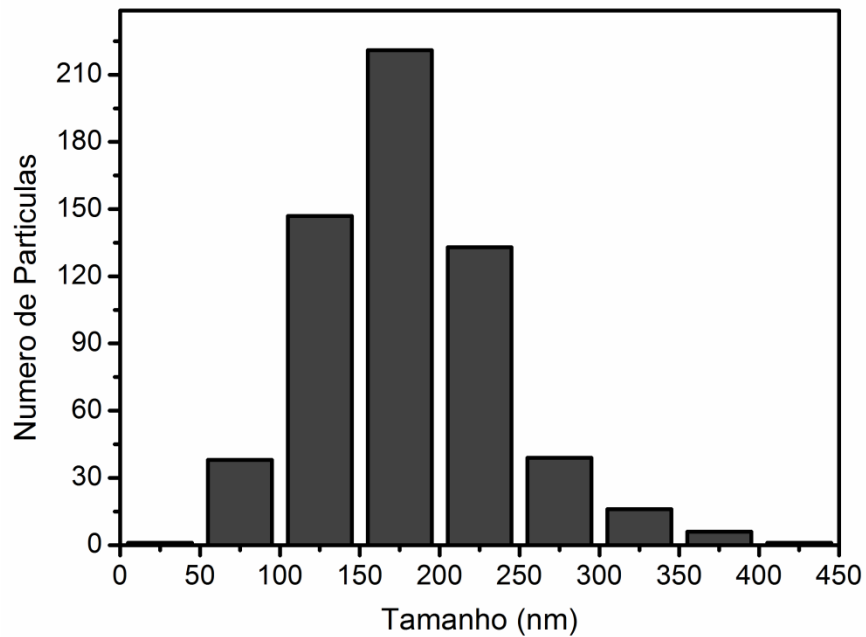


FIGURA 3.8 – Gráfico de distribuição do tamanho das nanopartículas de prata depositadas sobre papel filtro nas condições ótimas da síntese.

O difratograma de raios-X das nanopartículas de prata sobre o papel filtro pode ser visto na Figura 3.9 e foi realizado na faixa angular de 30° a 80° , com uma taxa de varredura de 2° por minuto.

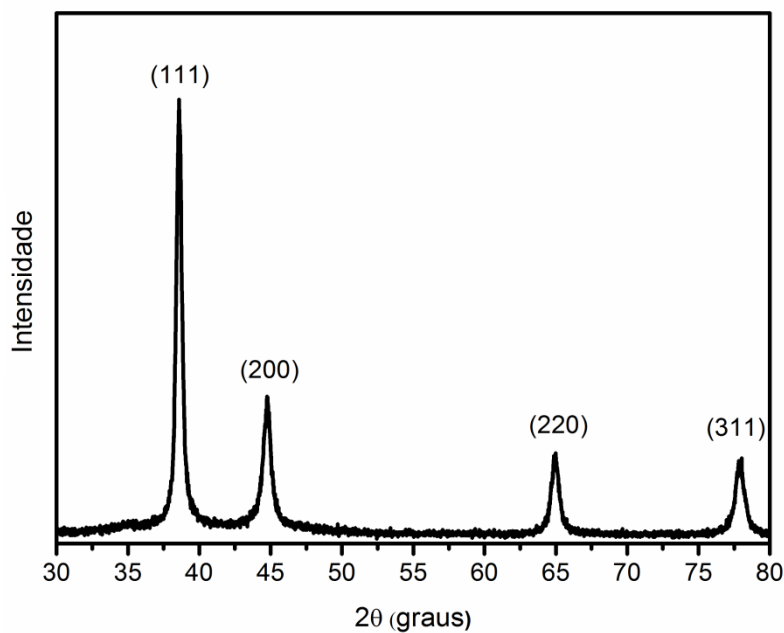


FIGURA 3.9 – Padrão de difração das nanopartículas de prata depositadas sobre papel filtro nas condições ótimas da síntese.

Quatro picos aparecem no padrão de difração de raios-X nos valores dos ângulos de $38,3^\circ$; $44,4^\circ$; $64,9^\circ$ e $77,9^\circ$, correspondentes respectivamente aos planos cristalinos (111), (200), (220) e (311) da prata^{81,82}.

A Figura 3.10 apresenta o espectro de energia dispersiva (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDS) do substrato. Pode ser observado que apenas nanopartículas de prata foram depositadas na superfície do papel filtro e não há presença de oxigênio na superfície.

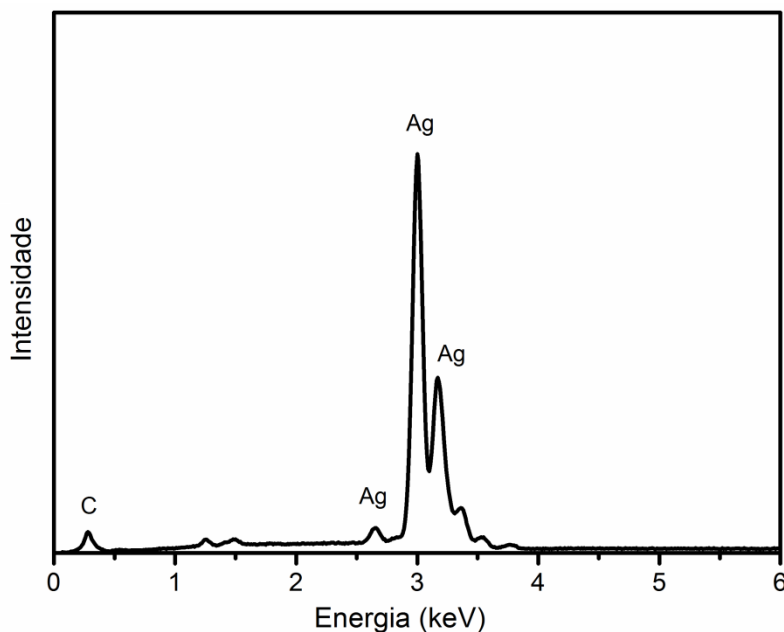


FIGURA 3.10 – Espectro de energia dispersiva (EDS) das nanopartículas de prata depositadas sobre papel filtro nas condições ótimas da síntese.

A Figura 3.11 é referente ao espectro de infravermelho do papel filtro antes e depois da deposição das nanopartículas obtidos utilizando o acessório de refletância total atenuada (Attenuated Total Reflectance, ATR).

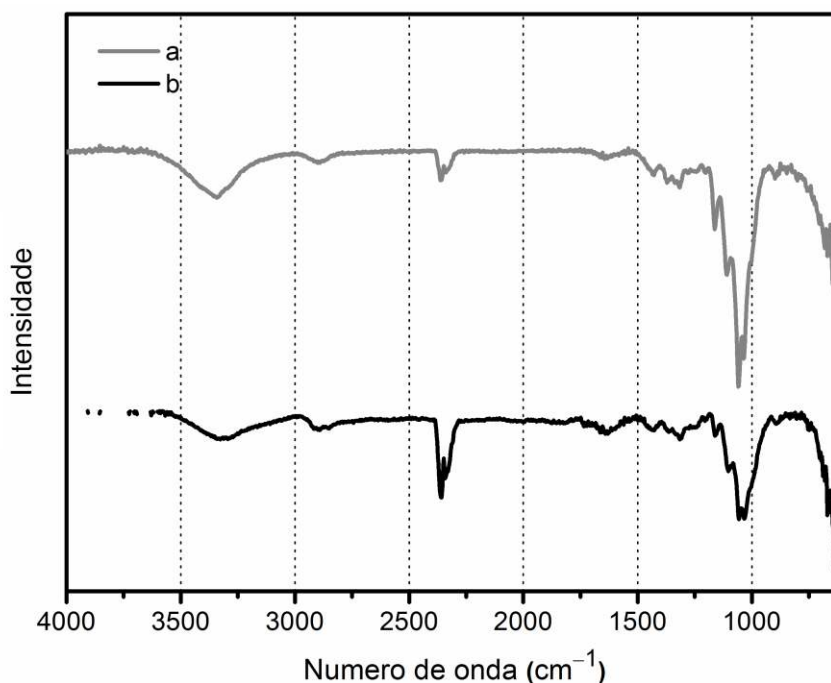


FIGURA 3.11 – Espectro de infravermelho do papel filtro (a) e das nanopartículas de prata depositadas sobre papel filtro (b) nas condições ótimas da síntese.

Nota-se que, em ambos os espectros, os picos que aparecem são os mesmos e estão relacionados aos grupos hidroxila e carbonos alifáticos presentes na estrutura da celulose. No entanto, a intensidade dos picos presentes não são similares devido à deposição das nanopartículas de prata na superfície da celulose que dificulta que a radiação incidente interaja com a superfície do papel, diminuindo assim a intensidade dos picos. Como esperado, não há picos relativos à nanopartícula de prata já que elas não são ativas no infravermelho médio.

3.6 – Nicotinamida

3.6.1 – Estudo da orientação da nicotinamida em função do pH

Com uma concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de nicotinamida, variou-se o pH da solução com ácido clorídrico $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. O pH final da solução de nicotinamida foi 2 e 10 respectivamente. O tempo de adsorção foi de uma hora e o tempo de secagem foi de 20 minutos em temperatura ambiente controlada.

O espectro SERS da nicotinamida apresenta um aumento da intensidade do sinal em 1029 cm^{-1} . Em pH 2, a intensidade do sinal foi muito baixa, já em pH básico a intensidade do sinal foi equivalente à intensidade em pH neutro. A Figura 3.12 mostra os espectros SERS da nicotinamida em cada um do pH estudado.

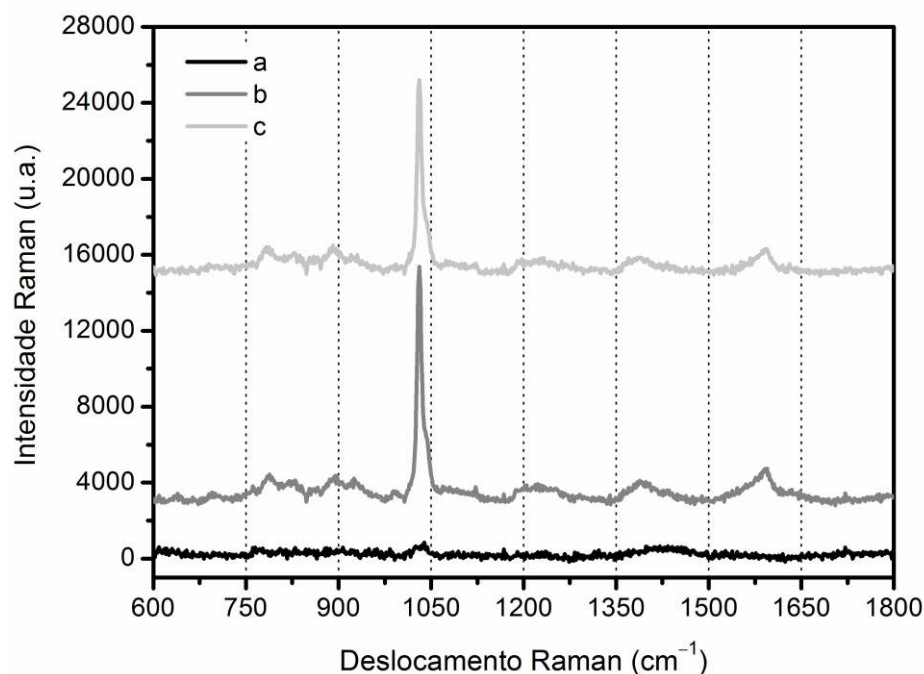


FIGURA 3.12 – Espectros SERS da nicotinamida diluída em pH 2 (a), 7 (b) e 10 (c), com potência de laser incidido de 3,16 mW.

O aumento de sinal observado no efeito SERS da nicotinamida em meio neutro e alcalino deve-se à ligação do nitrogênio do anel piridínico à nanopartícula de prata (Figura 3.13a). Esta mudança na estrutura resulta da variação do pH da solução. O valor do pK_a da nicotinamida é 3,3 indicando que em valores de pH menores que 3,3 a forma protonada da molécula é predominante, enquanto que em valores de pH maiores que 3,3 a forma neutra predomina⁶⁹.

Como a protonação do nitrogênio do anel piridínico interfere na sua ligação com as nanopartículas de prata, a molécula de nicotinamida se liga a elas pelo nitrogênio do grupo amida, como mostra a Figura 3.13b, diminuindo o sinal SERS. Devido a estes resultados, optou-se por construir a curva de calibração da nicotinamida, dissolvendo-a em água deionizada, em pH 7.

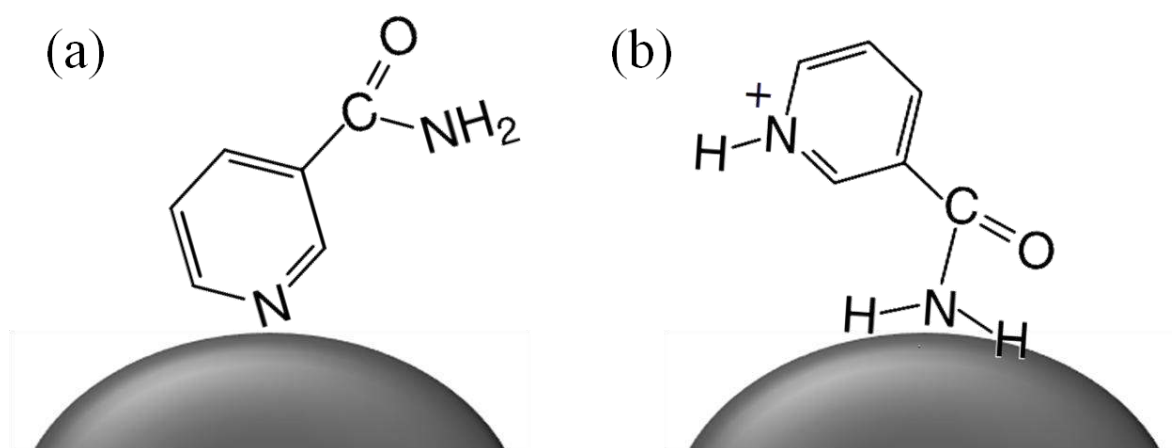


FIGURA 3.13 – Ilustração da nicotinamida na forma neutra (a) e na forma protonada (b).

3.6.2 – Espectro SERS do padrão de da amostra

A Figura 3.14 mostra o espectro Raman da nicotinamida em pó, o espectro Raman da solução de nicotinamida a uma concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e o espectro SERS da solução de nicotinamida na mesma concentração. Para a aquisição do espectro Raman do pó foi utilizada uma potência de laser de 31,6 mW; para o espectro Raman e SERS da solução foi utilizada uma potencia de 3,16 mW. O tempo de integração foi de 30 segundos para todas as aquisições.

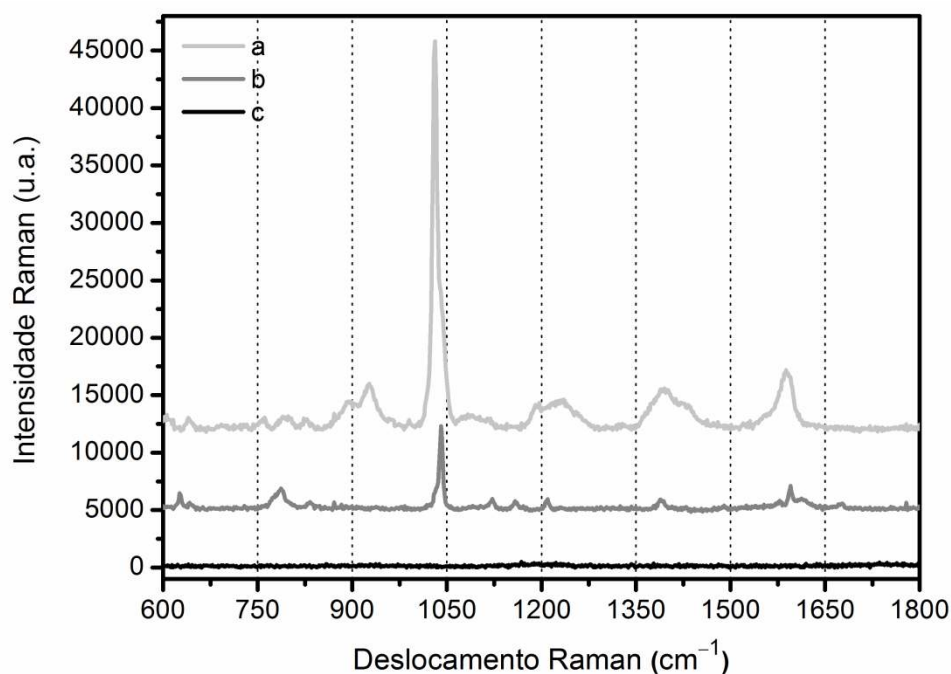


FIGURA 3.14 – Espectro SERS de uma solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do padrão de nicotinamida com uma potência de laser incidida de 3,16 mW (a), espectro Raman do padrão de nicotinamida em pó com uma potência incidida de 31,6 mW (b) e espectro Raman da solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do padrão de nicotinamida com uma potência de laser incidida de 3,16 mW (c).

Pode ser observado que, com a mesma potência de laser incidida, o espectro Raman da solução (Figura 3.14c) não exhibe picos relacionados ao analito, já o espectro SERS da mesma solução (Figura 3.14a) apresenta picos relacionados à nicotinamida, similares aos que aparecem no espectro Raman da nicotinamida em pó (Figura 3.14b). Além disso, ao comparar o espectro SERS da solução com o espectro Raman do pó, é possível perceber que o pico relacionado à respiração do anel piridínico sofre um pequeno deslocamento de 1029 cm^{-1} para 1031 cm^{-1} . Além disso, há um aumento da intensidade deste pico no espectro SERS (Figura 3.14a) em comparação com o espectro Raman do pó (Figura 3.14b).

O espectro Raman da amostra comercial que contém nicotinamida e o espectro SERS da mesma amostra em solução, em uma concentração de $0,5\text{ mmol L}^{-1}$, estão ilustrados na Figura 3.15. Para a aquisição do espectro Raman da amostra em gel, foi utilizada uma potência de laser de 316 mW e para o espectro SERS da amostra diluída foi utilizada uma potência de $3,16\text{ mW}$, ambas com tempo de integração foi de 30 segundos.

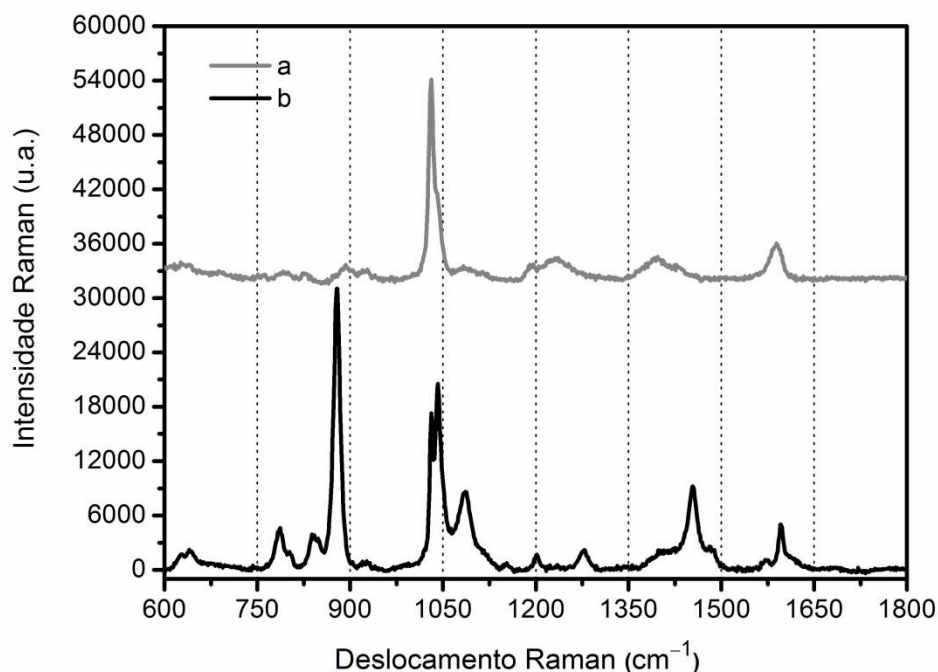


FIGURA 3.15 – Espectro SERS de uma solução contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ da amostra comercial de nicotinamida com uma potência de laser incidida de $3,16 \text{ mW}$ (a) e espectro Raman da amostra comercial de nicotinamida em gel com uma potência incidida de 316 mW (b).

O perfil do espectro Raman da amostra (Figura 3.15b) é diferente do perfil do espectro Raman do padrão de nicotinamida (Figura 3.14b), pois há o aparecimento de picos relativos aos excipientes utilizados na composição do gel. No entanto, o espectro SERS da amostra (Figura 3.15a) é semelhante ao espectro SERS do padrão (Figura 3.14a), apresentando os mesmos picos e um aumento considerável da intensidade do sinal em 1031 cm^{-1} , significando que apenas moléculas de nicotinamida adsorvidas na superfície das nanopartículas de prata estão gerando o sinal, e não há interferência dos excipientes presentes na amostra, indicando que este método apresenta alta seletividade para este analito.

3.6.3 – Construção da curva analítica

A curva de calibração foi feita em triplicata e a concentração da solução de nicotinamida variou de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O substrato foi cortado verticalmente em seis tiras de tamanho iguais e imersos em soluções de cada concentração de forma aleatória, já que a distribuição das nanopartículas no papel não é uniforme.

Após uma hora, os papéis foram retirados e secados na estufa a 25°C . Foram obtidos 12 espectros para cada concentração, alternando de papel a cada três espectros tirados. Do total dos espectros obtidos, foram excluídos os dois maiores e os dois menores valores de intensidade e, com os oito espectros restantes de cada concentração, foi calculada a média e feita a normalização do valor de intensidade obtida em relação ao valor da intensidade referente à concentração mais alta.

Os espectros para cada uma das concentrações utilizadas para construção da curva analítica estão ilustrados na Figura 3.16. A partir do valor médio normalizado referente a cada concentração estudada, foi obtida a curva analítica (Figura 3.17) com equação da reta $y = 915,02x + 0,161$ e coeficiente de determinação, R^2 , de 0,96.

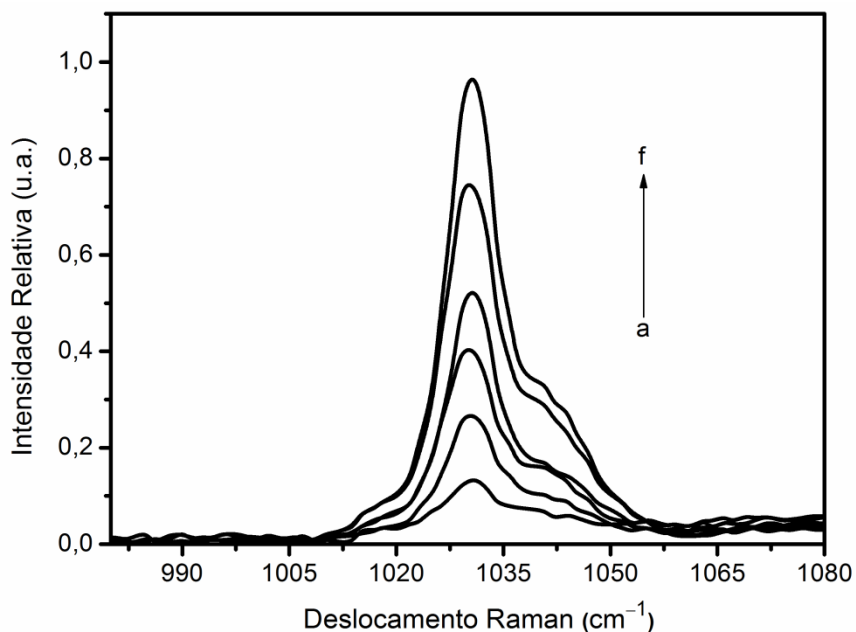


FIGURA 3.16 – Espectro SERS da nicotinamida em diferentes concentrações: 0,1 mmol L⁻¹ (a), 0,2 mmol L⁻¹ (b), 0,4 mmol L⁻¹ (c), 0,6 mmol L⁻¹ (d), 0,8 mmol L⁻¹ (e) e 1,0 mmol L⁻¹ (f).

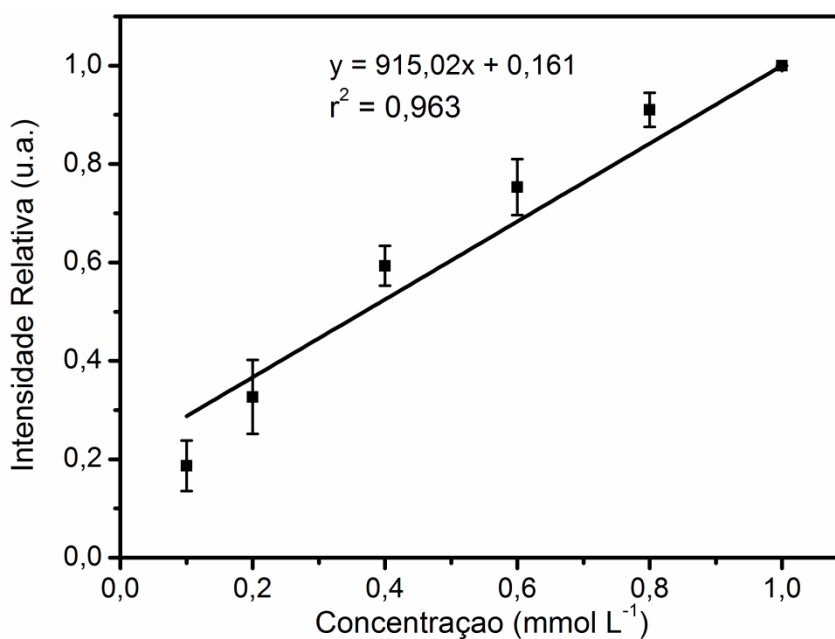


FIGURA 3.17 – Curva de calibração da nicotinamida utilizando o substrato proposto.

3.6.4 – Determinação de nicotinamida em amostra comercial

Para quantificação da amostra comercial nicotinamida, o substrato foi cortado verticalmente em seis partes iguais, sendo que três delas foram imersas na solução contendo a amostra comercial diluída em uma concentração $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e, os outros três, em solução do padrão de nicotinamida em uma concentração $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Esse procedimento foi realizado para normalizar a intensidade da amostra utilizando o ponto mais concentrado da curva de calibração, sendo os papeis imersos em ordem aleatória.

Com a equação da reta da curva analítica (Figura 3.18) foi calculada a concentração do princípio ativo na amostra, realizando o procedimento em triplicata. Pode ser observado, pelos valores apresentados na Tabela 3.7, que o valor obtido pelo método SERS proposto está em concordância com o resultado obtido por HPLC.

TABELA 3.7 – Resultados obtidos na determinação de nicotinamida em amostra em gel empregando HPLC e SERS.

Amostra	Nicotinamida (mg/g do gel)				
	Valor			Erro relativo (1) %	Erro relativo (2) %
	Rotulado	HPLC	SERS		
Papules®	40	$40,3 \pm 0,6$	$39,8 \pm 0,9$	-0,5	-1,2

Erro relativo (1) % = $100 \times (\text{valor SERS} - \text{valor rotulado}) / \text{valor rotulado}$

Erro relativo (2) % = $100 \times (\text{valor SERS} - \text{valor HPLC}) / \text{valor HPLC}$

Foi aplicado o teste t – pareado nos resultados obtidos para verificar se os mesmos apresentavam diferença entre si. O valor de $t_{\text{calculado}} = 0,64$ foi menor que o valor de $t_{\text{crítico}} = 2,77$, portanto é possível afirmar que os resultados da

determinação de nicotinamida obtidos empregando a metodologia SERS proposta e pelo procedimento HPLC, usado como referência, não apresentam diferenças significativas a um nível de confiança 95% e estão dentro de um erro relativo aceitável, de acordo com a Resolução RE N°899, de 29 de maio de 2003, na qual é dito que as amostras devem ter uma variação de até 15% do valor nominal.

3.7 – Ácido acetilsalicílico

3.7.1 – Espectro SERS do padrão e da amostra

A Figura 3.18 exibe o espectro Raman do ácido acetilsalicílico em pó, o espectro Raman da solução de ácido acetilsalicílico a uma concentração de 1,0 mmol L⁻¹ e o espectro SERS da solução de ácido acetilsalicílico na mesma concentração. Para a aquisição do espectro Raman do pó foi utilizada uma potência de laser de 31,6 mW; para o espectro Raman e SERS da solução foi utilizada uma potencia de 3,16 mW. O tempo de integração foi de 30 segundos para todas as aquisições.

Pode ser observado que, em uma mesma potência de laser incidida, o espectro Raman da solução exibe um perfil espectral com picos referentes ao etanol, utilizado como solvente na preparação da amostra. Já o espectro SERS da mesma solução, apresenta picos relacionados ao ácido acetilsalicílico, similares aos que aparecem no espectro Raman do padrão em pó do analito, no entanto é possível observar algumas diferenças entre os dois espectros. A razão entre certos picos são diferentes, como pode ser visto entre os picos em 1255cm⁻¹ e 1293 cm⁻¹, e outros se tornam mais intensos como os picos localizados em 1044 cm⁻¹ e em 1152 cm⁻¹.

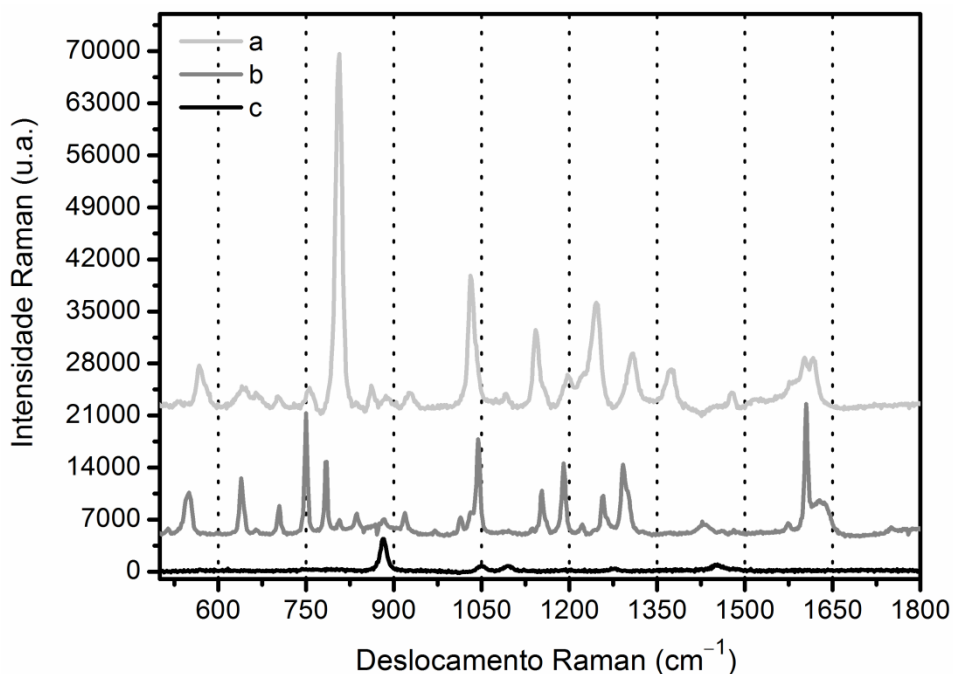


FIGURA 3.18 – Espectro SERS de uma solução contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do padrão de ácido acetilsalicílico com uma potência de laser incidida de $3,16 \text{ mW}$ (a), espectro Raman do padrão de ácido acetilsalicílico em pó com uma potência incidida de $31,6 \text{ mW}$ (b) e espectro Raman da solução $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do padrão de ácido acetilsalicílico com uma potência de laser incidida de $3,16 \text{ mW}$ (c).

O aumento SERS para o ácido acetilsalicílico ocorre principalmente no pico em 806 cm^{-1} , relativo à deformação tipo tesoura do grupo carboxila, que aparece em 784 cm^{-1} no espectro Raman do padrão em pó. Além disso, há o aparecimento de um pico em 1375 cm^{-1} no espectro SERS, que não é encontrado no espectro Raman, relativo ao estiramento simétrico do grupo carboxílico. Estes dois fatos indicam que a molécula adsorve pelo grupo COO^- na superfície da nanopartícula de prata^{74,75} (Figura 3.19).

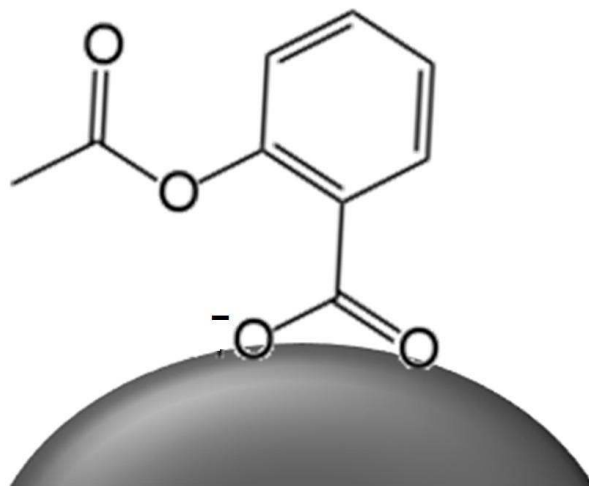


FIGURA 3.19 – Possível orientação do ácido acetilsalicílico em relação à superfície da nanopartícula de prata.

O espectro Raman da amostra comercial e o espectro SERS da amostra em solução em uma concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ estão ilustrados na Figura 3.20. Para a aquisição do espectro Raman da amostra sólida, foi utilizada uma potência de laser de 15,8 mW e para o espectro SERS da amostra diluída foi utilizada uma potencia de 3,16 mW, com tempo de integração de 30 segundos para ambos os espectros.

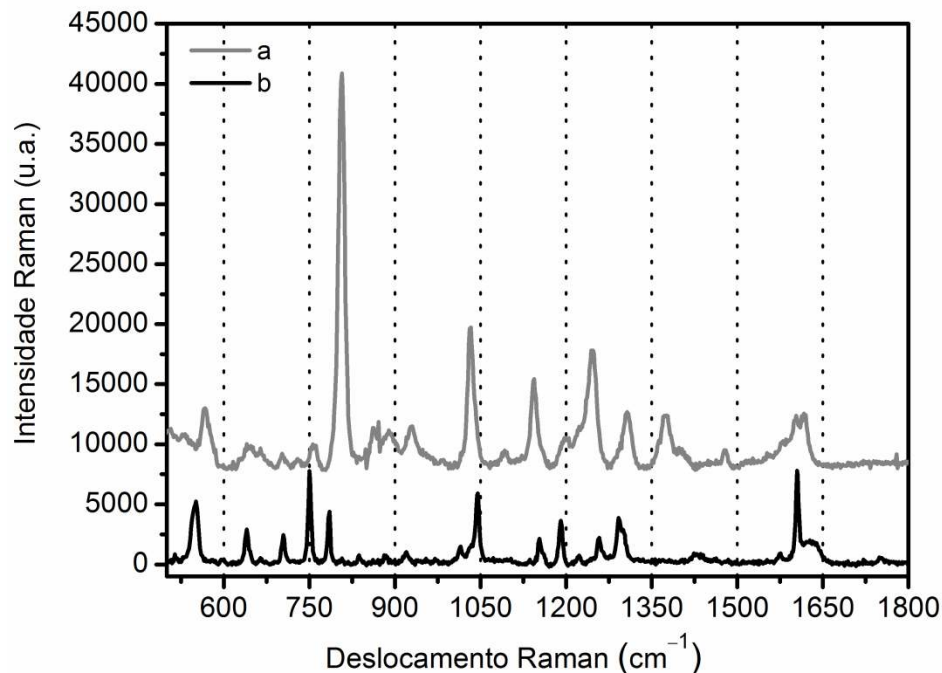


FIGURA 3.20 – Espectro SERS de uma solução contendo $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ da amostra comercial de ácido acetilsalicílico com uma potência de laser incidida de $3,16 \text{ mW}$ (a) e espectro Raman da amostra comercial de ácido acetilsalicílico em pó com uma potência incidida de $15,8 \text{ mW}$ (b).

O perfil do espectro Raman da amostra comercial (Figura 3.20b) é idêntico ao perfil do espectro Raman do padrão (Figura 3.18b), pois aparecem os mesmos picos e na mesma relação de intensidade. O espectro SERS da amostra (Figura 3.20a) é semelhante ao espectro SERS do padrão (Figura 3.18a), apresentando os mesmos picos e um aumento considerável da intensidade do sinal em 806 cm^{-1} , significando que apenas moléculas de ácido acetilsalicílico adsorvidas na superfície das nanopartículas de prata estão gerando o sinal e não há interferência dos excipientes presentes na amostra, indicando que este método apresenta alta seletividade para este analito.

3.7.2 – Construção da curva analítica

A curva analítica foi feita em triplicata e com uma faixa de concentração de ácido acetilsalicílico de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ a $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O papel foi cortado verticalmente em seis tiras de tamanho iguais e imersos em cada concentração de forma aleatória, devido a não uniformidade da distribuição das nanopartículas no papel.

Após um tempo de adsorção de 80 minutos, os substratos foram retirados e secados por 10 minutos em estufa a 25°C . Foram coletados 12 espectros para cada concentração, alternando de papel a cada três espectros obtidos. Deste conjunto de dados, foram excluídos quatro espectros, que tiveram os dois maiores e os dois menores valores de intensidade e, com os oito espectros restantes de cada concentração, foi calculada a média e feita a normalização do valor de intensidade obtida em relação ao valor da intensidade referente à concentração mais alta da curva de calibração.

Na Figura 3.21 estão ilustrados os espectros de cada concentração da curva analítica. A partir do valor de intensidade médio normalizado referente a cada concentração estudada, foi obtida a curva analítica (Figura 3.22) com equação da reta $y = 497,7x + 0,5$ e coeficiente de determinação, R^2 , de 0,93.

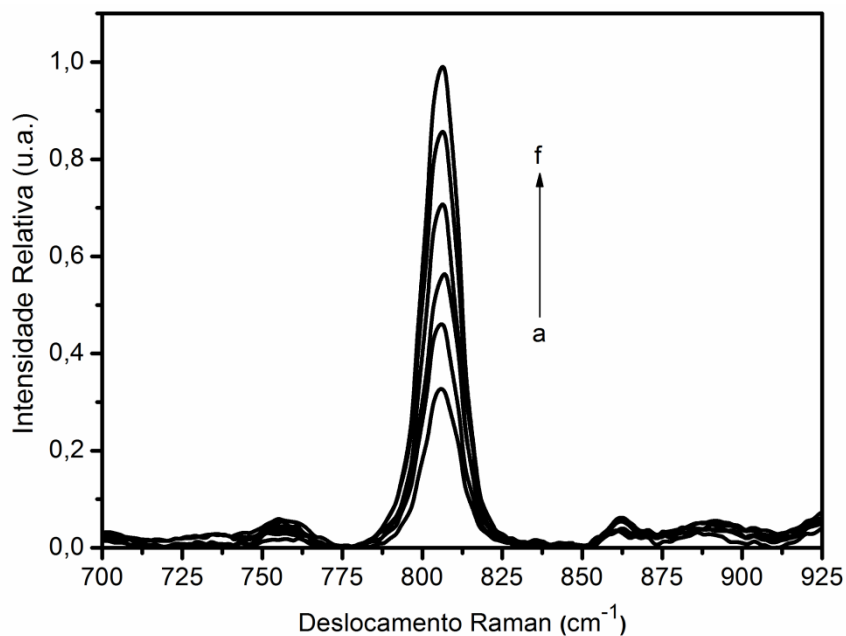


FIGURA 3.21 – Espectro SERS do ácido acetilsalicílico em diferentes concentrações: 0,1 mmol L⁻¹ (a); 0,2 mmol L⁻¹ (b); 0,4 mmol L⁻¹ (c); 0,6 mmol L⁻¹ (d); 0,8 mmol L⁻¹ (e) e 1,0 mmol L⁻¹ (f).

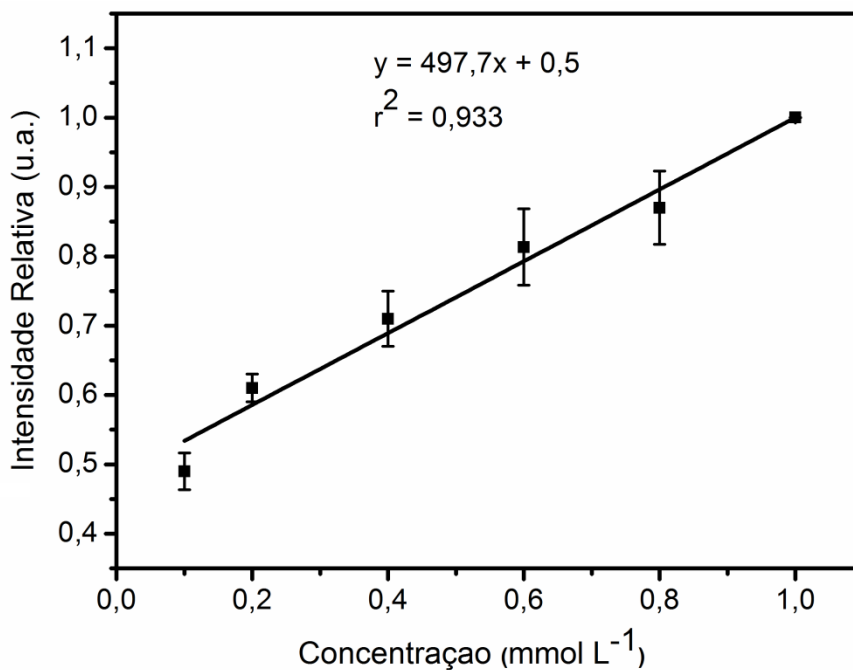


FIGURA 3.22 – Curva de calibração do ácido acetilsalicílico utilizando o substrato proposto.

3.7.3 – Determinação de ácido acetilsalicílico em amostra comercial

Para quantificação da amostra comercial de ácido acetilsalicílico, o substrato foi cortado verticalmente em seis partes iguais, sendo que três delas foram imersas na solução contendo a amostra comercial diluída em uma concentração $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e, os outros três, em solução do padrão de nicotinamida em uma concentração $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para realizar a normalização do espectro da amostra. Os papéis foram imersos em ordem aleatória.

Com a equação da reta da curva analítica (Figura 3.22) foi calculada a concentração do princípio ativo na amostra realizando o procedimento em triplicata.

Pode ser observado, pelos valores apresentados na Tabela 3.8, que o valor obtido pelo método SERS proposto está em concordância com o resultado obtido por HPLC.

TABELA 3.8 – Resultados obtidos na determinação de ácido acetilsalicílico em comprimido comercial empregando HPLC e SERS.

Amostra	Nicotinamida (mg por comprimido)				
	Valor			Erro relativo (1) %	Erro relativo (2) %
	Rotulado	HPLC	SERS		
AAS Adulto	500	492±21	502±44	0,4	2,0

Erro relativo (1) % = $100 \times (\text{valor SERS} - \text{valor rotulado}) / \text{valor rotulado}$

Erro relativo (2) % = $100 \times (\text{valor SERS} - \text{valor HPLC}) / \text{valor HPLC}$

Foi aplicado o teste t – pareado nos resultados obtidos para verificar se os mesmos apresentavam diferença entre si. O valor de $t_{\text{calculado}} = 2,19$ foi menor

que o valor de $t_{\text{crítico}} = 2,77$, portanto é possível afirmar que os resultados da determinação de nicotinamida obtidos empregando a metodologia SERS proposta e pelo procedimento HPLC, usado como referência, não apresentam diferenças significativas a um nível de confiança 95% e estão dentro de um erro relativo aceitável, de acordo com a Resolução RE N°899, de 29 de maio de 2003.

Capítulo 4- CONCLUSÃO

4 – CONCLUSÃO

Os estudos realizados neste trabalho de mestrado evidenciaram a viabilidade do emprego do substrato composto por nanopartículas de prata imobilizadas em papel filtro para determinação de nicotinamida e ácido acetilsalicílico em amostras comerciais.

Foi possível obter um alto fator de intensificação analítico do sinal SERS a partir dos planejamentos experimentais realizados. De acordo com os dados obtidos pelo planejamento experimental fracionado, concluiu-se que a concentração do agente redutor foi o fator que teve uma maior influência na intensificação do sinal, seguido da concentração dos íons Ag^+ presentes em solução e a interação entre estes dois fatores. Foi observado também que o tipo de papel filtro teve pouca influência na resposta. A partir do planejamento composto central não foi possível construir uma superfície de resposta quadrática devido à falta de ajuste. No entanto, a otimização da síntese foi conseguida, com a obtenção da maior intensificação do sinal SERS.

Os parâmetros utilizados para a síntese do substrato, para posterior uso para construção da curva de calibração e quantificação das amostras, foram: 50 mmol L^{-1} de nitrato de prata, 150 mmol L^{-1} de hidróxido de amônio, 500 mmol L^{-1} de glucose, com reação ocorrendo a 45°C durante 12 minutos e o papel filtro utilizado foi o quantitativo, com porosidade de 1–2 μm . O tempo de adsorção de cada princípio ativo estudado também foi otimizado para construção da curva analítica e quantificação das amostras, sendo que para a nicotinamida este tempo foi de 60 minutos, enquanto que para o ácido acetilsalicílico, foi de 80 minutos.

O papel filtro com nanopartículas de prata foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura, mostrando que o formato das partículas depositadas foi, em maior parte, esféricas, com formação de agregados em quase toda a distribuição do papel. Foi possível observar uma densidade alta de nanopartículas de prata sobre o papel filtro, sendo que a distribuição de tamanho de 95% das partículas ficou entre 94 a 275 nm, com um tamanho médio de (180 ± 60) nm. Além disso, pelo espectro de raio-X e de energia dispersiva, foi possível verificar pelo difratograma que apenas foi formada nanopartículas de prata na superfície celulósica e não houve presença de óxidos de prata.

Em relação aos espectros SERS obtidos de cada princípio ativo, foi possível perceber diferenças em relação ao espectro Raman do pó de cada analito. Para a nicotinamida, foi observado que o pico relacionado ao anel piridínico sofreu um pequeno deslocamento de 1029 cm^{-1} para 1031 cm^{-1} e, também, houve um aumento da intensidade deste mesmo pico no espectro SERS utilizando uma potência mínima do laser. Para o ácido acetilsalicílico, notou-se que o aumento SERS ocorreu em 806 cm^{-1} , relativo à deformação do ânion carboxilato, que aparece em 784 cm^{-1} no espectro Raman do padrão em pó. Também foi possível perceber que os picos relacionados aos excipientes presentes nas amostras, que aparecem no espectro Raman, não são observados no espectro SERS de cada amostra analisada, indicando que o método proposto é seletivo ao analito.

Para a construção das curvas analíticas, foram conseguidos bons valores para o coeficiente de determinação, sendo que para a nicotinamida este valor foi de 0,96 e, para o ácido acetilsalicílico, de 0,93. Tanto na quantificação da amostra comercial contendo nicotinamida quanto para a que continha ácido acetilsalicílico, foi alcançado bons resultados, com valores próximos aos obtidos pelo método de referência (HPLC). Para a amostra em gel de nicotinamida, o valor obtido foi de $39,8 \pm 0,9$, com erro relativo de 1,2% em relação ao valor obtido por

HPLC. Para o comprimido de ácido acetilsalicílico, o valor obtido foi de 502 ± 44 , com erro relativo de 2,0% em relação ao valor obtido por HPLC. Nos dois casos os valores obtidos pelo método SERS não apresentam diferenças significativas em relação ao resultado obtido por HPLC a um nível de confiança 95% e estão dentro de um erro relativo aceitável.

Diante dos resultados obtidos, acredita-se na aplicação do substrato fabricado para a determinação de princípios ativos em formulações farmacêuticas, sabendo que a molécula analisada deve ser ativa em SERS. Também, deve-se levar em consideração que o procedimento proposto apresenta certas vantagens sobre o método padrão (HPLC) como, por exemplo, baixo custo, menor tempo de análise e menor consumo de reagentes.

Capítulo 5- REFERÊNCIAS

5 – REFERÊNCIAS

- [1] FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J. & MCQUILLAN, A. J., "Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode". *Chem. Phys. Lett.* **26**(2): 163, 1974.
- [2] CAMPION, A. & KAMBHAMPATI, P., "Surface-enhanced Raman scattering". *Chem. Soc. Rev.* **27**(4): 241, 1998.
- [3] NIE, S. & EMORY, S. R., "Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering". *Science* **275**(5303):1102, 1997.
- [4] KNEIPP, K.; WANG, Y.; KNEIPP, H.; PERELMAN, L. T.; ITZKAN, I.; DASARI, R. R. & FELD, M. S., "Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)". *Phys. Rev. Lett.* **78**(9): 1667, 1997.
- [5] PINZARU, S. C.; PAVEL, I.; LEOPOLD, N. & KIEFER, W., "Identification and characterization of pharmaceuticals using Raman and surface-enhanced Raman scattering". *J. Raman Spectrosc.* **35**: 338, 2004.
- [6] JAWORSKA, A.; MALEK, K.; MARZEC, K. M. & BARANSKA, M., "Nicotinamide and trigonelline studied with surface-enhanced FT-Raman spectroscopy". *Vib. Spectrosc.* **63**: 469, 2012.
- [7] NGO, Y. H.; LI, D.; SIMON, G. P. & GARNIER, G., "Gold nanoparticle–paper as a three-dimensional surface enhanced Raman scattering substrate". *Langmuir* **28**(23): 8782, 2012.
- [8] YU, W. W. & WHITE, I. M., "Inkjet printed surface enhanced Raman spectroscopy array on cellulose paper". *Anal. Chem.* **82**(23): 9626, 2010.
- [9] LEE, C. H.; HANKUS, M. E.; TIAN, L.; PELLEGRINO, P. M. & SINGAMANENI, S., "Highly sensitive surface enhanced Raman scattering substrates based on filter paper loaded with plasmonic nanostructures". *Anal. Chem.* **83**(23): 8953, 2011.
- [10] Leopold, N.; Haberkorn, M.; Laurell, T.; Nilsson, J.; Baena, J. R.; Frank, J. & Lendl, B., "On-line monitoring of airborne chemistry in levitated nanodroplets: In situ synthesis and application of SERS-active Ag-sols for trace analysis by FT-Raman spectroscopy". *Anal. Chem.* **75**: 2166, 2003.
- [11] IZAKE, E. L., "Forensic and homeland security applications of modern portable Raman spectroscopy". *Forensic Sci. Int.* **202**(1): 1, 2010.

- [12] SINGH, R. & RIESS, F., "The 1930 nobel prize for physics: A close decision?". *Notes Rec. R. Soc. Lond.* **55**(2): 267, 2001.
- [13] SMITH, E., & DENT, G., *Modern Raman spectroscopy: A practical approach*. 1 ed. 2005, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- [14] VANKEIRSBILCK, T.; VERCAUTEREN, A.; BAEYENS, W.; WEKEN, G. VAN DER; VERPOORT, F.; VERGOTE, G. & REMON, J. P., "Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis". *TrAC, Trends Anal. Chem.* **21**(12): 869, 2002.
- [15] LASERNA, J. J., *Modern techniques in Raman spectroscopy*. 1 ed. 1996, New York: John Wiley & Sons.
- [16] Das, R. S. & Agrawal, Y. K., "Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications". *Vib. Spectrosc.* **57**(2): 163, 2011.
- [17] NGO, Y. H.; LI, D.; SIMON, G. P. & GARNIER, G., "Paper surfaces functionalized by nanoparticles". *Adv. Colloid Interface Sci.* **163**(1): 23, 2011.
- [18] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. & CROUCH, S. R., *Princípios de análise instrumental*. 6 ed. 2009, Porto Alegre: Bookman.
- [19] JEANMAIRE, D. L. & VAN DUYNE, R. P., "Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode". *J. Electroanal. Chem.* **84**(1): 1, 1977.
- [20] ALBRECHT, M. G. & CREIGHTON, J. A., "Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode". *J. Am. Chem. Soc.* **99**(15): 5215, 1977.
- [21] HAYNES, C. L.; MCFARLAND, A. D. & VAN DUYNE, R. P., "Surface-Enhanced Raman Spectroscopy". *Anal. Chem.* **77**(17): 338, 2005.
- [22] WANG, M.; TESLOVA, T.; XU, F.; SPATARU, T.; LOMBARDI, J. R.; BIRKE, R. L. & LEONA, M., "Raman and surface enhanced Raman scattering of 3-hydroxyflavone". *J. Phys. Chem. C* **111**(7): 3038, 2007.
- [23] RUPÉREZ, A.; MONTES, R. & LASERNA, J. J., "Identification of stimulant drugs by surface-enhanced Raman spectrometry on colloidal silver". *Vib. Spectrosc.* **2**(2): 145, 1991.
- [24] SCHLEGEL, V. L. & COTTON, T. M., "Silver-island films as substrates for enhanced Raman scattering: effect of deposition rate on intensity". *Anal. Chem.* **63**(3): 241, 1991.

- [25] LI, Y. S. & WANG, Y., "Chemically prepared silver/alumina substrate for surface-enhanced Raman scattering" *Appl. Spectrosc.* **46**(1): 142, 1992.
- [26] CHENG, M. L. & YANG, J., "Influences of Composition on Electroless Deposition of Silver Nanoparticles on Glass Substrates for Surface-Enhanced Raman Scattering Measurements". *Appl. Spectrosc.* **62**(12): 1384, 2008.
- [27] CHENG, M. L.; TSAI, B. C. & YANG, J., "Silver nanoparticle-treated filter paper as a highly sensitive surface-enhanced Raman scattering (SERS) substrate for detection of tyrosine in aqueous solution". *Anal. Chim. Acta* **708**(1): 89, 2011.
- [28] CASTRO, J. L.; ARENAS, J. F.; LOPEZ-RAMIREZ, M. R.; SOTO, J. & OTERO, J. C., "Surface-enhanced Raman scattering of picolinamide, nicotinamide, and isonicotinamide: Unusual carboxamide deprotonation under adsorption on silver nanoparticles". *J. Colloid Interface Sci.* **396**: 95, 2013.
- [29] FARIA, D. L. A.; TEMPERINI, M. L. A & SALA, O., "Vinte anos de efeito SERS". *Quím. Nova* **22**(4): 541, 1999.
- [30] LIZ-MARZÁN, L. M., "Nanometals: formation and color." *Materials today* **7**(2): 26, 2004.
- [31] MICHAELS, A. M.; JIANG, J. & BRUS, L., "Ag nanocrystal junctions as the site for surface-enhanced Raman scattering of single rhodamine 6G molecules". *J. Phys. Chem. B* **104**(50): 11965, 2000.
- [32] CAMDEN, J. P.; DIERINGER, J. A.; WANG, Y.; MASIELLO, D. J.; MARKS, L. D., GEORGE C. SCHATZ, G. C. & VAN DUYNE, R. P., "Probing the structure of single-molecule surface-enhanced Raman scattering hot spots". *J. Am. Chem. Soc.* **130**(38): 12616, 2008.
- [33] GERSTEN, J. & NITZAN, A., "Electromagnetic theory of enhanced Raman scattering by molecules adsorbed on rough surfaces". *J. Chem. Phys.* **73**(7): 3023, 1980.
- [34] BRANDL, D. W.; MIRIN, N. A. & NORDLANDER, P., "Plasmon Modes of Nanosphere Trimers and Quadruplets". *J. Phys. Chem. B* **110**(25): 12302, 2006.
- [35] VO-DINH, T., "Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures". *TrAC, Trends Anal. Chem.* **17**(8): 557, 1998.
- [36] HU, J.; ZHAO, B.; XU, W.; LI, B. & FAN, Y., "Surface-enhanced Raman spectroscopy study on the structure changes of 4-mercaptopyridine adsorbed on silver substrates and silver colloids". *Spectrochim. Acta A* **58**(13): 2827, 2002.

- [37] KELLY, K. L.; CORONADO, E.; ZHAO, L. L. & SCHATZ, G. C., "The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment". *J. Phys. Chem. B* **107**(3): 668, 2003.
- [38] MILLER, M. M. & LAZARIDES, A. A., "Sensitivity of metal nanoparticle surface plasmon resonance to the dielectric environment". *J. Phys. Chem. B* **109**(46): 21556, 2005.
- [39] WASZCZUK, P.; BARNARD, T. M.; RICE, C.; MASEL, R. I. & WIECKOWSKI, A., "A nanoparticle catalyst with superior activity for electrooxidation of formic acid". *Electrochem. Commun.* **4**(7): 599, 2002.
- [40] RAI, M.; YADAV, A. & GADE, G., "Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials". *Biotechnol. Adv.* **27**(1): 76, 2009.
- [41] MIJATOVIC, D.; EIJKEL, J. C. T. & VAN DEN BERG, V., "Technologies for nanofluidic systems: top-down vs. bottom-up—a review". *Lab Chip*, **5**(5), 492.
- [42] PORTER, L. A.; CHOI, H. C.; SCHMELTZER, J. M.; RIBBE, A. E. ELLIOTT, L. C. C. & BURIK, J. M., "Electroless nanoparticle film deposition compatible with photolithography, microcontact printing, and dip-pen nanolithography patterning technologies". *Nano Lett.* **2**(12):1369, 2002.
- [43] MAFUNÉ, F.; KOHNO, J.; TAKEDA, Y.; KONDOW, T. & SAWABE, H., "Formation of Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Aqueous Solution of Surfactant". *J. Phys. Chem. B* **105**(22): 5114, 2001.
- [44] LIZ-MARZÁN, L. M.; GIERSIG, M. & MULVANEY, P., "Synthesis of nanosized gold–silica core–shell particles". *Langmuir* **12**(18): 4329, 1996.
- [45] CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G. & ALBRECHT, M. G., "Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength". *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **75**: 790, 1979.
- [46] LEE, P. C.; & MEISEL, D., "Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols". *J. Phys. Chem.*, **86**(17): 3391, 1982.
- [47] SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A. & LIN, Y., "Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities". *Adv. Colloid Interface Sci.* **145**(1): 83, 2009.
- [48] PANACEK, A.; KVITEK, L.; PRUCEK, R.; KOLAR, M.; VECEROVA, R.; PIZUROVA, N.; SHARMA, V. K.; NEVECNA, T. & ZBORIL, R., "Silver colloid

nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity". *J. Phys. Chem. B* **110**(33): 16248, 2006.

[49] KVITEK, L.; PRUCEK, R.; PANACEK, A.; NOVOTNY, R.; HRBAC, J. & ZBORIL, R., "The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis". *J. Mater. Chem.* **15**(10): 1099, 2005.

[50] NGO, Y. H.; LI, D.; SIMON, G. P. & GARNIER, G., "Effect of cationic polyacrylamides on the aggregation and SERS performance of gold nanoparticles-treated paper". *J. Colloid Interface Sci.* **392**: 237, 2013.

[51] LUO, Z. & FANG, Y., "SERS of C_{60}/C_{70} on gold-coated filter paper or filter film influenced by the gold thickness". *J. Colloid Interface Sci.* **283**(2): 459, 2005.

[52] BERTHOD, A.; LASERNA, J. J. & WINEFORDNER, J. D., "Analysis by surface enhanced Raman spectroscopy on silver hydrosols and silver coated filter papers". *J. Pharm. Biom. Anal.* **6**(6): 599, 1988.

[53] CABALIN, L. M. & LASERNA, J. J., "Fast spatially resolved surface-enhanced Raman spectrometry on a silver coated filter paper using charge-coupled device detection". *Anal. Chim. Acta*, **310**(2): 337, 1995.

[54] LASERNA, J. J., CAMPIGLIA, A. D., & WINEFORDNER, J. D., "Surface-enhanced Raman spectrometry on a silver-coated filter paper substrate". *Anal. Chim. Acta* **208**: 21, 1988.

[55] BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. & BRUNS, R. E., *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na industria*. 4 ed. 2010, Porto Alegre: Bookman.

[56] CHANG, S. H., TENG, T. T., & ISMAIL, N., "Optimization of Cu (II) extraction from aqueous solutions by soybean-oil-based organic solvent using response surface methodology". *Water Air Soil Poll.* **217**(1): 567, 2011.

[57] MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. & ANDERSON-COOK, C. M., *Response surface methodology: Process and product optimization using design experiments*. 3 ed. 2009, Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

[58] TEÓFILO, R. F. & FERREIRA, M. M. C., "Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial". *Quím. Nova* **29**(2): 338, 2006.

- [59] MONTGOMERY, D. C. & RUNGER, G. C., Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros. 2 ed. 2003, Rio de Janeiro: LTC.
- [60] Chlopicki, S.; Swies, J.; Mogielnicki, A.; Buczko, W.; Bartus, M.; Lomnicka, M.; ADAMUS, J. & Gebicki, J. "1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway". *Br. J. Pharmacol.* **152**(2): 230, 2007.
- [61] PAL, T.; NARAYANAN, A.; STOKES, D. L. & VO-DINH, T., "Surface-enhanced Raman detection of nicotinamide in vitamin tablets". *Anal. Chim. Acta* **368**(1): 21, 1998.
- [62] RAMALINGAM, S.; PERIANDY, S.; GOVINDARAJAN, M. & MOHAN, S., "FT-IR and FT-Raman vibrational spectra and molecular structure investigation o nicotinamide: A combined experimental and theoretical study". *Spectrochim. Acta, Part A* **75**(5): 1552, 2010.
- [63] TALLMAN, J. F.; PAUL, S. M.; SKOLNICK, P. & GALLAGER, D. W., "Receptors for the age of anxiety: Pharmacology of the benzodiazepines". *Science* **207**(4428): 274, 1980.
- [64] DAMIAN, D. L.; PATTERSON, C. R. S.; STAPELBERG, M.; PARK, J.; BARNETSON, R. C. & HALLIDAY, G. M., "UV radiation- induced immunosuppression is greater in men and prevented by topical nicotinamide". *J. Invest. Dermatol.* **128**: 447, 2008.
- [65] KUMAR, M.; JAISWAL, S.; SINGH, R.; SRIVASTAV, G.; SINGH, P.; YADAV, T. N. & YADAV, R. A., "Ab initio studies of molecular structures, conformers and vibrational spectra of heterocyclic organics: I. Nicotinamide and its N-oxide". *Spectrochim. Acta Part A* **75**(1): 281, 2010.
- [66] HAKOZAKI, T.; .MINWALLA, L.; ZHUANG, J.; CHHOA, M.; MATSUBARA, A.; MIYAMOTO, K.; GREATENS, A.; G.G.HILLEBRAND, G. G.; D.L.BISSETT, D. L. & BOISSY, R. E., "The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer". *Br. J. Dermatol.* **147**(1): 20, 2002.
- [67] LAPPAS, M. & PERMEZEL, M., "The anti-inflammatory and antioxidative effects of nicotinamide, a vitamin B₃ derivative, are elicited by FoxO3 in human gestational tissues: implications for preterm birth". *J. Nutr Biochem.* **22**(12): 1195, 2011.

- [68] KNIP, M.; DOUEK, I. F.; MOORE, W. T. P.; GILMOR, H. A.; MCLEAN, A. E. M.; BINGLEY, P. J. & GALE, E. A. M., "Safety of high-dose nicotinamide: a review". *Diabetologia* **43**(11): 1337, 2000.
- [69] ILIESCU, T.; CINTA, S.; ASTILEAN, S. & BRATU, I., "pH influence on the Raman spectra of PP vitamin in silver sol". *J. Mol. Struct.* **410-411**: 193, 1997.
- [70] CINTA, S.; VOGEL, E.; MANIU, D.; ALUAS, M.; ILIESCU, T.; COZAR, O. & KIEFER, W., "SERS mechanisms of the Vitamin PP on different Au and Ag surfaces". *J. Mol. Struct.* **482-483**: 679, 1999.
- [71] AMANN, R. & PESKAR, B. A., "Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate". *Eur. J. Pharmacol.* **447**(1): 1, 2002.
- [72] MATIAS, F. A. A.; VILA, M. M. D. C. & TUBINO, M., "Quantitative Reflectance Spot Test for the Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Preparations". *J. Braz. Chem. Soc.* **15**(2): 327, 2004.
- [73] BUFAN, B.; MOJSILOVIC, S.; VUCEVIC, D.; VASILIJIC, S.; BALINT, B. & COLIC, M., "Comparative effects of aspirin and NO-releasing aspirins on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells in vitro". *Int. Immunopharmacol.* **9**(7): 910, 2009.
- [74] SMITH, M.; STAMBAUGH, K.; SMITH, L.; SON, H. J., GARDNER, A.; CORDOVA, S.; POSEY, K.; PERRY, D. & BIRIS, A. S., "Surface-enhanced vibrational investigation of adsorbed analgesics". *Vib. Spectrosc.* **49**(2): 288, 2009.
- [75] WANG, Y.; LI, Y. S.; ZANG, Z. & AN, D., "Surface-enhanced Raman scattering of some water insoluble drugs in silver hydrosols". *Spectrochim. Acta Part A* **59**(3): 589, 2003.
- [76] GARRELL, R. L. & SCHULTZ, R. H., "Surface-enhanced Raman spectroscopy using nonaqueous colloidal silver". *J. Colloid Interface Sci.* **105**(2): 483, 1985.
- [77] HUTCHINSON, K.; MCQUILLAN, A. J. & HESTER, R. E., "Non-aqueous sers: Pyridine in N,N'-dimethylformamide solution at a silver electrode". *Chem. Phys. Lett.* **98**(1): 27, 1983.
- [78] FIRKALA, T.; FARKAS, A.; VAJNA, B.; FARKAS, I. & MAROSI, G., "Investigation of drug distribution in tablets using surface enhanced Raman chemical imaging". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **76**: 145, 2013.

[79] THOMAS, S.; BHARTI, A.; THARPA, K. & AGARWAL, A., "Quantification of Potential impurities by a stability indicating UV-HPLC method in niacinamide active pharmaceutical ingredient". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **60**: 86, 2012.

[80] FRANETA, J. T.; AGBABA, D.; ERIC, S.; PAVKOV, S.; ALEKSIC, M. & VLADIMIROV, S., "HPLC assay of acetylsalicylic acid, paracetamol, caffeine and Phenobarbital in tablets". *Il Farmaco* **57**(9): 709, 2002.

[81] He, R.; QIAN, X.; YIN, J. & ZHU, Z., "Preparation of polychrome silver nanoparticles in different solvents". *J. Mater. Chem.* **12**: 3783, 2002.

[82] SUN, Y. & XIA, Y., "Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles". *Science* **298**(5601): 2176, 2002.