



MÓNICA BENICIA MAMIÁN LÓPEZ

**ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE
EM APLICAÇÕES ANALÍTICAS
ASSISTIDAS POR FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

MÓNICA BENICIA MAMIÁN LÓPEZ

**ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE
EM APLICAÇÕES ANALÍTICAS
ASSISTIDAS POR FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**

ORIENTADOR: PROF. DR. RONEI JESUS POPPI

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.**

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR MÓNICA BENICIA MAMIÁN LÓPEZ E ORIENTADA PELO PROF.DR.
RONEI JESUS POPPI

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

M31e Mamián López, Mónica Benicia, 1978-
Espectroscopia Raman amplificada por superfície em aplicações analíticas assistidas por ferramentas quimiométricas / Mónica Benicia Mamián López. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Ronei Jesus Poppi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. MCR-ALS. 2. SERS. 3. Quimiometria. 4. Imagem química. 5. Nanoestruturas. I. Poppi, Ronei Jesus. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Chemometric-assisted analytical applications using surface-enhanced Raman spectroscopy

Palavras-chave em inglês:

MCR-ALS

SERS

Chemometrics

Chemical image

Nanostructures

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Ronei Jesus Poppi [Orientador]

Patrícia Valderrama

Werickson Fortunato de Carvalho Rocha

Marco Aurélio Zezzi Arruda

Jarbas José Rodrigues Rohwedder

Data de defesa: 12-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Química

Agradecimentos

Agradeço primeiramente e principalmente ao meu orientador, Professor Ronei Jesus Poppi porque sua orientação, confiança e apoio constante fizeram possível a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Instituto de Química, pela infraestrutura e materiais disponibilizados para realizar os experimentos que compõem esta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT-Bio) pelo apoio financeiro durante estes quatro anos.

Ao laboratório LME/LNNano do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e à aluna de doutorado Grazielle Setti pelo suporte técnico nas análises de microscopia eletrônica.

Ao meu colega, aluno de doutorado Guilherme L. Alexandrino pela disponibilização do planejamento experimental e a colaboração na síntese dos filmes poliméricos.

Meu muito obrigado aos meus colegas do grupo LAQQA, pelo apoio e a companhia, pelos momentos de trabalho e diversão que serão inesquecíveis: Danilo, Werickson, Luiz, Laura, Luciana T., Luciana O., Mariana, Thiago, Márcia, Guilherme S., Guilherme A., Laila, André, Paulo, Carlos e Humberto.

Minha gratidão aos professores do Instituto de Química que fizeram parte da minha formação acadêmica.

Aos funcionários e técnicos do Instituto de Química, sempre prestes a colaborar e orientar.

Aos meus amigos e amigas que fizeram da minha vida no Brasil, uma época genial: Daniela, César, Paulo R, Carolina, Suryya, Almas, Fozia, Gabriela, Rosario, Sebastián, Grazielle, Pedro Nel, Diana, Luisa, Pedro Efraim, Paula, Kevin, Yasmín, Josina, Fabián, Luiz, Ricardo, Paulo C, Juan Carlos. Encontrar vocês no caminho tem sido maravilhoso.

Á Aydée, Emiro, Laura Victoria, Esther Sofía, Juan Sebastián, Angélica Lucía e Andrea Isabel, meu suporte emocional fundamental, meus guias na vida.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Nacionalidade: Colombiana
Data nascimento: 10/03/1978
monikml@gmail.com

Educação

- Mestrado em Ciências - Química (Junho de 2006). Instituição de Ensino: *Universidad del Valle* - Cali - Colômbia
- Graduação: Bachalerado em Química (Novembro de 2002). Instituição de Ensino: *Universidad del Cauca* - Popayán - Colômbia

Atuação Profissional

- Docente (2008-2009)
 - Química Analítica e Instrumental
 - Química Sanitária

Universidad de Nariño - Pasto - Colômbia
- Docente (2007-2008)
 - Química Analítica
 - Química Geral

Universidad del Cauca - Popayán - Colômbia

Artigos Científicos

- **Mamián-López, M.B.**, Poppi,R.J, "Quantification of moxifloxacin in urine using surface enhanced raman spectroscopy (SERS) and multivariate curve resolution." *Anal Bioanal Chem*, 405(24):7671–7, 2013.
- **Mamián-López, M.B.**, Poppi,R.J, "Standard addition method applied to the urinary quantification of nicotine in the presence of cotinine and anabasine using surface enhanced Raman spectroscopy and multivariate curve resolution." *Anal Chim Acta*, 760(14):53–9, 2013.
- Salazar Mogollón, N.G., Alves de Lima Ribeiro, F.,**Mamián-López, M.B.**, Wang Hantao, L., Poppi,R.J, Augusto,F. "Quantitative analysis of biodiesel in blends of biodiesel and conventional diesel by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate curve resolution." *Anal Chim Acta*, 796:130–6, 2013.
- **Mamián, M.**, Torres,W., Larmat, F.E. "Electrochemical degradation of atrazine in aqueous solution at a platinum electrode." *Portugaliae Electrochim Acta*, 27(3):371–9, 2009.

Monitoria dentro do Programa de Estágio Docente(PED)

- QA-416 - Química Analítica IV (PED B, 2013)
- QA-682 - Química Analítica Instrumental II (PED B, 2013)
- QA-416 - Química Analítica IV (PED B, 2012)
- QA-316 - Química Analítica III (PED C, 2012)

RESUMO

ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE EM APLICAÇÕES ANALÍTICAS ASSISTIDAS POR FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

Autora: Mónica Benicia Mamián López

Orientador: Ronei Jesus Poppi

Nesta tese, são propostas quatro aplicações analíticas que utilizam espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), assistidas por métodos de resolução multivariada de curvas (MCR) e outros algoritmos complementares. As análises SERS foram realizadas usando ouro como material amplificador, nas suas formas coloidal e como substratos sólidos nanoestruturados.

Duas aplicações empregam uma combinação do método de adição de padrão com MCR para quantificar o antibiótico moxifloxacina e o alcalóide nicotina em urina humana e em presença de interferências desconhecidas e não calibradas. A estratégia analítico-quimiométrica minimizou notavelmente o consumo de reagentes e tempo e como característica adicional e pouco usual, foi alcançada a chamada vantagem de segunda ordem utilizando dados de primeira-ordem.

A terceira aplicação envolve um sistema dinâmico multicomponente: a degradação fotolítica da moxifloxacina em meio alcalino. Os componentes do sistema ao longo do processo foram estimados pela aplicação dos algoritmos SIMPLISMA e EFA e com os resultados do método MCR foram elucidados os perfis degradativos da moxifloxacina e o intermediário principal até a degradação do 98,0 % do antibiótico. Além disso, foram calculados

parâmetros cinéticos como constante de velocidade e tempo de meia vida.

Por fim, uma nova e interessante modalidade da técnica SERS foi aplicada no estudo da distribuição dos componentes de filmes poliméricos de liberação controlada de fármacos, contendo paracetamol como princípio ativo. Foram construídos mapas químicos para cada filme, calculadas as concentrações médias respectivas e avaliadas as interações químicas e físicas entre os excipientes e o fármaco.

ABSTRACT

CHEMOMETRIC-ASSISTED ANALYTICAL APPLICATIONS USING SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY

Author: Mónica Benicia Mamián López

Adviser: Ronei Jesus Poppi

In this thesis, four analytical approaches are proposed, using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), assisted by multivariate curve resolution method along with other chemometric tools. The SERS measurements were performed using gold as enhancer material, either in its colloidal form or as solid nanostructured substrates.

In two applications there is a combination of analytical method standard addition and multivariate curve resolution (MCR) to quantify the antibiotic moxifloxacin and the alkaloid nicotine in urine in presence of non-calibrated interferences. The chemometric-assisted procedures showed to be an effective strategy that notoriously minimized the need for reagent- and time-consuming methodologies and as an additional and non-common benefit, the called second-order advantage was achieved with first-order data.

A third application dealt with a dynamic multicomponent system, in this case the photolytic degradation of moxifloxacin in alkaline media was monitored. Here, the components to the system were estimated using the SIMPLISMA and EFA algorithms and the degradation profiles of moxifloxacin and an intermediary were elucidated. Moreover, kinetics parameters as rate constant and half-life time were calculated and the degradative process was

quantitatively monitored until reaching 98% of completion.

Finally, hyperspectral imaging, a new and interesting field of SERS technique was applied to study the component distribution of polymeric films for controlled-release drugs loaded with paracetamol. Based on this approach it was possible to visualize the spacial distribution of all components, to assess interactions among it, as well as to calculate its mean concentrations.

Sumário

Lista de Tabelas	xviii
Lista de Figuras	xviii
Introdução	1
1 ESPECTROSCOPIA RAMAN AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE	5
1.1 Espectroscopia Raman	5
1.2 Espectroscopia SERS: efeito de amplificação por superfície	9
1.2.1 O conceito de fator de amplificação	11
1.2.2 Substratos SERS: características e evolução	11
2 RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE CURVAS e FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS COMPLEMENTARES	17
2.1 Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes, MCR-ALS	17
2.1.1 MCR-ALS, o processo básico	18
2.1.2 Restrições no MCR-ALS	20

2.1.3	A estratégia MCR-ALS e o método de adição de padrão	22
2.1.4	Interferências espectrais e vantagem de segunda ordem	24
2.1.5	Avaliação de resultados e algumas figuras de mérito	26
2.2	Ferramentas quimiométricas complementares	28
2.2.1	SIMPLISMA, um algoritmo de automodelamento	28
3	A IMAGEM HIPERESPECTRAL: OUTRA DIMENSÃO DA ESPECTROSCOPIA	37
3.1	Aquisição de uma imagem hiperespectral	38
3.2	Análise e extração de informação de dados de uma imagem hiperespectral	40
3.2.1	Desdobramento	41
3.2.2	Pré-processamento	42
4	INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA, MORFOLOGIA DOS SUBSTRATOS SERS E	
	AMBIENTE COMPUTACIONAL	47
4.1	Instrumentação analítica	47
4.2	Substratos SERS	48
4.2.1	Ouro coloidal	48
4.2.2	Ouro nanoestruturado sobre silício	52
4.3	Ambiente computacional	53
5	Aplicação 1: DETERMINAÇÃO DE NICOTINA EM URINA EM PRESENÇA DO	
	METABÓLITO COTININA E O ALCALÓIDE ANABASINA	55
5.1	Introdução	55
5.2	Metodologia	57

5.2.1	Reagentes e soluções	57
5.2.2	Amostras e padrões	57
5.2.3	Aquisição espectral e tratamento quimiométrico	59
5.3	Resultados e Discussão	59
5.3.1	Espectros SERS da nicotina, cotinina e anabasina	59
5.3.2	Quantificação de nicotina	61
5.4	Conclusões	71
6	Aplicação 2: ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DO FÁRMACO PARACETAMOL EM FILMES POLIMÉRICOS EMPREGANDO IMAGEM SERS	73
6.1	Introdução	73
6.2	Metodologia	77
6.2.1	Preparação de filmes poliméricos	77
6.2.2	Aquisição de imagens SERS	78
6.2.3	Tratamento quimiométrico	78
6.3	Resultados e Discussão	79
6.3.1	Características SERS dos componentes dos filmes	79
6.3.2	Cálculo da estimativa inicial e otimização de espectros	83
6.3.3	Avaliação dos espectros	85
6.3.4	Construção de imagens químicas: Estudo da distribuição	88
6.4	Conclusões	94
7	Aplicação 3: QUANTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO MOXIFLOXACINA EM URINA	97
7.1	Introdução	97

7.2	Metodologia	99
7.2.1	Amostras e padrões	99
7.2.2	Condições espectrais	100
7.2.3	Tratamento quimiométrico	100
7.3	Resultados e Discussão	101
7.3.1	Atividade SERS da moxifloxacina	101
7.3.2	Variabilidade das amostras de urina: necessidade do método de adição de padrão	104
7.3.3	Determinação da moxifloxacina	106
7.4	Conclusões	113
8	Aplicação 4: MODELAMENTO DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO FOTOLÍTICA DE MOXIFLOXACINA EM MEIO ALCALINO	115
8.1	Introdução	115
8.2	Metodologia	120
8.2.1	Fotólise	120
8.2.2	Tratamento quimiométrico	121
8.3	Resultados e Discussão	122
8.4	Conclusões	129
9	CONCLUSÕES GERAIS	131
10	PERSPECTIVAS FUTURAS	133

Lista de Figuras

2.1	Resolução multivariada de curvas, MCR.	18
2.2	MCR e o método de adição de padrão.	23
2.3	Gráfico 3D de um sistema com 13 amostras e 3 variáveis A,B e C.	29
2.4	Projeção de vetores para a determinação das variáveis puras empregando SIMPLISMA.	29
3.1	Mapeamento por a) pontos, b) em linha, c) de campo amplo.	39
3.2	Processo de desdobramento de um cubo de dados.	42
4.1	Espectros UV-Vis de ouro coloidal com adições sucessivas de 50 μL de NaCl 0,10 mol L^{-1}	50
4.2	Micrografia de nanopartículas coloidais de ouro.	51
4.3	Micrografia de um substrato de ouro nanoestruturado sobre silício (Klarite®).	52
4.4	Fotografia de um substrato nanoestruturado após deposição de amostra.	53
5.1	Estruturas moleculares de (a) nicotina, (b) cotinina e (c) anabasina.	60
5.2	Espectros SERS de nicotina (vermelho), cotinina (verde) e anabasina (azul), em solução aquosa.	61

5.3	Espectros SERS de nicotina 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em solução aquosa (azul) e em urina (vermelho).	62
5.4	Espectros SERS utilizados como estimativa inicial (linha sólida) e otimizados pelo MCR (linha pontilhada) de nicotina (vermelho) e urina a 10% (azul).	64
5.5	Formas não protonada (esquerda), monoprotionada (centro) e diprotionada (direita) da nicotina.	67
5.6	Espectros SERS de nicotina em urina a 10% em pH = 4,90 (vermelho) e pH =9,10 (azul).	67
5.7	Curva analítica pseudo-univariada para a determinação de Nicotina a 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ empregando MCR restrito por correlação.	69
5.8	Curva analítica pseudo-univariada para a determinação de Nicotina a 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ empregando MCR restrito por correlação.	69
5.9	Curva analítica pseudo-univariada para a determinação de Nicotina a 0,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ empregando MCR restrito por correlação.	70
6.1	Estrutura molecular do HPMC	75
6.2	Estrutura molecular da PVP	75
6.3	Estrutura molecular do PEG	75
6.4	Estrutura molecular do paracetamol	76
6.5	Espectros Raman (normalizados) das formas sólidas de HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta).	80

6.6	Espectros SERS (normalizados) de soluções aquosas de HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta), depositadas sobre ouro nanoestruturado.	81
6.7	Espectros (normalizados) de um filme polimérico depositado sobre área ativa SERS (azul) e sobre área não ativa (magenta) de uma superfície de ouro nanoestruturado.	83
6.8	Espectros da estimativa inicial calculados com SIMPLISMA, correspondentes a HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta). . .	84
6.9	Espectros SERS originais de um filme polimérico contendo HPMC, PVP, PEG e paracetamol.	84
6.10	Espectros SERS de HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta) adquiridos separadamente.	85
6.11	Espectros SERS da estimativa inicial de HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta) calculados com SIMPLISMA (linhas sólidas) e otimizados com MCR (linhas pontilhadas).	87
6.12	Mapas de distribuição de a) HPMC, b) PVP, c) PEG e d) paracetamol no filme polimérico 1.	89
6.13	Mapas de distribuição de a) HPMC, b) PVP, c) PEG e d) paracetamol no filme polimérico 2.	90
6.14	Mapas de distribuição de a) HPMC, b) PVP, c) PEG e d) paracetamol no filme polimérico 3.	91
6.15	Mapas de distribuição de a) HPMC, b) PVP, c) PEG e d) paracetamol no filme polimérico 4.	92

7.1	Estrutura molecular dos antibióticos fluoroquinolona.	98
7.2	Estrutura molecular do antibiótico moxifloxacina.	101
7.3	Espectro SERS (normalizado) do antibiótico moxifloxacina em solução aquosa. 102	
7.4	Espectros SERS de moxifloxacina a $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em solução aquosa (vermelho) e em uma solução de urina a 1,0% (azul).	103
7.5	Espectros SERS da moxifloxacina em urina a 1,0% sobre (a) ouro coloidal e (b) sobre substratos sólidos nanoestruturados.	103
7.6	Espectros SERS de amostras de urina a 1,0%, provenientes de seis indivíduos.	104
7.7	Gráfico de escores das componentes principais CP1 <i>versus</i> CP2 de amostras de urina a 1,0%, de seis indivíduos.	105
7.8	Gráfico de pesos da componente 1 para a análise PCA de amostras de urina de seis indivíduos, diluída a 1,0%.	106
7.9	Fotografia de uma gota de $0,50 \mu\text{L}$ depositada sobre uma superfície de ouro nanoestruturado.	107
7.10	Mapa de correlação para $0,50 \mu\text{L}$ de solução de moxifloxacina depositada sobre ouro nanoestruturado (mapeamento realizado após secagem). . . .	108
7.11	Espectros de moxifloxacina em urina antes e após pré-processamento com segunda derivada <i>Savitzky-Golay</i>	110
7.12	Espectros SERS utilizados como estimativa inicial de moxifloxacina (vermelho), urina a 1,0% (azul) e resposta da superfície nanoestruturada de ouro (verde).	110

7.13 Curva analítica para a determinação de moxifloxacina a $0,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ em urina diluída a 1,0%, com replicatas.	111
7.14 Curva analítica para a determinação de moxifloxacina a $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em urina diluída a 1,0%, com replicatas.	111
8.1 Núcleo estrutural das fluoroquinolonas	116
8.2 Classificação dos métodos POA	117
8.3 Método MCR-ALS a) Convencional e b) Aplicando a matriz filtro Csel	121
8.4 Respostas espectrais calculadas com SIMPLISMA da degradação fotolítica da moxifloxacina. a) Moxifloxacina, b) Intermediário A e c) Intermediário B.	122
8.5 Espectros da estimativa inicial (magenta) e otimizados pelo MCR (azul) de a) Moxifloxacina, b) Intermediário A e c) Intermediário B.	124
8.6 Gráfico PCA para o processo degradativo da moxifloxacina. Grupo 1: t=0-10 min, Grupo 2: t= 12-20 min, Grupo 3: t=100-240 min.	124
8.7 Perfís de concentração (normalizada) da moxifloxacina (vermelho) e o intermediário A (azul) em função do tempo. Valores recuperados pelo MCR.	125
8.8 $\text{Ln} \frac{C}{C_0}$ versus t para a fotólise de moxifloxacina. Dados com matriz aumentada (verde) e pré-processados com segunda derivada (roxo).	126
8.9 Espectros SERS da moxifloxacina (vermelho) e o intermediário A (azul) obtidos com SIMPLISMA.	128
8.10 Curva analítica para a determinação de moxifloxacina em água.	129

Lista de Tabelas

Tabela 5.1. Valores de referência de nicotina, anabasina e cotinina em urina de pessoas fumantes	58
Tabela 5.2, mostram as concentrações de nicotina estudadas, em presença e ausência de cotinina e anabasina	58
Tabela 5.3. Figuras de mérito para a determinação de nicotina em presença de cotinina	66
Tabela 5.4. Figuras de mérito para a determinação de nicotina em presença de cotinina e anabasina.....	68
Tabela 5.5. Figuras de mérito para a determinação de nicotina em presença de cotinina com MCR-ALS restrito por correlação	71
Tabela 6.1. Composição dos filmes poliméricos	77
Tabela 6.2. Composição dos filmes poliméricos (valores do MCR)	94
Tabela 6.3. Erros relativos	95
Tabela 7.1. Valores de referência de moxifloxacina em urina após administração de uma única dose de 400 mg	106

Tabela 7.2. Figuras de mérito para a determinação de moxifloxacina em urina diluída a 1%	113
Tabela 8.1. Tempos de aquisição de alíquotas do processo fotolítico	120
Tabela 8.2. Valores calculados de k e $t_{1/2}$ para a fotólise de moxifloxacina	127
Tabela 8.3. Figuras de mérito para a quantificação de moxifloxacina	128

Introdução

A detecção do espalhamento Raman é a detecção de um fenômeno improvável: de cada dez milhões de fótons que incidem sobre uma amostra, somente um é espalhado inelasticamente, e é a «observação» desse único fóton, o desafio e objetivo da espectroscopia Raman.

Embora a previsão e primeira observação do efeito tenham acontecido entre 1922 e 1928 [1], seu desenvolvimento avançou em paralelo com outros eventos ou avanços tecnológicos como a fabricação das fontes laser em 1960, dos primeiros filtros holográficos em 1968 ou a introdução dos detectores de carga acoplada CCD (*Coupled-Charge Detectors*) em 1991, dentre outras não menos importantes mudanças da técnica. Contudo, apesar de todas as desvantagens superadas e a projeção da espectroscopia Raman para a obtenção de imagens químicas com o acoplamento ao microscópio, a baixa intensidade dos sinais químicos era ainda um problema a ser solucionado.

Essa necessidade focou a atenção em um efeito reportado em 1974, no qual um intenso sinal Raman foi obtido de uma monocamada de piridina adsorvida sobre um eletrodo de prata eletroquimicamente modificado [2]. O estudo deste interessante e promissor fenômeno deu início ao desenvolvimento da espectroscopia Raman amplificada por superfí-

cie, SERS(*Surface-enhanced Raman spectroscopy*), cuja capacidade de atingir fatores de amplificação de até 10^{11} , somado à riqueza de informação, alta especificidade e mínimo preparo de amostra, a projetou notavelmente como uma potencial técnica analítica. O número de publicações que aumentou exponencialmente, com um artigo em 1978 para cerca de 2500 em 2011 é só uma forma de visualizar sua crescente popularidade [3].

Os materiais intensificadores ou nanopartículas metálicas, componentes chaves desta técnica, também têm sido objeto de pesquisa na busca de uma maior eficiência na amplificação dos sinais e melhor reprodutibilidade. Embora o ouro coloidal fosse conhecido há vários séculos, o desenvolvimento de outros materiais nanoparticulados começou-se a fortalecer com os estudos de Richard P. Feynman em 1959 [4] e hoje em dia as aplicações da nanotecnologia têm ultrapassado as fronteiras das técnicas espectroscópicas para atingir áreas como a farmacéutica ou a eletrônica. Uma grande porcentagem de aplicações analíticas empregam nanopartículas fabricadas principalmente com ouro e prata [5].

Após quase quarenta anos desde a primeira observação dos sinais SERS, inúmeras pesquisas continuam contribuindo com seu aperfeiçoamento e hoje em dia é possível detectar uma única molécula. E junto com essa possibilidade de atingir dimensões moleculares, o atraente campo da aquisição multidimensional de informação também começa a se desenvolver: a imagem química ou imagem hiperespectral, que permite o estudo espacial dos componentes de um sistema. Enquanto aplicações empregando imagem Raman são publicadas cada vez com maior frequência, a imagem SERS é uma modalidade ainda emergente [6, 7] e as publicações até agora existentes mostram sua grande

potencialidade como alternativa no estudo de sistemas biológicos [8–11] e inclusive em estudos *in vivo* [12, 13]. Outras áreas estão ainda inexploradas.

Não obstante as já mencionadas vantagens que oferece a espectroscopia SERS, suas aplicações analíticas se vêem limitadas pela dificuldade de obter alta reprodutibilidade, pelo qual inúmeras pesquisas têm se concentrado no melhoramento dessa característica, propondo principalmente procedimentos experimentais que aumentam a homogeneidade dos substratos amplificadores. Porém, o uso de respostas multivariadas é muito interessante porque permite o aproveitamento de maior quantidade de informação, aumentando a versatilidade das determinações.

Dentre essas ferramentas, está o método de resolução multivariada de curvas, MCR (*Multivariate Curve Resolution*), um poderoso algoritmo que permite decompor uma resposta instrumental multivariada nas contribuições dos constituintes puros, e está sendo atualmente muito utilizado em diversas aplicações analíticas [14]. Uma das mais importantes razões para sua popularidade é que é possível a resolução de sinais, ainda em sistemas que apresentam forte sobreposição de bandas, ou interferentes não conhecidos ou não calibráveis, sendo esta uma notável característica do método. De outra parte, oferece facilidade na sua implementação e possibilita o direcionamento do resultado pela aplicação de restrições baseadas na informação química do sistema sob estudo. Como consequência, os procedimentos experimentais são notavelmente simplificados, conduzindo à diminuição do tempo de análise e consumo de reagentes.

No presente estudo é proposta a utilização do MCR em aplicações analíticas empregando espectroscopia SERS. O método de adição de padrão, em combinação com MCR

foi aplicado para determinar o antibiótico moxifloxacina e o alcalóide nicotina em urina, empregando ouro coloidal e ouro nanoestruturado. Ambas as aplicações permitiram a determinação em presença dos constituintes da urina, cuja variabilidade, inerente a cada indivíduo não permite sua calibração. Um sistema dinâmico multicomponente foi também objeto de estudo: a degradação fotolítica da moxifloxacina em meio básico. Os algoritmos SIMPLISMA e SVD foram utilizados para determinar as estimativas iniciais e o número de componentes envolvidos, respectivamente e o MCR permitiu monitorar o avanço do processo. Por fim, foi estudada a distribuição do fármaco paracetamol e sua interação com os excipientes em filmes poliméricos, empregando imagem SERS. Uma vez que ainda não tem sido reportadas aplicações na área farmacêutica, este estudo se mostra como uma alternativa para estudar sistemas de liberação controlada de fármacos, onde sua concentração não permite o estudo com espectroscopia Raman devido à baixa intensidade dos sinais.

Capítulo 1

ESPECTROSCOPIA RAMAN

AMPLIFICADA POR SUPERFÍCIE

1.1 Espectroscopia Raman

Para introduzir os fundamentos teóricos que permitem entender a espectroscopia Raman amplificada por superfície, SERS (*Surface-enhanced Raman Spectroscopy*), é indispensável fazer uma descrição do fenômeno de espalhamento da radiação eletromagnética ou efeito Raman.

Desde o ponto de vista clássico [15], quando uma molécula diatômica é irradiada com luz monocromática (uma fonte laser) o campo elétrico dessa radiação, induz um momento dipolar P que é igual à polarizabilidade da molécula α multiplicada pela magnitude do

campo elétrico E :

$$P = \alpha E \quad (1.1)$$

Esse efeito pode ser entendido como o redirecionamento da radiação, que ocorre quando uma onda eletromagnética interage com um dado material. Quando essa interação ocorre, as órbitas eletrônicas são perturbadas periodicamente com a mesma frequência (ν_0) do campo elétrico da onda incidente. A perturbação da nuvem de elétrons gera uma separação periódica de carga entre as moléculas, que é chamado momento dipolar P induzido o qual se manifesta como uma fonte de radiação eletromagnética gerando radiação espalhada.

A maior porcentagem da radiação é espalhada com frequência idêntica à da radiação incidente, processo chamado de espalhamento elástico. No entanto, radiação adicional é espalhada a diferentes frequências (ν_m) que correspondem às vibrações da molécula; processo conhecido como espalhamento inelástico. Quando o deslocamento da frequência ocorre para valores menores do que (ν_0), o processo é conhecido como *Stokes* e para valores superiores a (ν_0), é chamado de *anti-Stokes*.

O tratamento matemático clássico desse fenômeno está amplamente descrito na literatura e está baseado em um modelo de molécula diatômica simples, com os átomos ligados por uma mola e onde as vibrações da ligação são consideradas como um processo de deslocamento que segue a Lei de Hooke.

Baseado no fato que a polarizabilidade α de uma molécula é uma função do desloca-

mento q , o momento dipolar P pode ser expresso como:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (1.2)$$

Onde E_0 é a magnitude e ν_0 , a frequência do campo elétrico. Quando combinada com a função linear de deslocamento, a equação fica:

$$P = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + q_0 \cos(2\pi\nu_m t) E_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \left(\frac{\delta\alpha}{\delta t}\right)_{q=0} \quad (1.3)$$

A Eq.1.3 mostra dois termos que descrevem os efeitos resultantes da interação da molécula com a radiação. O primeiro corresponde ao espalhamento Rayleigh, efeito dominante mas sem mudança na frequência da luz incidente. O segundo termo descreve o espalhamento Raman e a expressão matemática pode se expandir na forma:

$$q_0 E_0 \left(\frac{\delta\alpha}{\delta t}\right)_{q=0} [\cos(2\pi\nu_0 - \nu_m t) + \cos(2\pi\nu_0 + \nu_m t)], \quad (1.4)$$

onde um incremento na frequência corresponde ao deslocamento anti-Stokes e sua diminuição é o Stokes. Um espectro Raman mostra só o espalhamento Stokes cuja intensidade é maior do que o anti-Stokes devido à menor probabilidade de encontrar moléculas em estados vibracionais excitados. De outro lado, em ausência de polarizabilidade, não haverá sinal Raman.

As bandas estreitas observadas nos espectros Raman seguem uma função Lorentziana e correspondem a vibrações particulares da molécula. O número de onda no espectro dependerá da força das ligações e a massa dos átomos e sua intensidade, da mudança na polarizabilidade. Uma grande quantidade de espécies químicas geram informação Ra-

man na faixa entre 700 e 2000 cm^{-1} que é conhecida como a região da impressão digital e os deslocamentos em número de onda menores estão associados com mudanças na orientação das moléculas fazendo com que a técnica seja útil para caracterização.

Amostras sólidas, líquidas ou gasosas podem ser analisadas por espectroscopia Raman sendo obtida informação altamente específica que complementa a espectroscopia no infravermelho, uma vez que moléculas que não são ativas em uma técnica, podem apresentar resposta na outra. Vibrações de ligações simétricas por exemplo, (C=C, C-C, P=S e S-S) geram bandas de alta intensidade.

Uma importante vantagem é a quase nula resposta Raman da molécula de água fazendo possível as aplicações na área bioanalítica onde o meio é quase sempre aquoso.

A grande desvantagem da técnica, que limita notavelmente sua versatilidade, é a baixa intensidade dos seus sinais devida à pequena secção transversal: $10^{-31} - 10^{-26} \text{ cm}^2$ por molécula, que em outras palavras significa que somente 0,001% da radiação incidente é espalhada inelasticamente.

A introdução de instrumentos com filtros mais eficientes e com detectores de carga acoplada, CCD (*Charge Coupled Detector*), a qualidade e o tempo de aquisição espectral têm sido melhorados. Além disso, diversas variações da técnica têm se desenvolvido com o intuito de melhorar a sensibilidade, a resolução espacial ou a especificidade. Entre elas, a técnica SERS que utiliza nanopartículas metálicas como intensificadoras do sinal Raman, tem atraído grande interesse e aplicabilidade devido à melhora na especificidade e sensibilidade analítica [16].

1.2 Espectroscopia SERS: efeito de amplificação por superfície

Embora a definição do efeito de amplificação por superfície seja continuamente modificada e novas explicações estão surgindo constantemente, hoje em dia o fenômeno está associado, em primeiro lugar, com a amplificação da radiação por excitação dos plasmons de superfície localizados [17, 18]. Durante o processo, a radiação é concentrada com maior probabilidade em espaços de certos materiais conhecidos como plasmônicos que são geralmente metais como prata, ouro e cobre.

O principal mecanismo causador do efeito, é chamado de amplificação eletromagnética gerado pela excitação dos plasmons de ressonância superficiais SPR (*Surface Plasmon Resonance*), processo que ocorre quando o campo elétrico da luz incidente interage com uma superfície composta de nanopartículas metálicas causando o deslocamento de elétrons livres. A carga não compensada sobre a superfície das nanopartículas conduz à polarização causando a oscilação de maior quantidade de elétrons em frequências conhecidas como ressonância de plasmon de superfície localizada, LSPR (*Localized Surface Plasmon Resonance*) gerando campos locais amplificados na superfície metálica, incrementando o sinal Raman que é proporcional ao quadrado do campo aplicado à molécula. Para que esse fenômeno aconteça, o comprimento de onda da luz incidente (comumente entre 400-1085 nm), deve ser maior do que o raio das nanopartículas cujo tamanho varia entre 10 e 100 nm para que os plasmons se localizarem na superfície delas.

O aumento na magnitude do campo eletromagnético produzido pela ressonância dos plasmons induz um dipolo no analito adsorvido, amplificando o espalhamento Raman.

A amplificação é fortemente dependente da relação da distância d entre a nanopartícula e a molécula de interesse com o raio da nanopartícula r , efeito que decai em um fator de:

$$\left[\frac{r}{(r+d)}\right]^{\frac{1}{2}} \quad (1.5)$$

O mecanismo secundário que permite também explicar o fenómeno de amplificação, envolve mecanismos de transferência de carga que surge da interação eletrônica entre o adsorvato e as nanoestruturas. Embora sejam possíveis vários tipos de transições energéticas, aquela que está associada ao efeito de amplificação por superfície ocorre para alguns adsorvatos que exibem deslocamentos em níveis de energia moleculares. Aqui, o metal atua como um passo intermediário entre o mais alto orbital molecular ocupado, HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e o mais baixo não ocupado, LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) do adsorvato permitindo os elétrons atingirem estados excitados com a metade da energia requerida.

Teoricamente, o mecanismo eletromagnético contribui com um fator de amplificação de $\approx 10^{10} - 10^{11}$ e o químico com até $\approx 10^3$, sendo esse último altamente específico.

Teorias recentes têm introduzido o conceito de *hotspots* e *hotparticles*, para explicar como o espaçamento entre duas nanopartículas nos agregados tem também uma grande influência na grandeza da amplificação SERS. Um estudo mostrou que o fator de amplificação é notavelmente incrementado quando a distância entre os centros de duas partículas é menor do que três vezes o tamanho do raio [19].

1.2.1 O conceito de fator de amplificação

A efetividade de um substrato SERS pode ser avaliada com um parâmetro chamado de fator de amplificação [20, 21], normalmente descrito como a razão entre a intensidade do espectro SERS da molécula e a do espectro Raman normal. Embora várias equações tenham sido propostas para calcular esse fator, para propósitos de comparação é usado o fator de amplificação analítico FA segundo a seguinte equação:

$$FA_{SERS} = \frac{\left[\frac{I_{SERS}}{N_{sup}} \right]}{\left[\frac{I_{NRS}}{N_{vol}} \right]} \quad (1.6)$$

onde a intensidade SERS de uma dada banda, I_{SERS} é normalizada pelo número de moléculas ligadas à superfície metálica N_{sup} . De forma análoga, a intensidade Raman é normalizada pelo número de moléculas no volume de excitação. Apesar da utilidade da equação, o principal problema na sua aplicação está na variação do cálculo dos valores de N_{sup} e N_{vol} e portanto para a grande maioria dos estudos, a estimativa desse valor é muito aproximada e vários grupos de pesquisa consideram que é mais significativo reportar os limites de detecção para moléculas individuais.

1.2.2 Substratos SERS: características e evolução

Existe uma grande variedade de amplificadores SERS, sendo ouro e prata os metais mais usados. Podem ser preparados em forma de colóides com diversas morfologias, filmes metálicos ou nanopartículas imobilizadas sobre diversos materiais (vidro silanizado, metais, silício). As metodologias empregadas para sua fabricação ou síntese têm mudado notavelmente nos últimos anos [5]. Houve inicialmente um grande interesse no entendi-

mento dos mecanismos do efeito amplificador e eram preparados metais com rugosidades mediante repetidos processos de oxidação-redução. Depois, foram introduzidos os sistemas coloidais de ouro e prata que ofereciam as maiores ampliações embora a reprodutibilidade interlaboratorial não fosse confiável. Porém, foi possível a detecção de moléculas biológicas, peptídeos, proteínas e partículas no ar.

Com as mudanças na instrumentação que foram melhorando a resolução a nanoescala, novos métodos foram desenvolvidos para criar nanoestruturas metálicas altamente organizadas como por exemplo a eletrogravação, a litografia e a deposição de metais sobre superfícies inertes. Esse último método fornece estruturas de alta qualidade mas não geram uma amplificação tão alta.

Outros tipos de substratos estão em contínuo desenvolvimento e as aplicações reportadas com eles são cada vez mais numerosas. Podem ser classificados em nanopartículas imobilizadas sobre superfícies planas, fabricadas usando métodos nanolitográficos e fabricadas usando técnicas *template*, sendo esses últimos de particular interesse porque permitem a deposição do metal com controle da geometria e podem ser produzidos em massa. Os procedimentos mais comuns usados na produção desses substratos são os eletroquímicos e a deposição por vapor. A seguir são mostrados alguns detalhes dos principais métodos.

Superfícies aleatoriamente ordenadas

Esses tipos de substratos são fabricados com ciclos sucessivos de oxidação-redução, aplicando primeiro um potencial de oxidação para produzir íons Ag^+ , seguido de um

potencial de redução, que faz o processo inverso. Repetindo o procedimento em ciclos, é formada uma superfície desordenada com rugosidades entre 25 até 500 nm com grande capacidade de amplificação, mas sem boa reprodutibilidade.

Também é possível gerar essas rugosidades por deposição em vácuo, evaporando os átomos metálicos sobre uma superfície termicamente controlada sob vácuo, criando finos filmes do metal. Variando a velocidade e temperatura de deposição, são obtidos substratos com diferentes características. Tecnologias recentes como a litografia têm sido utilizadas para fabricar suportes sólidos como pirâmides e fibras onde posteriormente as nanoestruturas são depositadas por vapor .

Em meio líquido, os colóides de ouro e prata são amplamente usados devido à facilidade e baixo custo de síntese e principalmente a possibilidade de controlar o tamanho e forma das partículas. Sua preparação segue uma rota de redução dos íons metálicos com borohidreto de sódio, ácido cítrico ou outros agentes redutores. Em alguns casos são utilizados surfactantes como brometo de cetil trimetil amônio, CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*), polivinilpirrolidona, PVP (*Polyvinyl pyrrolidone*) para controlar o tamanho dos agregados formados. Dessa forma é possível sintetizar sistemas coloidais com uma grande variedade de formas e tamanhos (nano-esferas, -cubos, -cilindros, -triângulos, -estrelas, -prismas).

A maioria dos colóides com tamanhos menores do que 100 nm de diâmetro são feitos por redução com NaBH_4 ou citrato de sódio de soluções aquosas de sais como nitrato de prata, AgNO_3 e ácido cloroáurico, HAuCl_4 . As espécies redutoras isolam os átomos do metal gerando uma carga superficial que permite a formação das nanopartículas que

podem ser armazenadas durante mais do que quatro semanas sem perder sua estabilidade.

No sistema coloidal há também uma formação natural de agregados de nanopartículas que são ainda menores do que o comprimento de onda da luz. A incidência de um feixe laser sobre esses agregados, cria os chamados *hotspots*, onde o sinal sofre maior amplificação. O processo de agregação pode ser induzido com temperatura, pH ou adição de eletrólitos e pode ser monitorado visualmente pelas mudanças da cor que pode variar de amarelo até vermelho ou de violeta para cinza, dependendo do metal. Essas mudanças dependem da variação do plasmon de ressonância do meio coloidal que pode ser visualizada com a banda de absorção, cujo valor máximo está associado ao tamanho do aglomerado ou da partícula. O ouro coloidal por exemplo apresenta tipicamente um valor máximo de absorção próximo de 518-520 nm para partículas de tamanho ≈ 15 nm e esse máximo é deslocado para ≈ 543 e ≈ 558 nm quando a partícula aumenta seu tamanho para ≈ 74 e ≈ 86 nm respectivamente.

Não obstante as vantagens oferecidas pelos sistemas coloidais como a facilidade de preparação e boa amplificação, há algumas desvantagens importantes como a baixa estabilidade do sinal SERS devido à variação do espaçamento interpartículas e ao movimento Browniano das moléculas em solução. Para os casos onde é usado surfactante, sua presença diminui o efeito de amplificação. Além disso, acima de um dado nível de concentração, o analito pode causar agregação afetando a reprodutibilidade das medidas. Em uma tentativa por melhorar a estabilidade desses sistemas, soluções do colóide são depositados sobre uma superfície plana como silício ou vidro e a medida é feita após

secagem. Porém, a interação suporte-nanopartículas é frágil e ao depositar a amostra, há um reordenamento do material amplificador afetando totalmente a medida. Alternativas como a silanização permitem fixar as nanopartículas em superfícies de vidro empregando um procedimento que inclui em primeiro lugar uma limpeza por incubação em soluções ácidas (solução piranha ou misturas ácido-base), seguida por álcool ou hidróxidos e finalmente lavagem com solventes e aquecimento. O vidro é depois funcionalizado com um ligante silano que é adsorvido na superfície do vidro através do grupo tiol e que se une às nanoestruturas pelo grupo funcional do outro extremo, por exemplo 3-aminopropiltriethoxysilano, APTES (*3-aminopropyltriethoxysilane*) ou 3-aminopropiltriethoxysilano, APTMS(*3-aminopropyltriethoxysilane*). Com esta técnica é possível obter monocamadas de nanopartículas uniformes o suficiente para intensificar o sinal em fatores de até 10^8 . Para algumas análises, o tamanho do analito exige procedimentos de marcação com tintas moleculares cujo espectro SERS é conhecido e de alta intensidade. Esse procedimento tem sido muito útil na detecção de moléculas biológicas.

Nanoestruturas periódicas ordenadas

Dentre as técnicas que permitem fabricar estruturas ordenadas, estão a fotolitografia, litografia por feixe de elétrons, EBL (*Electron beam lithography*), fresagem com feixe de íons focalizado, FIB (*Focused Ion Beam*) e litografia de nanoesferas.

A fotolitografia é a técnica mais amplamente usada na fabricação de arranjos com diferentes morfologias (pirâmides invertidas, cavidades, postes, pilares) acima dos quais são depositadas as nanopartículas metálicas. Essa técnica envolve a remoção controlada do material do suporte empregando uma máscara para formar as estruturas desejadas,

porém, devido ao fato que há um limite de resolução dependente do feixe utilizado, não é possível produzir o espaçamento necessário para gerar a intensificação suficiente dos sinais. Para produzir o espaçamento requerido, é empregada a gravação química. Esses tipos de substratos oferecem uma razoável reprodutibilidade mas são fabricados para uma única análise.

De outro lado, técnicas como EBL e FIB produzem substratos reprodutíveis e resolução em nanoescala, mas não são uma boa opção para produção em massa por causa do tempo requerido para sua fabricação. A primeira, segue um procedimento de remoção do material ou gravação química de lâminas de silício e posterior deposição do metal em forma de vapor. A FIB emprega um feixe iônico de Ga para gerar nanocavidades diretamente no metal com resolução espacial de aproximadamente 10 nm.

A litografia de nanoesferas faz uma deposição de uma camada de esferas de poliestireno seguida por deposição do vapor metálico [22]. Somente as partículas de prata que sobressaem dos interstícios entre essas esferas formam um arranjo periódico de nanopartículas triangulares.

Capítulo 2

RESOLUÇÃO MULTIVARIADA DE

CURVAS e FERRAMENTAS

QUIMIOMÉTRICAS COMPLEMENTARES

2.1 Resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternantes, MCR-ALS

A resposta total de um sistema multicomponente pode ser resolvida nas contribuições dos seus constituintes puros, gerando informação útil que descreve o sistema. Cada componente é definido como uma entidade que fornece uma resposta distinguível e real, por exemplo um composto químico em uma mistura, um intermediário de uma reação, um estado conformacional, dentre outros. Os métodos de resolução usualmente não requerem uma grande quantidade de informação prévia do sistema pois nem sempre é

possível conhecer *a priori* o número e/ou a natureza dos componentes. Porém, uma característica importante é que os dados devem apresentar uma estrutura linear [23].

2.1.1 MCR-ALS, o processo básico

Em MCR-ALS *Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares*, a resposta total de um sistema ou processo é organizada em uma matriz **D** que contém a contribuição de todos os componentes presentes. Essa matriz é decomposta no produto das matrizes **C** e **S^T**, as quais contêm os escores e os perfis de resposta instrumental para cada amostra, respectivamente. Essa operação é descrita na Eq.2.1.

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E}, \quad (2.1)$$

e a matriz **E** é uma matriz de erros, contendo a variação residual dos dados e não possui informação química. Maior detalhe do conteúdo destas matrizes é mostrada na Fig.2.1.

Os índices *r* e *c* representam o número de linhas e colunas da matriz original respectivamente e *n* é o número de componentes químicos na mistura ou processo.

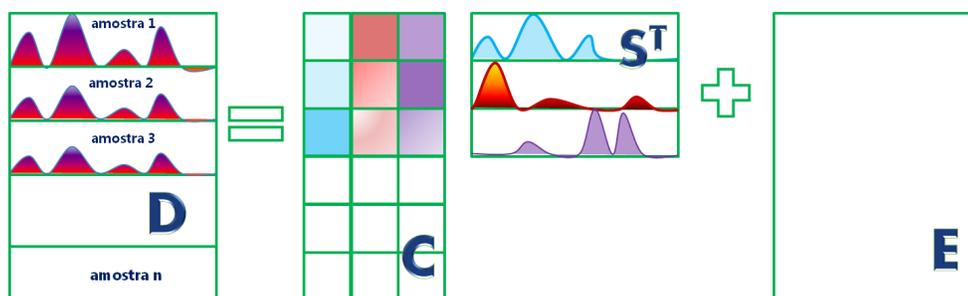


Figura 2.1: Resolução multivariada de curvas, MCR.

Para inicializar o MCR-ALS, é necessária uma estimativa inicial de **C** ou **S** que pode ser

previamente conhecida ou estimada mediante algoritmos adequados. Essa estimativa é então otimizada por um processo iterativo de mínimos quadrados alternantes. Supondo que \mathbf{S}^T é a matriz empregada como estimativa na inicialização do processo iterativo, a matriz \mathbf{C} será estimada por regressão de mínimos quadrados, da forma:

$$\mathbf{C} = \mathbf{D}\mathbf{S}(\mathbf{S}^T\mathbf{S})^{-1}, \quad (2.2)$$

e essa nova estimativa da matriz \mathbf{C} pode ser usada para recalculá-la por mínimos quadrados uma nova estimativa da matriz \mathbf{S}^T , processo que é repetido até atingir a convergência [24]:

$$\mathbf{S}^T = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D} \quad (2.3)$$

Porém, a resolução da matriz \mathbf{D} gera um número infinito de possíveis soluções de \mathbf{C} e \mathbf{S}^T que podem ser condicionadas pela aplicação de algumas restrições no algoritmo, como por exemplo não-negatividade em espectros e/ou concentrações, seletividade ou a inclusão de matrizes que forcem o resultado para valores conhecidos do sistema.

Apesar que a aplicação das restrições diminui notavelmente o número de soluções para \mathbf{D} e aproxima os valores à realidade do sistema químico, ainda existem ambiguidades nos resultados, que podem ser rotacionais ou de intensidade. A primeira ocorre quando existem dois componentes que independem linearmente. O perfil espectral ou de concentração para qualquer um deles, será uma combinação linear desconhecida dos componentes reais. Quando há ambiguidade na intensidade, as concentrações e espectros estimados são escalados por um fator desconhecido o qual não representa um problema

em análises qualitativas mas sim em quantificações. Por outro lado, para aqueles espectros onde há só uma espécie presente ou para as regiões onde só uma espécie apresenta resposta, a ambiguidade rotacional não está presente [25]. A melhor alternativa para solucionar esses problemas está na detecção das regiões com essa particularidade (posto químico local), ou em outras palavras, na determinação do número de contribuintes independentes à resposta total .

A determinação do mencionado posto químico ou *rank* é de grande importância em sistemas multicomponente pela influência que essa informação tem na obtenção de soluções únicas [26]. Porém, na prática, os sistemas dinâmicos apresentam com frequência dados com posto químico deficiente, ou seja, quando a insuficiência de informação não permite estabelecer esse valor e estimar suas respostas. Para esses casos, a determinação pode ser realizada com alguns algoritmos como SVD, EFA ou SIMPLISMA como serão descritos brevemente.

2.1.2 Restrições no MCR-ALS

A aplicação de restrições na inicialização do MCR-ALS limita o número de resultados possíveis que descrevem ou permitem analisar um dado sistema químico. Essas restrições são baseadas nas características físicas e/ou químicas do processo sob estudo, no tipo de resposta instrumental e nos pré-processamentos aplicados:

Não negatividade

Esta restrição gera resultados com valores positivos, e pode ser aplicada tanto à matriz **C**, quanto à \mathbf{S}^T e seu uso é indispensável, toda vez que as magnitudes físicas não têm sentido com valores negativos. De outro lado, a não negatividade na resposta instrumental depende dos dados gerados pelo equipamento. Para a espectroscopia Raman, por exemplo, a restrição normalmente é aplicada. Porém, pré-processamentos como as derivadas comprometem sua utilização por causa da distribuição dos valores ao redor do zero.

Balanço de massa ou *closure*

Em alguns estudos cinéticos, em sistemas em equilíbrio, ou com volume total fixo, é possível condicionar os resultados das concentrações relativas para que a soma dos componentes seja igual a um (1), sempre que conhecida a massa ou volume do sistema global. Com essa referência, as porcentagens de cada constituinte são facilmente calculadas.

Restrição por correlação

A estratégia de utilizar essa restrição foi proposta para o caso geral onde o objetivo é realizar uma determinação quantitativa de uma dada espécie em presença de interferentes não conhecidos ou não calibráveis. Para sua aplicação, são introduzidos dois subconjuntos:

- um de calibração, contendo amostras com concentrações conhecidas (de referência),

- um conjunto teste, contendo as amostras desconhecidas,

é realizada uma série de passos durante cada iteração da otimização ALS onde as concentrações (x) do subconjunto de calibração são forçadas a se correlacionar com seus valores conhecidos ou de referência (k) do analito em essas amostras. O ALS constrói um modelo local linear e calcula as concentrações nominais por regressão de mínimos quadrados [24, 27].

2.1.3 A estratégia MCR-ALS e o método de adição de padrão

Uma interessante possibilidade do MCR-ALS é o acoplamento com o método de adição de padrão que já tem sido estudado em alguns casos específicos [28, 29]. A aplicação dessa estratégia é feita pela construção de uma matriz aumentada, isto é, a matriz **D** da Eq.2.1 contém uma submatriz **D1** contendo as amostras desconhecidas e a submatriz **D2** contendo a série de amostras com as adições sucessivas do padrão, como ilustrado na Fig.2.2.

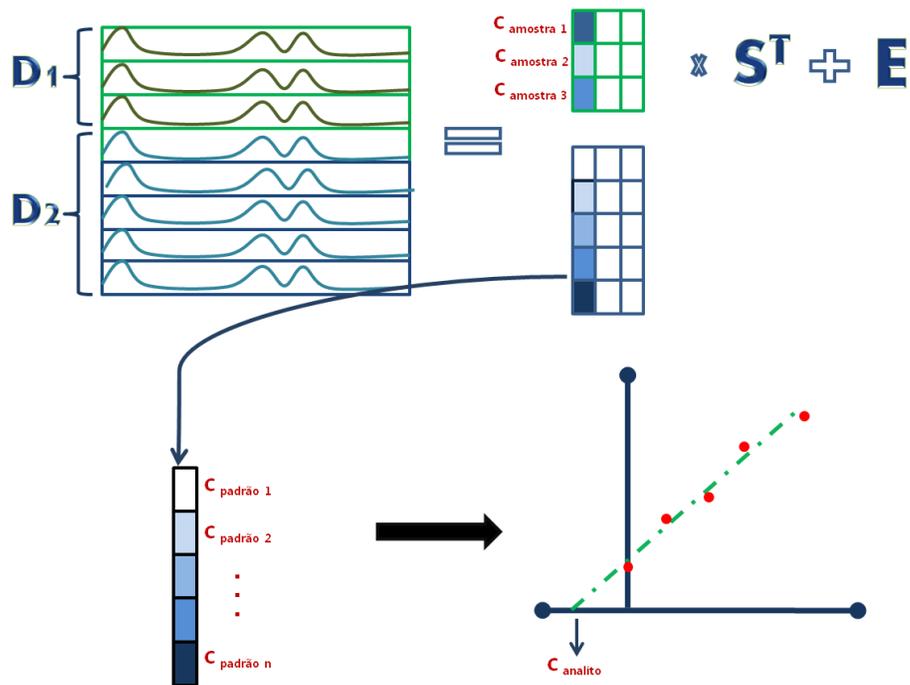


Figura 2.2: MCR e o método de adição de padrão.

Após a decomposição de D , os valores resolvidos na matriz C de escores, são utilizados para previsões quantitativas. Os escores da submatriz D_2 são utilizados para construir uma curva pseudo-univariada de adição de padrão, plotando-os contra as concentrações conhecidas de cada adição. Sendo que $r(1,n)$, são as respostas do componente n na amostra i , uma reta é ajustada e o cálculo das concentrações para as amostras desconhecidas é feita pelo procedimento clássico utilizando a equação da reta [30]:

$$[r(1, n)|r(2, n)|\dots|r(I, n)] = m_1[0|\mathbf{y}^T] + \mathbf{n}_1 \quad (2.4)$$

$$y_u = \frac{n_1}{m_1} \quad (2.5)$$

Onde n corresponde ao analito, y_u à concentração predita e \mathbf{y} ao vetor das concentrações do padrão adicionado às amostras.

De forma similar, é possível fazer uma calibração incluindo um procedimento de subtração digital prévio à aplicação do MCR, assim: a resposta da amostra desconhecida é subtraída digitalmente das respostas que contém amostra com as adições do padrão. O objetivo é isolar a resposta das adições sucessivas do padrão, mas mantendo o *background* da amostra. Após a decomposição, a quantificação pode ser feita segundo as Eq.2.7 e 2.8:

$$[r(2, n)|r(3, n)|\dots|r(I, n)] = m_2[0|\mathbf{y}^T] + \mathbf{n}_2 \quad (2.6)$$

$$y_u = \frac{a(I, n) - n_2}{m_2} \quad (2.7)$$

Aqui, a amostra 1 é a amostra desconhecida e as amostras 2 até I, corresponderiam as adições do padrão.

2.1.4 Interferências espectrais e vantagem de segunda ordem

O tratamento das interferências espectrais em quimiometria depende diretamente do tipo ou ordem dos dados coletados (e tipo de equipamento). O conceito de ordem está relacionado com a resposta obtida para uma amostra dada [31, 32]. Assim, instrumentos de ordem zero geram um valor por amostra (eletrodos de íon seletivo, fotômetros com filtro único); os de primeira-ordem geram ao mesmo tempo múltiplas medidas por amostra que são arranjadas em forma vetorial ou tensores de primeira ordem (espectroscopia vi-

bracional, voltametria). As técnicas instrumentais de segunda ordem como as técnicas hífenadas (GC/MS, MS/MS) geram uma matriz de dados por amostra.

Enquanto análises com dados de primeira ordem não são possíveis em presença de interferentes embora estes possam ser detectados; com dados de ordem zero não é possível sequer detectá-los. Já as calibrações de segunda ordem são possíveis ainda quando há interferentes, sendo ademais desnecessária sua inclusão no modelo de calibração, propriedade que é chamada de vantagem de segunda-ordem.

Algoritmos como PARAFAC (*PARA*lell *FA*ctor *AN*alysis), PARAFAC2 ou MCR-ALS, alcançam naturalmente a vantagem de segunda ordem devido à capacidade dos seus algoritmos internos para decompor a contribuição dos analitos e dos interferentes. Porém, com dados de primeira ordem, alcançar essa vantagem é um processo de maior complexidade. Várias metodologias têm sido propostas com o objetivo de quantificar analitos em presença de interferentes [33]. Uma delas utiliza uma faixa do espectro onde a contribuição dos interferentes é relativamente baixa se comparada com a do analito e faz uma regressão do valor chamado de sinal analítico líquido do analito na amostra em função do seu sinal na forma pura. A presença de interferentes é detectada quando essa regressão não se ajusta à linearidade e é sob esse princípio que podem ser selecionadas regiões onde os gráficos são lineares.

Uma segunda alternativa utiliza a técnica de regressão de componentes principais, PCR (*Principal Component Regression*) onde são extraídas da resposta instrumental, as regiões que não estão sendo adequadamente modeladas pelas componentes principais. Após esta correção, o espectro é avaliado usando PCR da forma convencional.

Uma interessante e mais recente proposta, é o emprego do MCR-ALS com a restrição de correlação, que modela subconjuntos de dados de primeira ordem, onde um deles contém só as respostas dos padrões da calibração em ausência de interferentes. O ganho adicional está na possibilidade de recuperar somente a contribuição do analito sem os interferentes. Esse caso excepcional onde é atingida a vantagem de segunda ordem empregando dados de primeira ordem tem sido publicado em alguns poucos estudos com sistemas que apresentam efeito de matriz e/ou extrema superposição de sinais [28, 34].

2.1.5 Avaliação de resultados e algumas figuras de mérito

Figuras de mérito das determinações quantitativas

Em aplicações analíticas que envolvem determinações quantitativas é necessário estabelecer alguns parâmetros que permitam comparar ou certificar a qualidade dos resultados obtidos de acordo com um dado requerimento ou em referência a um objetivo específico. As figuras de mérito em calibração multivariada já tem sido estabelecidas e reportadas amplamente na literatura [35].

Para o caso específico do MCR, as concentrações relativas obtidas em **C** podem ser utilizadas na construção de curvas analíticas pseudo-univariadas de calibração externa ou de adição padrão e suas respectivas figuras de mérito são calculadas de forma similar aos tratamentos univariados como será brevemente descrito a seguir [36–39]:

- Precisão:

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{r}_i - r_i)^2}{n - 1}} \quad (2.8)$$

Onde S_R denota o desvio padrão das respostas, r_i e r_i as respostas experimental e prevista do padrão i respectivamente e n é o número de padrões.

- Limite de detecção, LD

$$LD = +t \frac{S_R}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.9)$$

Onde, b é o coeficiente angular da curva analítica, m o número de replicatas, n o número de pontos da curva, t o valor de t de *Student* para $n-2$ graus de liberdade, x_i é a concentração do analito em cada padrão e \bar{x} , a concentração média.

- Exatidão

$$Erro(\%) = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{amostras} (c_i - \hat{c}_i)^2}}{\sqrt{\sum_{i=1}^{amostras} c_i^2}} \times 100 \quad (2.10)$$

Onde c_i e \hat{c}_i são as concentrações do analito na amostra e a calculada pelo modelo de calibração, respectivamente.

Validação da otimização com MCR

Uma forma de avaliar a qualidade da resolução das respostas instrumentais otimizadas pelo MCR, é por comparação com a respetiva estimativa inicial. A figura de mérito que permite fazer essa avaliação é a falta-de-ajuste, *lof* (*Lack-of-fit*) que descreve a diferença entre a soma dos quadrados da estimativa inicial e a soma da variação modelada pelo MCR [40], e matematicamente tem a forma:

$$lof(\%) = 100 \sqrt{\frac{\sum_{ij} (d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_{ij} d_{ij}^2}} \quad (2.11)$$

Onde d_{ij} é um elemento da matriz \mathbf{D} (por exemplo a intensidade Raman para a amostra i no número de onda j) e \hat{d}_{ij} é o correspondente elemento calculado pelo MCR. O valor

de $\text{lof}(\%)$ permite comparar a qualidade do ajuste em termos relativos e nas mesmas unidades da resposta instrumental.

2.2 Ferramentas quimiométricas complementares

2.2.1 SIMPLISMA, um algoritmo de automodelamento

SIMPLISMA (*SIMPL*e-to-use *Interactive Self-Modelling Algorithm*) é um método de automodelamento baseado na seleção das chamadas variáveis puras. Em termos espectroscópicos, uma variável pura é definida como aquela cuja intensidade é devida somente a um dos componentes da mistura sob consideração. O objetivo do automodelamento é a resolução da matriz de dados nos perfis de concentração e espectros puros presentes, sendo desnecessário fazer suposições sobre sua forma ou perfis. A teoria do funcionamento do SIMPLISMA é explicada a seguir [41, 42].

Determinação da primeira variável pura

Tomando como referência um exemplo de uma matriz de dados com 13 misturas de 3 componentes (variáveis), onde cada uma delas tem contribuições de um ou mais componentes e é uma combinação linear positiva dos eixos dos três componentes. Assim, cada variável estará contida por esses eixos como mostrado na Fig.2.3 e se cada uma delas é representada por um vetor cujo comprimento está limitado pelo plano triangular, sua projeção no plano gera a Fig.2.4.

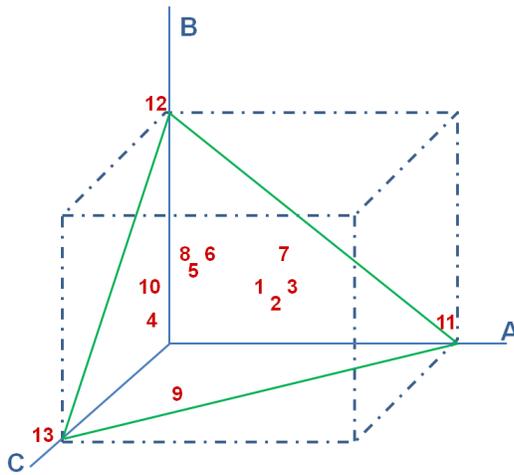


Figura 2.3: Gráfico 3D de um sistema com 13 amostras e 3 variáveis A,B e C.

A posição de cada vetor dentro do triângulo fornece uma medida direta das contribuições dos três componentes. A variável que possua apenas a contribuição de um deles, é chamada de variável pura. Essa primeira variável é calculada determinando o vetor com o maior comprimento.

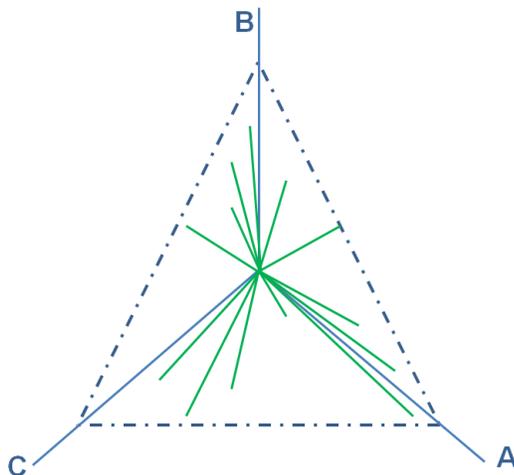


Figura 2.4: Projeção de vetores para a determinação das variáveis puras empregando SIMPLISMA.

Sendo que essa propriedade está determinada pela pureza da variável, é possível graficar um espectro que representa essa pureza, onde uma alta intensidade corresponderá a uma variável relativamente pura (primeira variável pura) e uma variável com baixa intensidade terá contribuições de vários componentes. A apresentação dos valores de pureza em forma de espectro tem uma relação mais direta com os dados originais e permite uma melhor interpretação.

O seguinte procedimento é utilizado para calcular a pureza das variáveis: se \mathbf{D} é uma matriz de dados de dimensão $w \times s$, onde w é o número de variáveis e s o número de espectros (amostras), o comprimento (λ_i) de uma variável i , é:

$$\lambda_i = \left(\frac{1}{c} \sum_{j=1}^c (d_{i,j})^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.12)$$

A relação entre o comprimento, a média e o desvio padrão é:

$$\lambda_i^2 = \mu_i^2 + \sigma_i^2 \quad (2.13)$$

Onde μ_i é a média da variável i :

$$\mu_i = \left(\frac{1}{c} \sum_{j=1}^c (d_{i,j}) \right) \quad (2.14)$$

e σ_i é o desvio padrão da variável i :

$$\sigma_i = \left(\frac{1}{c} \sum_{j=1}^c (d_{i,j}) - \mu_i \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.15)$$

A representação vetorial da relação descrita pela Eq.2.15 é um triângulo com lados σ e μ e hipotenusa λ . O vetor μ representa a distância entre a origem de uma variável particular

e o plano triangular, e λ representa o comprimento da variável. O vetor σ representa a contribuição da variável no triângulo das misturas. O valor de σ não representa a pureza, como na Fig.2.4 porque cada vetor dos componentes tem diferente comprimento. Uma forma apropriada de escalar os vetores é limitando seu comprimento com um plano triangular como mostrado na Fig.2.3, para gerar a projeção da Fig.2.4. Em consequência, a pureza da variável i representada no triângulo é definida por:

$$\rho_{i,1} = \frac{\sigma}{\mu_i} \quad (2.16)$$

Onde o segundo subscrito do valor da pureza ρ indica que é o valor da maior pureza. Porém, quando o valor da média se aproxima a zero, a pureza tende ao infinito e é necessária uma correção para compensar esse efeito e a Eq.2.18 é redefinida como segue:

$$\rho_{i,1} = \frac{\sigma}{(\mu_i + \alpha)} \quad (2.17)$$

Se α tem um valor relativamente baixo, com respeito a μ_i , o efeito será desprezível, mas para valores baixos de μ_i (no nível do ruído), o efeito é justamente a correção do ruído causando diminuição do valor da pureza.

Em termos práticos, todos os valores de ρ_1 são mostrados na forma de espectros nos quais, o número de onda (ou comprimento de onda) com a maior intensidade representa a variável mais pura. Essa forma de visualização facilita a detecção de variáveis geradas por propriedades não esperadas dos dados.

Determinação das próximas variáveis puras

Considerando que as variáveis puras contêm as outras variáveis como ilustrado na Fig.2.3, a próxima variável pura é a mais independente da primeira e essa independência, assim como o posto da matriz ou número de variáveis independentes é calculada com uma função baseada em determinantes da seguinte forma:

Em primeiro lugar é calculada uma matriz de correlação ao redor da origem (**COO**). Para isso, os dados são escalados pelo comprimento e corrigidos de novo pelo fator α .

$$d(\lambda)_{i,j} = d_{i,j}/(\mu_i^2 + (\sigma_i + \alpha)^2)^{\frac{1}{2}} \quad (2.18)$$

A matriz **COO** é então igual a:

$$\mathbf{C} = \frac{\mathbf{1}}{c} \mathbf{D}(\lambda) \mathbf{D}(\lambda)^T \quad (2.19)$$

e é calculado o próximo determinante para a variável i :

$$\epsilon_{i,2} = \begin{vmatrix} c_{i,i} & c_{i,\rho_1} \\ c_{\rho_1,i} & c_{\rho_1,\rho_1} \end{vmatrix} \quad (2.20)$$

Onde o índice ρ_1 representa a primeira variável pura. Com esse princípio, são determinadas as próximas variáveis puras. Para a segunda variável a descrição matemática seria:

$$\rho_{i,2} = \left(\frac{\sigma_i}{(\mu_i + \alpha)} \right) \epsilon_{i,2} \quad (2.21)$$

e o determinante para o caso geral onde $i \geq 2$, é:

$$\epsilon_{i,j} = \begin{vmatrix} C_{i,i} & C_{i,\rho_i} & \dots & C_{i,\rho_{j-1}} \\ C_{\rho_1,i} & C_{\rho_1,\rho_1} & \dots & C_{\rho_1,\rho_{j-1}} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ C_{\rho_{j-1},i} & \dots & \dots & C_{\rho_{j-1},\rho_{j-1}} \end{vmatrix} \quad (2.22)$$

onde o índice i , representa a variável para a qual é calculado o determinante, e j , o índice da variável pura para a qual está sendo calculado o determinante. De forma análoga à Eq.2.25 o espectro da pureza é:

$$\rho_{i,j} = \left(\frac{\sigma_i}{(\mu_i + \alpha)} \right) \epsilon_{i,j} \quad (2.23)$$

e para o desvio padrão do espectro:

$$s_{i,j} = \sigma_i \epsilon_{i,j} \quad (2.24)$$

Incluindo o fator de correção α , os valores para $\epsilon_{i,1}$, são:

$$\epsilon_{i,1} = \frac{\lambda_i^2}{(\mu_i^2 + (\sigma_i + \alpha)^2)} \quad (2.25)$$

Determinação do número de componentes:

Se para um dado caso, duas variáveis puras são representativas do sistema completo da mistura, as outras variáveis serão suas combinações lineares gerando valores de zero na função determinante da Eq.2.12, para os valores onde $j = 3$.

Como consequência, a pureza resultante e os desvios padrão dos espectros das Eq.2.13 e 2.14 deveriam mostrar também valores de zero. Na prática, esses valores serão positivos devido ao ruído. A determinação do posto da matriz está baseada na intensidade total relativa do desvio padrão dos espectros, uma vez que esse último tem a relação mais próxima com os dados originais. Tem-se:

$$R_{sj} = 100 \frac{\sum_{i=1}^v S_{i,j}}{\sum_{i=1}^v S_{i,1}} \quad (2.26)$$

Essa função tem um valor máximo de 100 que seria o valor quando nenhuma variável tem sido ainda determinada. Em consequência esses valores são considerados relativos em relação ao desvio padrão do espectro antes da extração das variáveis puras. A razão dos valores sucessivos para essa função facilita o processo

$$R_{rj} = R_{sj}/R_{s(j+1)} \quad (2.27)$$

Devido a que o valor de R_{sj} se aproxima a zero depois de usar o número apropriado de variáveis puras, o valor da função será relativamente alto após atingir o número de variáveis puras correto.

As intensidades totais dos espectros como ferramenta diagnóstica precisa ser usada em conjunto com uma avaliação visual da pureza e o desvio padrão do espectro que também facilitará a determinação do número de componentes.

Resolução em espectros e concentrações

Após as variáveis puras serem determinadas, o conjunto de dados é resolvido nos componentes puros e suas contribuições nos espectros originais. A matriz de dados \mathbf{D} pode ser expressa como uma mistura com a Eq.2.30:

$$\mathbf{D}^T = \mathbf{C}\mathbf{P} \quad (2.28)$$

Onde \mathbf{D}^T ($c \times v$), contém os espectros da mistura nas linhas. A matriz \mathbf{C} ($c \times n$) contém as quantidades relativas dos componentes puros nas colunas. \mathbf{P} ($n \times v$) contém os espectros (desconhecidos) dos componentes puros nas linhas. As intensidades das variáveis puras dos espectros em \mathbf{D} , são usadas em \mathbf{C} e \mathbf{P} que pode ser resolvido pelo método dos mínimos quadrados:

$$\mathbf{P} = (\mathbf{C}^T\mathbf{C})^{-1}\mathbf{C}^T\mathbf{D}^T \quad (2.29)$$

De outro lado, a matriz \mathbf{A} ($c \times n$) de concentrações é calculada com a Eq.2.32:

$$\mathbf{A} = (\mathbf{D}^T\mathbf{D})^{-1}\mathbf{D}^T\mathbf{Q}^T \quad (2.30)$$

onde \mathbf{Q} ($n \times v$) contém os espectros normalizados.

Embora as intensidades das variáveis puras (após serem normalizadas) possam ser usadas para calcular as concentrações, o uso do método de mínimos quadrados para obtê-las tem a vantagem de conduzir à eliminação do ruído.

Capítulo 3

A IMAGEM HIPERESPECTRAL: OUTRA DIMENSÃO DA ESPECTROSCOPIA

O conceito de imagem química ou hiperespectral surgiu em 1988 com o primeiro mapa químico registrado na faixa do infravermelho médio, MIR (*Medium Infra Red*) e pode ser entendida como uma nova dimensão da espectroscopia, que complementa a informação química por aquisição simultânea de espectros espacialmente localizados por unidade de superfície (ou píxel) de uma dada amostra, possibilitando a visualização da distribuição das espécies e a obtenção de informação qualitativa e quantitativa. Embora esse conceito seja relativamente recente, o uso de imagens como ferramentas analíticas está se expandindo continuamente e em paralelo com o desenvolvimento da instrumentação adequada para a aquisição de imagens, computadores e programas que permitem o processamento e extração de informação de grandes grupos de dados.

A possibilidade de estudar inúmeras moléculas empregando esses tipos de combinações,

faz com que as aplicações sejam muito variadas, indo desde física e medicina até o controle de qualidade em indústrias como a farmacêutica ou a de alimentos e mais recentemente em tecnologias analíticas de processos, PAT (*Process Analytical Technology*) [43]. A obtenção de uma imagem hiperespectral é realizada pela aquisição de centenas de espectros em uma dada faixa de comprimentos de onda, comumente utilizando um espectrômetro que possui um mecanismo móvel, previamente programado para se deslocar em uma série de pontos ou posições espaciais para cada uma das quais é adquirido um espectro. As regiões espectrais mais utilizadas para a aquisição de imagens são o infravermelho próximo, NIR (*Near Infra Red*), Raman e MIR. A imagem resultante é uma matriz tridimensional ou cubo de dados que armazena a informação em unidades altamente correlacionadas conhecidas como píxeis, e oferece a possibilidade de identificar e localizar espécies químicas em uma dada área .

A informação resultante pode ser entendida ou analisada de duas formas:

- O cubo de dados pode ser explorado como contendo espectros espacialmente localizados empregando as ferramentas de processamento da espectroscopia clássica.
- Os dados podem ser analisados em forma de imagens extraindo informação espacial de alta qualidade.

3.1 Aquisição de uma imagem hiperespectral

A informação espectral-espacial na superfície de uma amostra é adquirida mediante as seguintes opções, também mostradas na Fig.3.1:

- Mapeamento por pontos: O procedimento é realizado empregando uma combi-

nação do espectrômetro com um mecanismo móvel. Previamente é definida uma rede regular de pontos cobrindo uma área superficial. Um espectro é medido na primeira posição e a amostra é deslocada até a seguinte posição onde é registrado o segundo espectro e assim sucessivamente até varrer toda a área programada.

- Imagem em linha: O detector adquire as dimensões espacial e espectral simultaneamente seguindo uma linha na superfície amostrada.
- Arranjo no plano focal ou de campo amplo: Os detectores óticos estão compostos de várias centenas de elementos formando uma matrix de pixels. Com essa técnica é possível adquirir centenas de espectros simultaneamente.

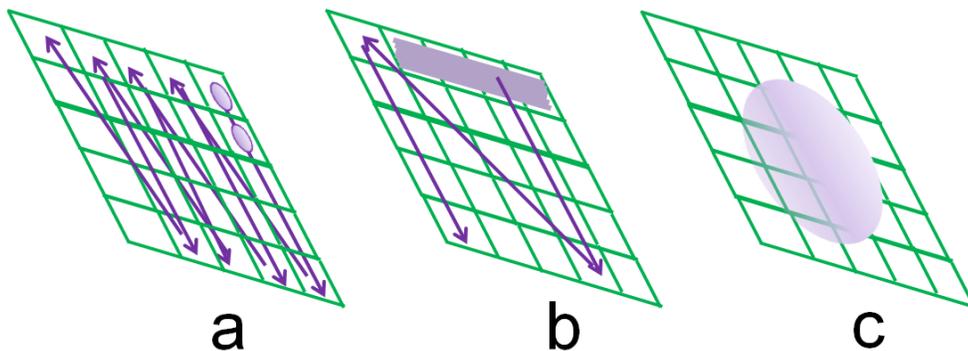


Figura 3.1: Mapeamento por a) pontos, b) em linha, c) de campo amplo.

Uma comparação simples das três técnicas mostra obvias vantagens da técnica de campo amplo em termos de tempos de aquisição que são atingidos rapidamente e pela possibilidade de estudar várias amostras simultaneamente empregando um acessório para esse propósito. De outro lado é importante mencionar que para o caso de imagens empregando espectroscopia Raman, a resolução espacial está limitada pelo diâmetro da fonte laser que pode ir desde 250 nm até 1 μm .

3.2 Análise e extração de informação de dados de uma imagem hiperespectral

Existem atualmente uma grande quantidade de técnicas e algoritmos úteis no processamento de imagens e sua escolha dependerá do tipo de imagem, o equipamento usado e a informação que se espera obter. Em um ambiente científico é possível obter diferentes tipos de imagens que se classificam segundo suas propriedades. Toda vez que uma imagem é uma representação espacial de um objeto, e é dividida em pixels, é necessário mencionar conceitos como a resolução espacial que depende da relação tamanho de imagem/tamanho de pixel e a resolução espectral, ou seja, a quantidade de canais de informação diferentes (ou números de onda) que podem ser obtidos em cada pixel. Segundo a resolução espectral, as imagens são classificadas nos seguintes tipos:

- Imagens de um único canal: são imagens binárias com dois valores possíveis por canal, comumente branco e preto, embora algumas possam ser compostas por escalas de cinza ou duas cores diferentes, com intensidade diferente para cada pixel.
- Imagens de espaço de cor: a cor de cada pixel é definida como a combinação de cores diferentes em um espaço determinado que usualmente é RGB (*Red, Green and Blue*). Cada pixel tem três canais de informação correspondentes a valores de vermelho, verde e azul.
- Imagens multibanda (ou imagens multivariadas): são imagens capturadas em frequências ou comprimentos de onda específicos que são normalmente selecionados com filtros, fornecendo informação seletiva para cada canal.

- Imagens hiperespectrais: baseadas no mesmo conceito das imagens multibanda, têm a capacidade de fornecer informação espectral contínua (vários comprimentos de onda) em cada pixel.

A seguir serão discutidos uma série de procedimentos que podem ser utilizados para extrair informação química e de distribuição espacial de um conjunto de dados que representam uma imagem hiperespectral.

3.2.1 Desdobramento

Como previamente mencionado, a espectroscopia de imagem gera conjuntos de dados em três dimensões, duas delas espaciais e a outra espectral, formando um cubo de dados que requer um primeiro procedimento simples de desdobramento, como ilustrado na Fig.3.2, onde a informação de cada píxel, na dimensão λ é «retirada» do cubo e empilhada em uma matriz **D**. Os dados organizados dessa forma estão acondicionados para todos os tratamentos quimiométricos necessários. Após seu tratamento, as imagens são reconstruídas mantendo a dimensionalidade. Por exemplo, para uma imagem quadrada com 25 espectros em cada dimensão espacial (25×25) com varredura em 700 variáveis, a matrix **D** teria 625 espectros (625×700).

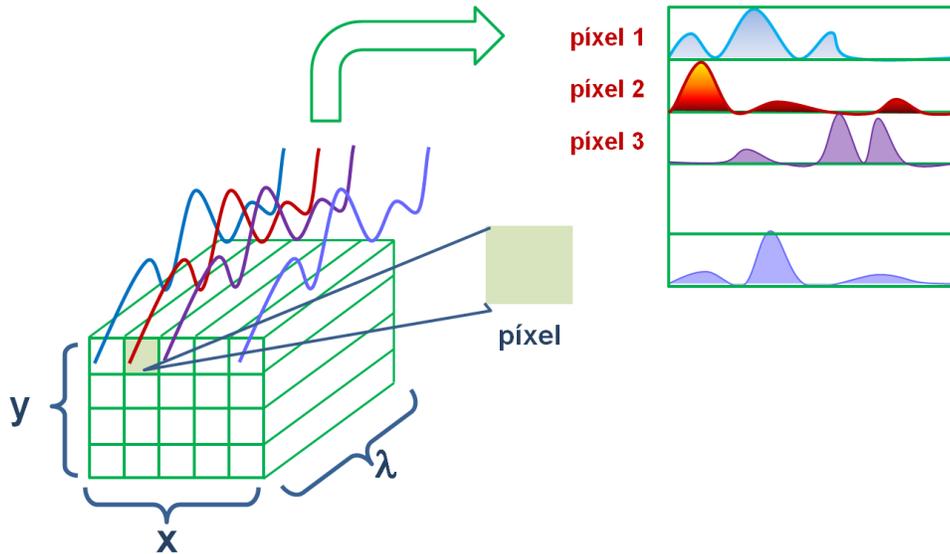


Figura 3.2: Processo de desdobramento de um cubo de dados.

3.2.2 Pré-processamento

Nesta fase, a matriz de dados é processada para eliminar dados interferentes que não contêm informação química ou são corrigidos alguns efeitos dependentes da técnica instrumental utilizada. Dentre esses tratamentos estão:

Remoção de sinal de fundo ou *background* e seleção de regiões de interesse

A grande maioria de técnicas espectroscópicas geram imagens que as vezes contêm informação não desejada. A remoção dessa informação pode ser feita com as seguintes estratégias:

- Seleção manual das regiões de interesse: esse procedimento requer um conhecimento adequado da natureza química da amostra e da área mapeada. A des-

vantagem principal do seu uso é o custo em tempo, principalmente quando existem grande quantidade de imagens ou quando a área de interesse é irregular.

- Uso de histogramas: áreas muito diferentes na imagem podem ser identificadas pelas mudanças bruscas do histograma (Frequência de distribuição de concentração nos pixels) e sua visualização é melhorada aplicando processamentos como segunda derivada.

Identificação e tratamento de *spikes*

Os *spikes* são definidos como um aumento e diminuição súbita do sinal gerando picos estreitos, que na maioria dos casos são facilmente distinguíveis no espectro. Dependendo da técnica, podem ser causados por um comportamento anormal do detector, imperfeições dos circuitos eletrônicos ou condições ambientais ou externas como por exemplo os chamados eventos de raios cósmicos em espectrômetros Raman que utilizam detectores CCD onde a alta sensibilidade e baixo ruído têm o custo da vulnerabilidade à presença de *spikes*.

As consequências claras destes sinais é a distorção das imagens, introdução de falsas variáveis em algoritmos como o MCR ou modelamentos e/ou calibrações anômalas. Embora em alguns casos seja possível remover *spikes* manualmente por substituição dos valores, essa tarefa é complexa e pouco prática. Vários algoritmos têm sido propostos, alguns deles baseados na comparação da intensidade do sinal de um determinado pixel, em um dado comprimento de onda, com seus vizinhos mais próximos [44–46], assim como outros procedimentos que utilizam a derivada do sinal [47].

Pré-processamento dos espectros

Em algumas técnicas espectroscópicas, é comum a influência de fenômenos provenientes de interações da luz ou de características intrínsecas à amostra como por exemplo espalhamento da luz, efeitos de tamanho de partícula ou rugosidade da amostra, dentre outras que podem ser corrigidos ou seu efeito minimizado com os métodos aplicados à espectroscopia clássica:

- Diminuição do ruído com algoritmos de suavizamento como *Savitzky-Golay*
- Correção de espalhamento: são úteis algoritmos como correção multiplicativa de espalhamento, MSC (*Multiplicative Scatter Correction*), variação normal padrão, SNV (*Standard Normal Variate*)
- Derivadas: As derivadas baseadas no algoritmo de *Savitzky-Golay* podem ser empregadas para reduzir efeitos como deslocamento ou inclinação da linha de base. No geral, este processamento enfatiza as características espectrais dos dados mas as vezes também pode aumentar o nível de ruído. Porém, isto pode ser controlado com a escolha cuidadosa dos parâmetros como ordem da derivada, ordem do polinômio e tamanho da janela.

Tratamento quimiométrico das imagens

Após o processamento e tratamento dos dados para eliminar informação interferente, a imagem pode ser finalmente tratada com algoritmos quimiométricos para extrair a informação requerida e para a construção e visualização das imagens. Diversos algoritmos que são usualmente aplicados em calibração ou resolução de curvas, podem ser empre-

gados na simplificação e análise de dados obtidos por espectroscopia de imagem [48]. Dentre eles estão os métodos de reconhecimento de padrões, regressão por mínimos quadrados parciais, PLS (*Partial Least Squares*), mínimos quadrados clássicos e métodos de resolução de curvas (MCR).

Capítulo 4

INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA, MORFOLOGIA DOS SUBSTRATOS SERS E AMBIENTE COMPUTACIONAL

4.1 Instrumentação analítica

Todos os espectros Raman que fazem parte da presente tese foram registrados empregando um equipamento *Perkin Elmer RamanStation 400F Series* com uma fonte laser de excitação emitindo na região do NIR (comprimento de onda: 785 nm, diâmetro de foco :100 μm de potência: 250 mW). A faixa espectral é de 200 a 3400 cm^{-1} e a resolução mínima de pico é de 2 cm^{-1} . O sistema ótico usa um espectrógrafo *Echelle*, filtros Rayleigh e detector CCD (1024 \times 256 pixels) que opera a -50 °C.

O espectrômetro está também equipado com um suporte que permite fixar cubetas, tubos

capilares e porta amostras para microscópio. O mecanismo móvel para aquisição de imagens, permite um deslocamento máximo XYZ de $120 \times 80 \times 10$ mm.

4.2 Substratos SERS

4.2.1 Ouro coloidal

Foram utilizados nanoestruturas de ouro em suspensão, sintetizadas segundo o procedimento modificado do método de Lee-Miesel [11] como descrito a seguir:

Síntese

Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- Ácido tetracloroáurico, HAuCl_4 (*SIGMA-ALDRICH*), 30 % em massa.
- Citrato de sódio, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, (*Synth*)
- Cloreto de sódio, NaCl (*Synth*)

Metodologia

Foi preparada uma solução misturando $36,0 \mu\text{L}$ de HAuCl_4 a 30% com ≈ 95 mL de água deionizada em um erlenmeyer, e colocada sob aquecimento gradual e agitação constante até ebulição. Após 5-7 min de ebulição, foram adicionados 3,0 mL de solução aquosa de citrato de sódio a 1% (m/m). Após a mudança de cor, de incolor para vermelho-vinho, o aquecimento e a agitação foram suspensos, e o volume foi completado a 100,00 mL em

balão volumétrico.

Otimização do colóide para a obtenção do efeito de amplificação

Adição de íons cloreto Cl^-

Como descrito na literatura [49], o efeito de amplificação por superfície é consideravelmente melhorado entre uma e três ordens de grandeza pela presença de íons brometo e/ou cloreto, que causam agregação das nanopartículas por efeito da carga elétrica, formando «sítios ativos», cuja ação tem sido explicada pela formação de superfícies estáveis rugosas em nanoescala sobre os aglomerados. A mudança de tamanho do sistema coloidal, em princípio, pode ser detectada visualmente pelo deslocamento da cor de vermelho ou vermelho-vinho para tons de roxo. Esse efeito visual indica também o deslocamento do plasmon de absorção do sistema, que pode ser monitorado mediante seu espectro na região do UV-Vis. Com base no fato de que a amplificação do sinal Raman é maior quanto mais próxima está o comprimento de onda do laser com o de máxima absorção do plasmon do material do substrato, o sistema coloidal empregado no presente estudo foi ativado com NaCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para deslocar seu comprimento de onda máximo de absorção do plasmon.

Para estabelecer o volume de solução de Cl^- , necessário para causar deslocamento do máximo de absorção do plasmon coloidal para a região do NIR (se aproximando ao comprimento de onda da fonte, 785 nm) mas mantendo a estabilidade da suspensão, foram adicionados volumes sucessivos de $100 \mu\text{L}$ em $25,0 \text{ mL}$ do colóide e registrado seu espectro UV-Vis após cada adição. Como apresentado na Fig.4.1, o colóide, sem

adição de NaCl, tem um máximo de absorção centrado em 522 nm, que com a interação com os íons Cl^- é deslocado até atingir um valor de 670 nm com 500 μL de solução de NaCl 0,10 mol L^{-1} .

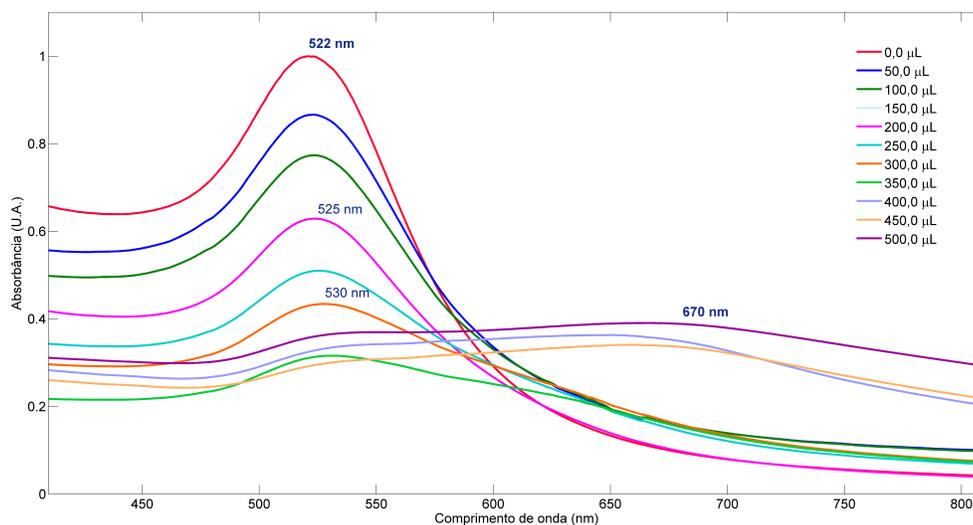


Figura 4.1: Espectros UV-Vis de ouro coloidal com adições sucessivas de 50 μL de NaCl 0,10 mol L^{-1} .

Relação de volume colóide:amostra

Um comportamento similar ao observado com a adição dos íons Cl^- , ocorre com o colóide em presença de outras espécies químicas. Por essa razão, os volumes de amostra e colóide devem ser otimizados, e dependem fortemente da natureza química do analito e da amostra e portanto é diferente para cada sistema. Nos sistemas estudados no presente caso, foram testadas relações entre os volumes de colóide e amostra sob as condições de cada análise mediante um procedimento simples onde foram adquiridos espectros SERS das diferentes misturas e comparada sua intensidade. De forma geral, em todos os casos foi observado um aumento na intensidade com o incremento

da concentração do analito até um dado valor onde os aglomerados não são estáveis em suspensão, começando a precipitar e diminuindo sua capacidade de amplificação. Para todos os casos onde foi utilizado ouro coloidal, a mistura amostra:coloide foi realizada em uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm.

Morfologia

A morfologia das nanopartículas foi avaliada pela técnica de microscopia de varredura eletrônica com emissão de campo FE-SEM (*Field Emission-Scanning Electron Microscopy*) usando um equipamento JEOL modelo JSM 6330F. Como apresentado na micrografia da Fig.4.2, as nanopartículas apresentaram alta homogeneidade e morfologia arredondada de diâmetro aproximado de 40 nm.

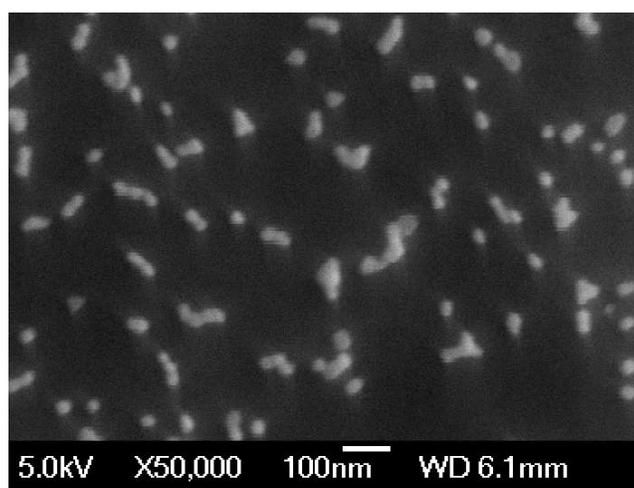


Figura 4.2: Micrografia de nanopartículas coloidais de ouro.

4.2.2 Ouro nanoestruturado sobre silício

Os substratos nanoestruturados Klarite[®] (adquiridos comercialmente), são arranjos de alta homogeneidade de pirâmides invertidas de $\approx 1,50 \mu\text{m}$ de lado, fabricadas por fotolitografia [50]. A área ativa para amplificação do sinal Raman é de $4 \times 4 \text{ mm}$ e está composta de nanoestruturas de $\approx 20 \text{ nm}$ como observado na micrografia da Fig.4.3.

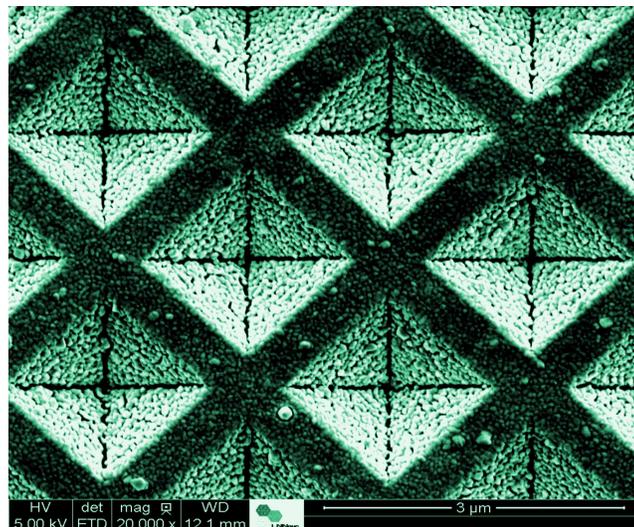


Figura 4.3: Micrografia de um substrato de ouro nanoestruturado sobre silício (Klarite[®]).

Uma fotografia ampliada de uma placa de ouro nanoestruturado é apresentada na Fig.4.4, onde pode se observar cinco volumes de amostra depositados sobre a área mais clara que corresponde a área ativa.

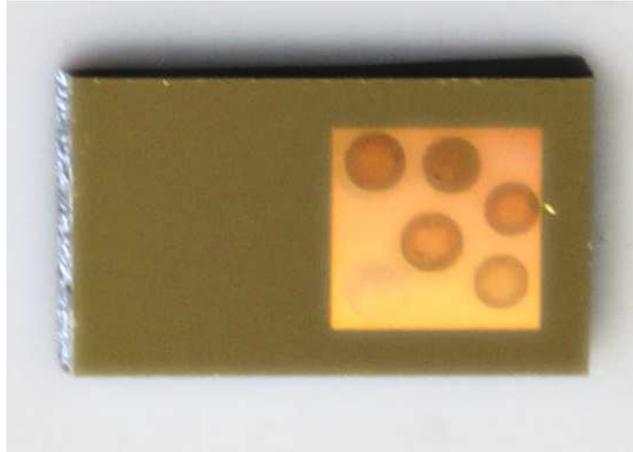


Figura 4.4: Fotografia de um substrato nanoestruturado após deposição de amostra.

4.3 Ambiente computacional

O processamento digital dos dados foi realizado completamente em ambiente Matlab Versão 7.8 (R2009a), sobre o qual foi executada a ferramenta MCR *Toolbox* desenvolvida por Tauler *et.al.* [51] que inclui os algoritmos SVD, EFA e SIMPLISMA.

Capítulo 5

Aplicação 1: DETERMINAÇÃO DE NICOTINA EM URINA EM PRESENÇA DO METABÓLITO COTININA E O ALCALÓIDE ANABASINA

5.1 Introdução

O alcalóide nicotina, estruturalmente caracterizado por possuir anéis piridina e pirrolidina, é encontrado em uma ampla variedade de plantas da família *Solanaceae*, sendo o tabaco sua principal fonte de exposição. A nicotina possui a capacidade de cruzar as membranas biológicas incluindo a barreira hemato-encefálica que protege o cérebro da entrada de substâncias que possam inibir sua função metabólica normal [52]. Os

efeitos predominantes e mais investigados em animais e humanos incluem incremento na pressão sanguínea e frequência cardíaca, assim como aumento dos ácidos graxos livres no plasma, dentre outros.

A absorção desse alcalóide é um processo cuja velocidade aumenta com o aumento do pH e as principais rotas de absorção são a mucosa oral e os alvéolos pulmonares. O metabolismo ocorre através de duas rotas conhecidas como fases I e II, sendo que de 70 a 80 % da nicotina é metabolizada em cotinina por oxidação (fase I) e tem sido identificada como metabólito urinário em humanos, coelhos e ratos [53,54].

Outros alcalóides como a nornicotina, anatabina e anabasina, estão presentes também no tabaco e possuem atividade farmacológica qualitativamente similar à da nicotina mas de menor potência. A anabasina e a anatabina estão ausentes em medicamentos contendo nicotina e produtos como parches transdérmicos e não são metabolicamente derivados da nicotina. Por esse motivo seu monitoramento é útil para estimar a exposição a produtos de tabaco durante terapias de substituição de nicotina.

A conexão entre o uso do tabaco e a saúde é bastante conhecida e tem motivado o desenvolvimento de diversos métodos para sua determinação em fluidos biológicos, usualmente, sangue, plasma e urina. Se comparada com sangue ou plasma, a matriz urina é especialmente atrativa por concentrar altos níveis do alcalóide e permite a detecção de compostos relacionados como a anabasina. Uma grande variedade de métodos para o isolamento, detecção e quantificação da nicotina estão disponíveis, sendo a cromatografia um dos mais comuns [55,56]. Porém, a complexidade inerente a matrizes como os fluidos biológicos, gera a necessidade de múltiplos procedimentos experimentais que incluem

separações físicas e/ou extração com solventes, dentre outros, exigindo um alto consumo de tempo e reagentes, aumentando o custo das análises e tornando mais provável a perda de analito.

O emprego da espectroscopia SERS assistida por quimiometria é uma alternativa interessante ao combinar grandes quantidades de informação e possibilidade de atingir baixos limites de detecção, com a capacidade das ferramentas quimiométricas para lidar com respostas provenientes de múltiplos constituintes, minimizando a complexidade e o número de procedimentos experimentais.

5.2 Metodologia

5.2.1 Reagentes e soluções

O ácido cloroáurico (HAuCl_4), a cotinina e a anabasina foram adquiridos da *Sigma Aldrich*. A (-)-nicotina (99 % de pureza) foi adquirida da Fluka. Outros reagentes como citrato de sódio anidro e cloreto de sódio (NaCl) foram obtidos da *Synth*. Foi usada água *Milli-Q* para o preparo de todas as soluções.

5.2.2 Amostras e padrões

As amostras de urina foram coletadas de três doadores não-fumantes. A coleta das amostras foi feita da primeira urina da manhã, filtradas através de filtros Millex de $0,22 \mu\text{m}$ e armazenadas a $\approx 5,0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4-5 h até a análise. As soluções estoque de nicotina, cotinina e anabasina foram preparadas em concentrações de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As triplicatas

das soluções contendo urina e o(s) analito(s), foram preparadas com urina a 10,0 %(v/v), e as concentrações foram ajustadas segundo os níveis esperados em pessoas fumantes mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Valores de referência de nicotina, anabasina e cotinina em urina de pessoas fumantes.

	Urina		Urina a 10 %(v/v)	
	Min	Max	Min	Max
Nicotina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,0	5,0	0,10	0,50
Cotinina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,0	10,0	0,10	1,00
Anabasina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,01	0,50	0,001	0,05

As soluções resultantes da Tabela 5.2, mostram as concentrações de nicotina estudadas, em presença e ausência de cotinina e anabasina. Cada solução foi rotulada segundo seu conteúdo, por exemplo: N, para nicotina, C para cotinina e A para anabasina. Para a construção das curvas analíticas de adição de padrão foram adicionados quatro incrementos constantes de nicotina $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 5.2. Soluções de nicotina em presença e ausência de cotinina e anabasina.

Solução/curva	Nicotina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cotinina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Anabasina($\mu\text{g mL}^{-1}$)
N	0,10	0,00	0,00
NC ₁	0,10	1,00	0,00
NC ₂	0,20	1,00	0,00
NC ₃	0,30	1,00	0,00
NCA ₁	0,10	1,00	0,05
NCA ₂	0,20	1,00	0,05
NCA ₃	0,30	1,00	0,05

5.2.3 Aquisição espectral e tratamento quimiométrico

Cada espectro foi coletado com 12 exposições de 8 segundos, e 250 mW de potência do laser na faixa de número de onda de 200 a 3276 cm^{-1} e resolução de 4 cm^{-1} . Para a amplificação do sinal foi utilizado ouro coloidal, sintetizado como explicado na seção 4.2.1 e empregando uma proporção colóide:amostra de 5:1, misturados em cubetas de quartzo de 1,00 mL.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Espectros SERS da nicotina, cotinina e anabasina

As estruturas moleculares da nicotina, cotinina e anabasina são apresentadas na Fig.5.1.

Os três compostos são ativos em SERS e seus espectros apresentam duas bandas principais centradas em 1032 e 1052 cm^{-1} , que têm sido reportadas como a vibração simétrica e a deformação trigonal do sistema piridínico, respectivamente [57]. Como a nicotina e seus dois compostos relacionados possuem um núcleo estrutural comum, sua resposta espectral é de alta similaridade como mostrado na Fig.5.2. Apesar que níveis de nicotina da ordem de 0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são ainda detectáveis em solução aquosa, a intensidade na sua resposta é visivelmente afetada em presença de uma matriz complexa como a urina, devido ao já mencionado efeito de aglomeração ativado pelas espécies carregadas eletricamente presentes no meio.

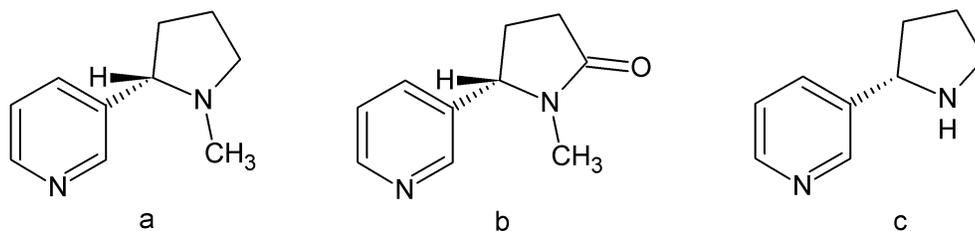


Figura 5.1: Estruturas moleculares de (a) nicotina, (b) cotinina e (c) anabasina.

No caso da urina, há uma alta probabilidade dessas cargas estarem presentes, considerando sua composição natural que inclui sais, açúcares, proteínas, hormônios, dentre outros. Após vários testes com diversas diluições de urina, foi estabelecida uma diluição a 10%(v/v) em água com a qual o pouco efeito de aglomeração observado não afetou a estabilidade das partículas coloidais, permitindo ainda determinar a nicotina nos níveis desejados.

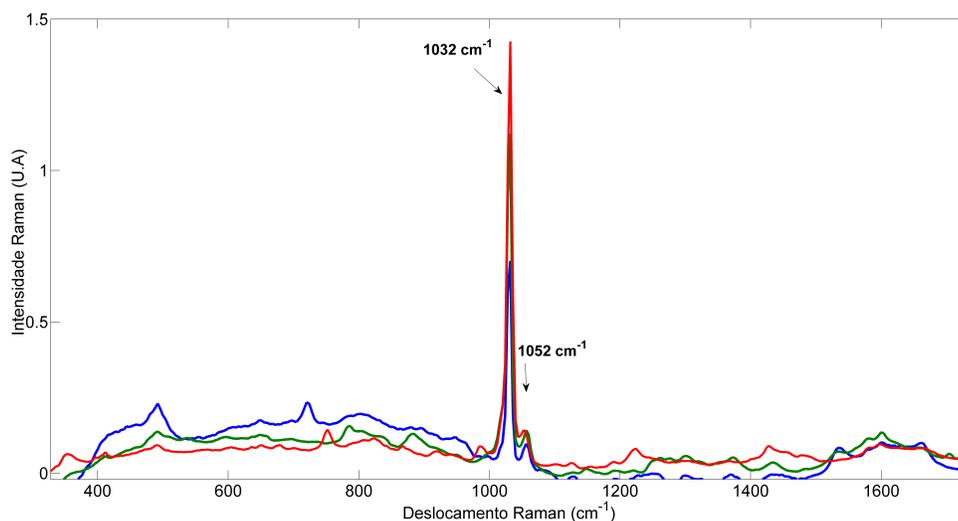


Figura 5.2: Espectros SERS de nicotina (vermelho), cotinina (verde) e anabasina (azul), em solução aquosa.

5.3.2 Quantificação de nicotina

A necessidade da utilização da adição de padrão

Para avaliar a necessidade do emprego do método de adição de padrão, foi considerado como referência o pico centrado em 1032 cm^{-1} , que é o de maior intensidade para a nicotina. Uma primeira aproximação qualitativa pode ser observada na Fig.5.3, onde para uma única concentração de nicotina, a intensidade dessa banda é notavelmente diminuída na presença de urina a 10%(v/v). Para as soluções de 0,30, 0,20 e 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foi calculada a perda de intensidade aproximada, resultando em valores de 93,1, 84,0 e 94,0 % respectivamente, confirmando a significância do efeito de matriz na determinação e fazendo necessária sua correção.

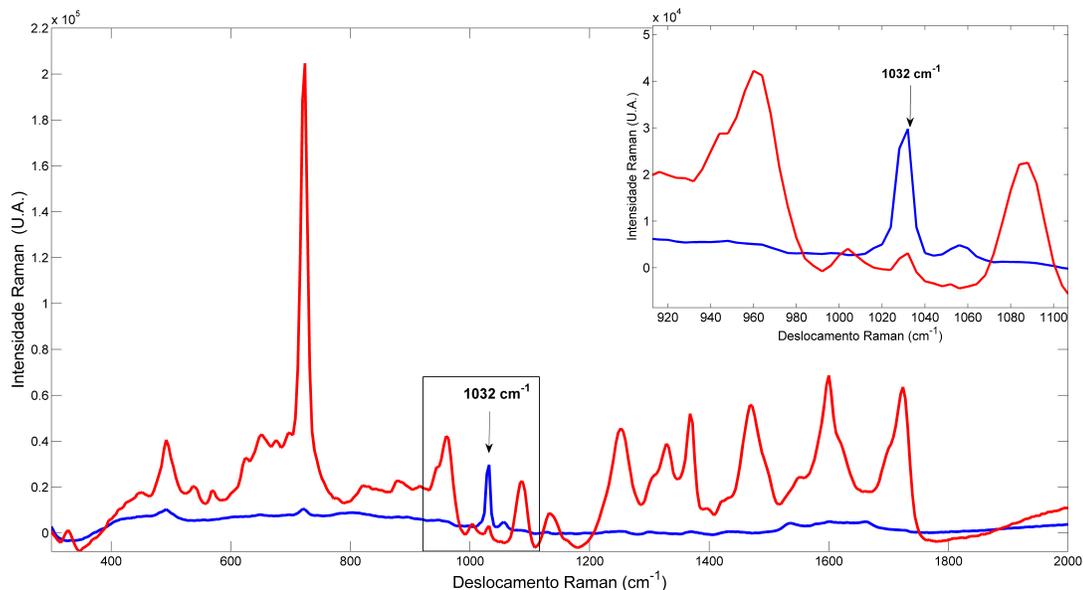


Figura 5.3: Espectros SERS de nicotina $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em solução aquosa (azul) e em urina (vermelho).

Método MCR-ALS

Os espectros das amostras com as diferentes adições do padrão, foram organizados em matrizes **D**, mantendo o primeiro vetor como sendo a amostra sem adição do padrão. Foi aplicado o algoritmo SVD para estabelecer o posto químico que mostrou três contribuintes à resposta:

- Nicotina
- Urina
 - com cotinina e anabasina
 - com cotinina

- sem cotinina e/ou anabasina
- Colóide

Embora alguns testes foram feitos empregando os três componentes, para o objetivo do nosso trabalho, o interesse principal é isolar a resposta do analito e portanto não é necessária a resolução de todos os fatores separadamente. Assim, foram empregados dois espectros como estimativa inicial que, dependendo do caso são:

- Resposta da nicotina
- Resposta das interferências não calibradas:
 - Urina a 10 % e colóide
 - Urina a 10 % com cotinina e colóide
 - Urina a 10 % com cotinina, anabasina e colóide

Com esses dois espectros, foram obtidos os resultados mais relacionados com o sistema químico, assim como um alto ajuste com os espectros otimizados pelo MCR. A comparação entre a estimativa inicial e as respostas otimizada, é apresentada na Fig.5.4. A resolução foi restrita para não negatividade em espectros e concentrações.

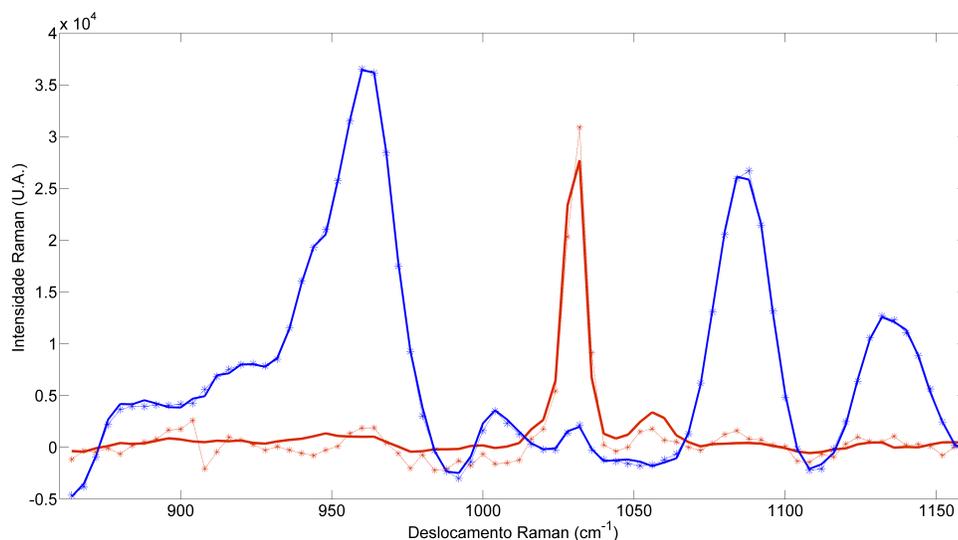


Figura 5.4: Espectros SERS utilizados como estimativa inicial (linha sólida) e otimizados pelo MCR (linha pontilhada) de nicotina (vermelho) e urina a 10% (azul).

Como detalhado na seção metodologia, foram analisados três valores de concentração (0,30, 0,20 e 0,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), dentro dos limites esperados em pessoas fumantes e em presença de cotinina mantida em um valor constante de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, simulando o máximo valor esperado em urina. Alguns testes preliminares foram realizados utilizando a faixa espectral completa, mas as determinações apresentaram baixa precisão pela inclusão de regiões sem bandas SERS definidas e com presença de ruído. A faixa escolhida finalmente foi entre 864 e 1160 cm^{-1} . Como esperado em espectros Raman de amostras biológicas, foi observado ainda na matriz diluída o fenômeno de fluorescência que causou deslocamento da linha de base e que foi corrigida com o algoritmo WLS (*Weighted Least Squares*). Com as matrizes obtidas em **C** foram construídas as curvas analíticas pseudo-univariadas e determinadas as concentrações da nicotina.

Figuras de mérito

Como já tem sido proposto em aplicações anteriores que utilizam adição de padrão e MCR [35, 37], alguns parâmetros para avaliar a qualidade das determinações foram calculados. Adicionalmente, a linearidade das curvas foi avaliada mediante análises ANOVA e testes de significância da falta de ajuste ao comportamento linear, LOF (*Lack-of-fit*) a partir da variância residual e o erro puro [58].

Em todos os casos, os valores de F_{LOF} foram menores do que o valor crítico tabelado F_c , indicando que não existe uma falta de ajuste linear significativa em quaisquer caso. Foi também observado que com o aumento da concentração de nicotina, houve um incremento dos valores de limite de detecção LD e LQ, comportamento que provavelmente está relacionado com o processo de adsorção entre o analito e o metal mencionado antes. Os resultados são apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Figuras de mérito para a determinação de nicotina em presença de cotinina.

Curva	$F_{LOF}(F_C)$	LD($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$E_R(\%)^a$
NC₁	0,8970 (4,103)	0,0043	0,013	5,08
NC₂	3,060 (4,103)	0,0068	0,021	6,75
NC₃	2,974 (4,876)	0,032	0,096	8,30
N	1,370 (4,103)	0,0091	0,0023	8,05

a. Erro relativo

Como observado, os valores F_{LOF} foram para todos os casos menores que os valores tabelados (F_{crit}), indicando que não houve falta de ajuste significativa ao comportamento linear em quaisquer caso.

Houve um acréscimo nos valores de LD e LQ com o incremento das concentrações de nicotina, que está provavelmente associado com processos de agregação causados pelo analito e as diversas espécies presentes na matriz. Essa agregação aumentaria então com o aumento da concentração do analito diminuindo a eficiência do efeito de amplificação e em consequência aumentando os valores de LD.

Uma característica do sistema sob estudo que vale a pena salientar é a influência da acidez do meio na intensidade do sinal. Esse comportamento está associado diretamente com as propriedades ácido-base do alcalóide, cujos valores de pK_b correspondem a 6,19 e 10,96 [59], entre os quais existem as espécies mostradas na Fig.5.6. Essa condição de acidez é naturalmente atingida pela mistura colóide-amostra, uma vez que o procedimento de síntese que inclui citrato de sódio ajuda na diminuição do pH até $\approx 3,50$, que mesmo na mistura com amostra não varia significativamente, devido aos volumes empregados (Relação colóide:amostra 5:1). Por comparação visual da Fig.5.5 é possível

verificar que em valores de pH menores do que $\approx 6,0$, a intensidade do sinal SERS é maior.

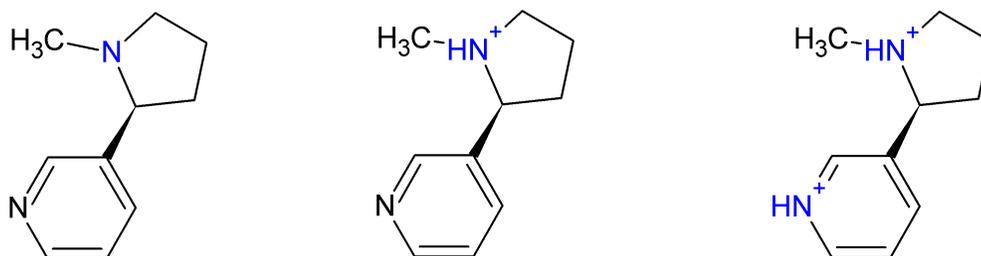


Figura 5.5: Formas não protonada (esquerda), monoprotonada (centro) e diprotonada (direita) da nicotina.

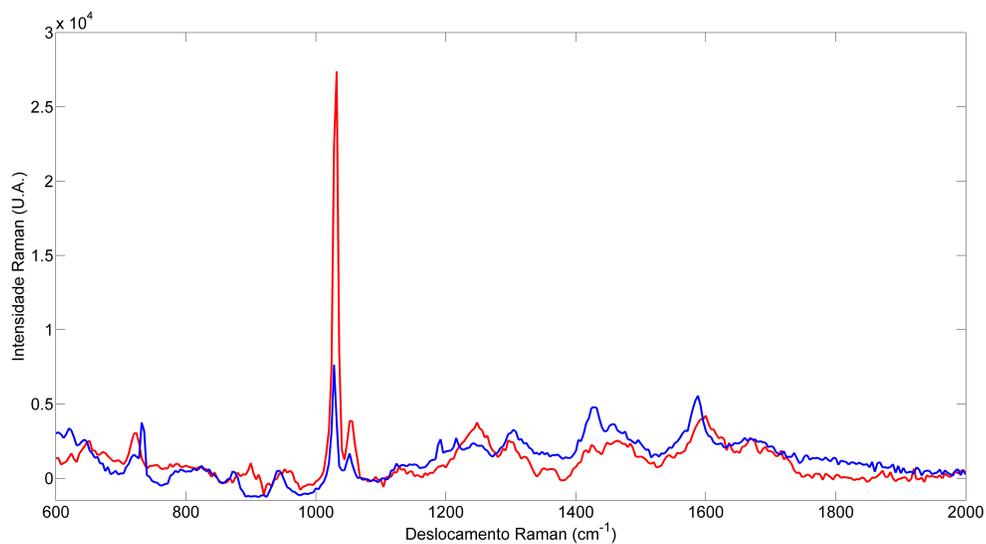


Figura 5.6: Espectros SERS de nicotina em urina a 10% em pH = 4,90 (vermelho) e pH = 9,10 (azul).

Apesar da anabasina ser um alcalóide de menor concentração do tabaco, ele foi incluído no estudo devido ao seu emprego como biomarcador em estudos de monitoramento de exposição ao tabaco. Foi observado que a inclusão do biomarcador anabasina causou um

incremento do erro total de previsão (aumentou para 15,3 %) para a menor concentração de nicotina estudada. Como apresentado na Tabela 5.4, para as outras figuras de mérito não foram encontradas tendências claras associadas à inclusão de um novo interferente.

Tabela 5.4. Figuras de mérito para a determinação de nicotina em presença de cotinina e anabasina.

Curva	$F_{LOF}(F_C)$	LD($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$E_R^a(\%)$
NCA₁	3,082 (4,103)	0,051	0,088	15,3
NCA₂	3,754 (4,103)	0,022	0,066	4,41
NCA₃	0,1702 (4,103)	0,042	0,12	5,10
N	1,370 (4,103)	0,0091	0,0023	8,05

a. Erro relativo

MCR com restrição por correlação

A restrição por correlação proposta para sistemas similares ao estudado aqui [24, 27], foi aplicada construindo as matrizes como descrito a seguir:

- **Dt**($r_1 \times c_1$), contendo os espectros das adições padrão mantidas no *background* da amostra (Por subtração digital, como explicado na seção 2.1.3).
- **Ds**($r_2 \times c_2$), contendo os espectros das amostras.

A curva analítica foi depois construída com os valores em **C** em função dos valores conhecidos de cada adição, gerando assim uma curva como as das Fig. 5.7-5.9.

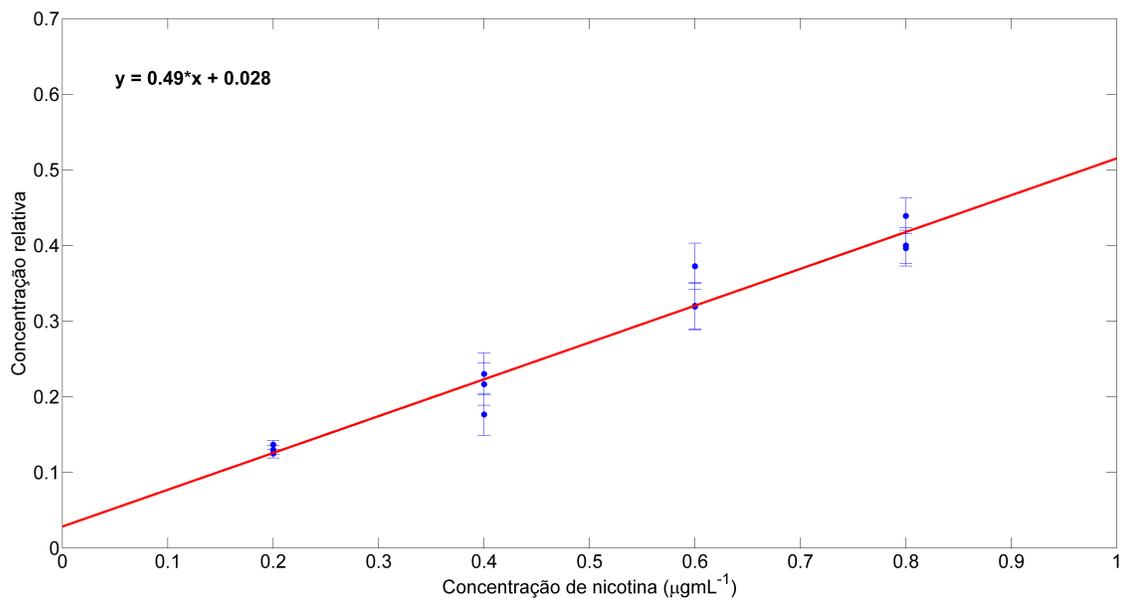


Figura 5.7: Curva analítica pseudo-univariada para a determinação de Nicotina a $0,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ empregando MCR restrito por correlação.

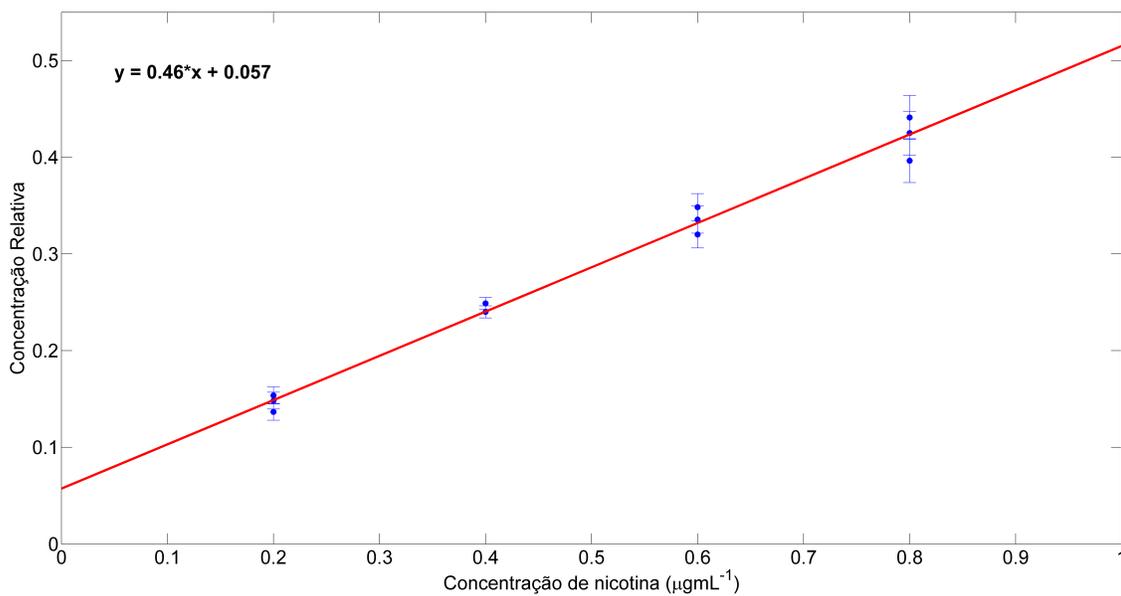


Figura 5.8: Curva analítica pseudo-univariada para a determinação de Nicotina a $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ empregando MCR restrito por correlação.

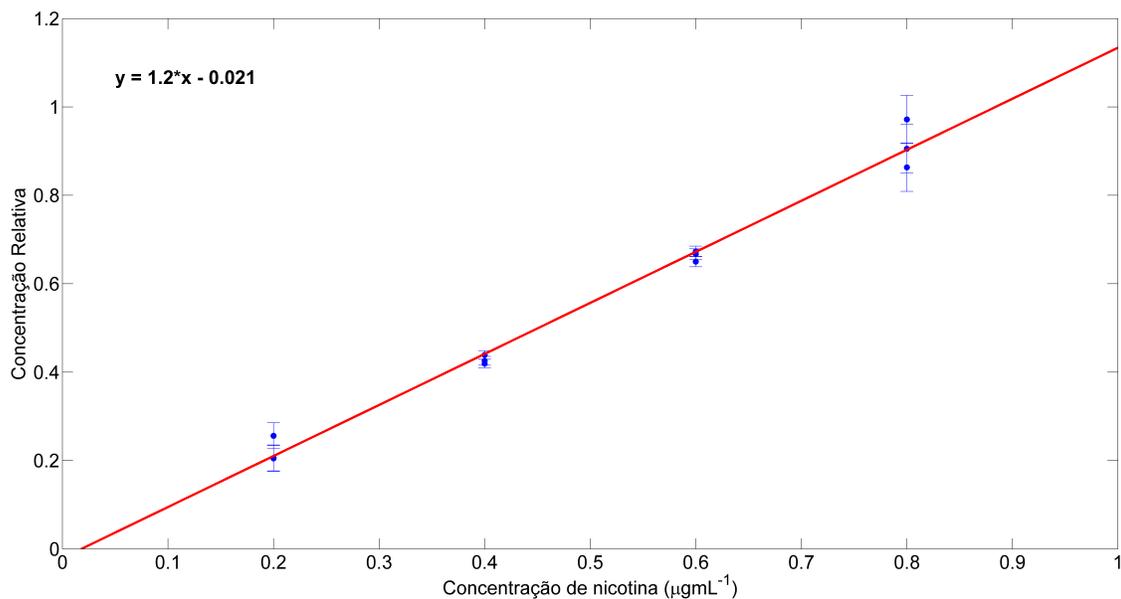


Figura 5.9: Curva analítica pseudo-univariada para a determinação de Nicotina a $0,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ empregando MCR restrito por correlação.

Com essa restrição, para o caso onde tanto a cotinina quanto a anabasina estão presentes no meio, houve uma diminuição da qualidade das determinações. Já no caso onde está presente unicamente a cotinina, foi observada uma diminuição do erro relativo para a nicotina a $0,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (de 8,30 % para 4,21 %), no caso da nicotina a $0,20 \mu\text{g mL}^{-1}$ não houve diferenças significativas e para a menor concentração houve aumento no erro devido a que neste caso, a relação sinal/ruído foi menor e ainda diminuiu com o procedimento digital de subtração. Os resultados são mostrados na Tabela 5.5, onde o subscrito «rc» significa restrito por correlação.

Tabela 5.5. Figuras de mérito para a determinação de nicotina em presença de cotinina com MCR-ALS restrito por correlação

Curva	$F_{LOF}(F_C)$	LD($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$E_R^a(\%)$
NCrc₁	1,502 (4,459)	0,044	0,13	10,1
NCrc₂	0,2115 (4,737)	0,024	0,072	8,11
NCrc₃	0,7450 (4,459)	0,055	0,17	4,21

a. Erro relativo

5.4 Conclusões

O método MCR-ALS aplicado em combinação com a adição de padrão, demonstrou ser uma estratégia apropriada para eliminar o efeito de matriz e quantificar a nicotina em urina em presença de interferências não calibradas. É interessante mencionar que essa determinação foi possível unicamente atingindo a vantagem de segunda-ordem que permitiu manipular a alta variabilidade da urina entre indivíduos e a sobreposição das respostas de cotinina, anabasina e nicotina.

Não foi necessário preparo de amostra complexo, o qual minimizou a perda de analito, e diminuiu o consumo de tempo das análises SERS, se comparado com outros métodos comumente usados. Problemas comuns associados ao trabalho com SERS como a agregação das nanopartículas causada pelas espécies iônicas presentes, são controláveis com procedimentos simples como diluição ou filtração. Dessa forma, as mais importantes desvantagens da SERS como técnica quantitativa podem ser superadas com a escolha adequada de ferramentas quimiométricas, expandindo sua versatilidade.

Capítulo 6

Aplicação 2: ESTUDO DA DISTRIBUIÇÃO DO FÁRMACO PARACETAMOL EM FILMES POLIMÉRICOS EMPREGANDO IMAGEM SERS

6.1 Introdução

Dentro da área farmacéutica, é de grande interesse a otimização de misturas poliméricas para o transporte de fármacos e sua liberação controlada em partes específicas do organismo como o trato gastrointestinal, pulmões, pele, tumores e vasos sanguíneos. As

combinações poliméricas como alternativa a outros mecanismos de transporte de fármacos, oferecem uma melhor eficiência, menor toxicidade, menor incidência de efeitos colaterais, e principalmente permitem o ajuste das propriedades para a liberação do fármaco com controle temporário ou de distribuição [60].

No controle temporário, o fármaco é liberado em um tempo prolongado e é útil na administração de substâncias que são rapidamente metabolizadas e eliminadas do organismo. Este sistema busca que as velocidades de liberação e eliminação sejam similares, garantindo que a concentração do fármaco seja mantida no organismo na faixa terapêutica durante várias horas. De outro lado, no controle de distribuição, o objetivo é transportar o fármaco até o local preciso no organismo, o qual minimiza notavelmente efeitos colaterais da droga em outros tecidos ou regiões do corpo ou em outros casos garante o transporte de moléculas que não conseguem atravessar alguns sistemas celulares.

Uma grande quantidade de biomateriais estão disponíveis para a preparação de filmes poliméricos e é sua natureza físico-química e composição percentual que definem o tipo de mecanismo de liberação controlada de um dado filme [61]. O emprego de polímeros como biomateriais no transporte de fármacos foi proposto como alternativa a outros sistemas que formam dispersões sólidas cristalinas cuja estabilidade diminui a rapidez da liberação do princípio ativo da formulação [62]. Pelo contrário, os sistemas poliméricos oferecem uma estrutura amorfa onde tanto o carregador quanto o fármaco são idealmente miscíveis e solúveis. Além disso, nesses sistemas, há redução do tamanho do fármaco até um nível quase molecular que permite sua solubilização no polímero carregador até a sobresaturação.

Dentre esses biomateriais, são comumente usados carregadores solúveis ou miscíveis em água como o polietilenoglicol, PEG (*Polyethyleneglycol*), polivinilpirrolidona, PVP (*Polyvinylpyrrolidone*) ou materiais de baixo peso molecular como alguns açúcares. O PEG é uma substância hidrofílica estável, que tem efeito na solubilidade e plasticidade das misturas poliméricas [63]; a PVP é amplamente usada devido a sua biocompatibilidade, estabilidade química e alta solubilidade em água além da sua função como ligante e modificador de viscosidade. De outro lado, são comuns os éteres de celulose como o HPMC (*Hydroxypropylmethylcellulose*) que, além de ser solúvel em água, é biocompatível, melhora a capacidade de retenção de água, o comportamento pseudoplástico e complexação dos filmes e permite controlar a velocidade de liberação da droga. As estruturas moleculares desses biomateriais são mostradas nas Figs. 6.1 - 6.3.

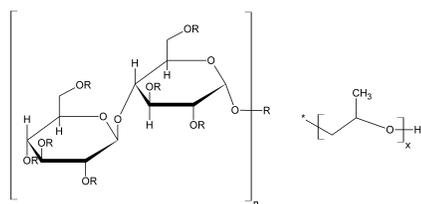


Figura 6.1: Estrutura molecular do HPMC



Figura 6.2: Estrutura molecular da PVP

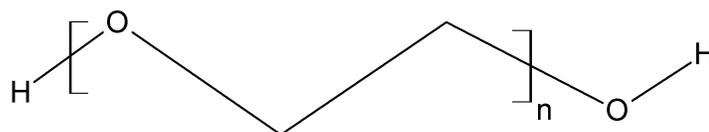


Figura 6.3: Estrutura molecular do PEG

Dois métodos simples podem ser aplicados na preparação das misturas ou filmes poliméricos:

- Método da fusão: O fármaco é submetido a fusão junto com o carregador, seguido de esfriamento. A principal e óbvia limitação é a possibilidade do fármaco ser degradado ou da miscibilidade não ser atingida.
- Método de evaporação de solvente: O fármaco e os polímeros são suspensos ou solubilizados em um solvente que é depois evaporado empregando procedimentos como corrente de nitrogênio, fluídos supercríticos ou aquecimento prolongado em temperaturas baixas. A principal vantagem é que preserva as propriedades dos componentes.

Um dos fármacos cujo estudo é interessante e que é amplamente utilizado como analgésico e antipirético é o paracetamol cuja estrutura é apresentada na Fig.6.4. Seu espectro Raman, rico em informação já tem sido utilizado para estudar tanto seu polimorfismo quanto sua distribuição em formulações farmacéuticas empregando imagem hiperespectral [64].

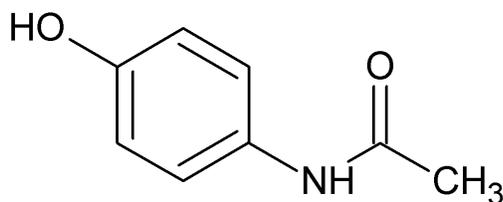


Figura 6.4: Estrutura molecular do paracetamol

Um estudo de imagem de filmes poliméricos com paracetamol como princípio ativo utilizando espectroscopia no infravermelho próximo mostrou também a utilidade do algo-

ritmo MCR-ALS na resolução de imagens para análises de distribuição em superfícies [65]. No entanto, embora um estudo do comportamento de adsorção do paracetamol utilizando SERS já tenha sido reportado [66], sua distribuição em superfícies ou filmes mediante esta técnica, ainda não tem sido publicada na literatura.

6.2 Metodologia

6.2.1 Preparação de filmes poliméricos

Foram preparados 5 filmes com formulações diferentes de paracetamol (*Synth*, Brasil), PEG-400 (*Synth*, Brasil), HPMC (*Sigma Aldrich*) e PVP (*Vetec*, Brasil), como descrito na Tabela 6.1.

Tabela 6.1. Composição dos filmes poliméricos

Filme	Composição percentual(%)			
	HPMC	PVP	PEG	PAR*
1	34,40	24,60	25,30	18,62
2	27,04	26,63	22,32	31,60
3	38,70	31,70	21,31	9,04
4	36,18	48,48	10,20	5,42

*% de paracetamol em (HPMC + PVP + PEG)=100%

O procedimento aplicado e o planejamento experimental utilizados foram propostos por Alexandrino e Poppi [65], e está descrito a seguir:

As quantidades correspondentes de cada polímero e do paracetamol foram dissolvidas em 5,0 mL de água deionizada com agitação vigorosa durante \approx 15 min. Após completa dissolução, foram depositados 10,0 μ L da formulação sobre uma placa nanoestruturada de ouro (*Klarite*) e submetidos a secagem em estufa a 60 °C durante 2 h para a formação dos filmes.

6.2.2 Aquisição de imagens SERS

As imagens químicas foram adquiridas realizando mapeamento por pontos de uma área de 3,8 \times 3,8 mm registrando um total de 400 espectros adquiridos com 6 exposições de 8 s. Foram também registrados os espectros SERS de cada componente por separado sob as mesmas condições do filme.

6.2.3 Tratamento quimiométrico

O cubo de dados espectrais foi desdobrado colocando os espectros nas linhas da matriz formada. Os espectros foram reduzidos para a faixa espectral entre 200 e 1680 cm^{-1} e para cada filme foi obtida uma matriz de 400 espectros e 371 variáveis. Os espectros de cada componente utilizados para inicializar o MCR foram estimados mediante o algoritmo SIMPLISMA. Para a resolução de curvas foi utilizada matriz aumentada e aplicada a restrição de não-negatividade nos escores. O algoritmo teve como restrição que o resultado da soma dos escores dos quatro componentes geradas em **C** fosse igual a um (1), sendo que esse valor corresponde ao 100 % da composição. Os mapas de concentração foram construídos por reordenamento dos valores obtidos em **C**.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Características SERS dos componentes dos filmes

Algumas características dos espectros SERS da PVP já foram reportadas [67], enquanto para o PEG e HPMC ainda não estão publicadas suas caracterizações sob esta técnica. Porém, é possível fazer algumas associações com suas respectivas respostas Raman e identificar as principais bandas [68–71]. Como mostrado nas Fig.6.5 e 6.6, uma grande parte do comportamento espectral é mantida em SERS para o paracetamol e o PEG, enquanto no caso do HPMC há uma perda de informação na região entre 1300 e 1500 cm^{-1} e para a PVP uma considerável quantidade de informação é perdida acima de 1000 cm^{-1} .

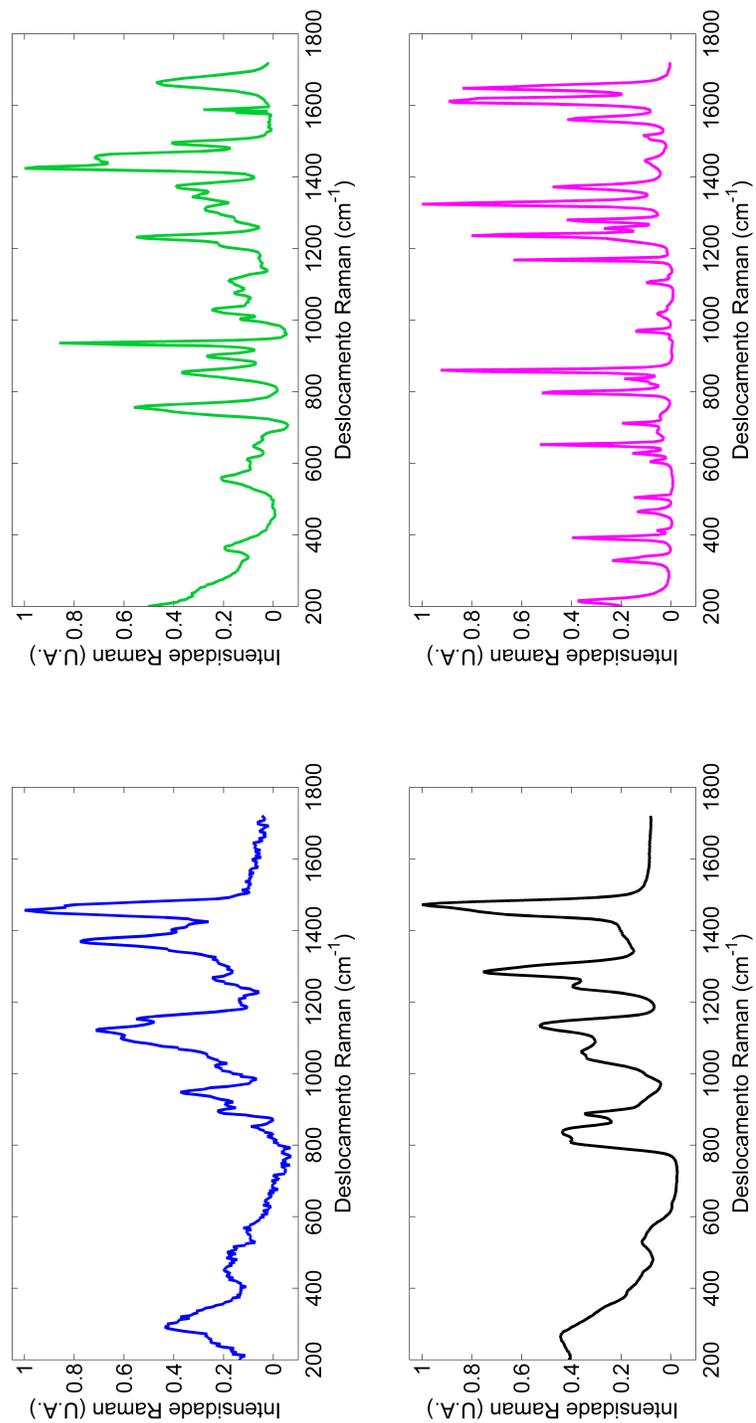


Figura 6.5: Espectros Raman (normalizados) das formas sólidas de HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta).

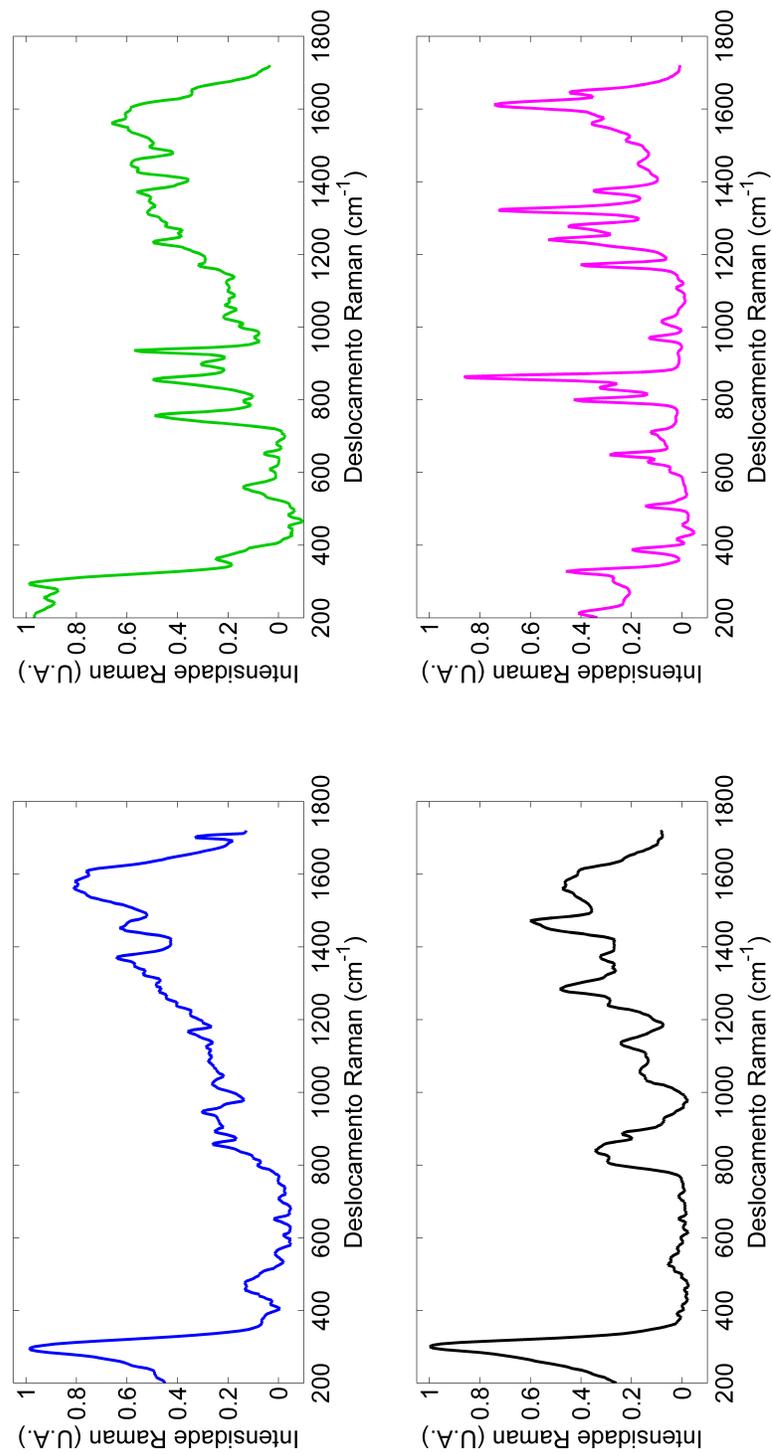


Figura 6.6: Espectros SERS (normalizados) de soluções aquosas de HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta), depositadas sobre ouro nanoestruturado.

O HPMC exibe suas principais bandas Raman na região entre 930 e 1500 cm^{-1} , correspondentes a vibrações das ligações HCC-, HCO- e HCH, porém, seu espectro SERS perde notavelmente resolução e os picos identificáveis com maior clareza, permanecem na região entre 1300 e 1500 cm^{-1} . O espectro SERS da PVP mostra vibrações associadas às ligações do anel como N-C=O (552 cm^{-1}), -C-C- (860 cm^{-1}) e a vibração do sistema aromático centrada em 890 cm^{-1} . Outras bandas do espectro Raman localizadas acima de 1200 cm^{-1} não são observáveis em SERS.

Tanto o espectro Raman quanto o SERS para o PEG são de alta similaridade, com picos característicos em 1140, 1227 e 1288 cm^{-1} correspondentes às vibrações de torção da ligação -C-O, e da ligação -C-C-.

Já na resposta do paracetamol, a maioria das bandas são mantidas em SERS, dentre elas, a informação das ligações -C-C do anel (1456 cm^{-1}), -C-N (1270 cm^{-1}), C₆H₅-N(1240 cm^{-1}) e deformação fora do plano do sistema aromático (800 cm^{-1}).

Já que o filme foi preparado sobre as áreas ativa e não ativa do substrato SERS, é importante avaliar qualitativamente a diferença nas respostas sobre a superfície de ouro nanoestruturada e a superfície de ouro não ativa para garantir que os espectros adquiridos correspondem à amplificação do sinal pelas nanoestruturas. Essa comparação pode ser observada na Fig.6.7 onde é clara a presença e ausência de amplificação.

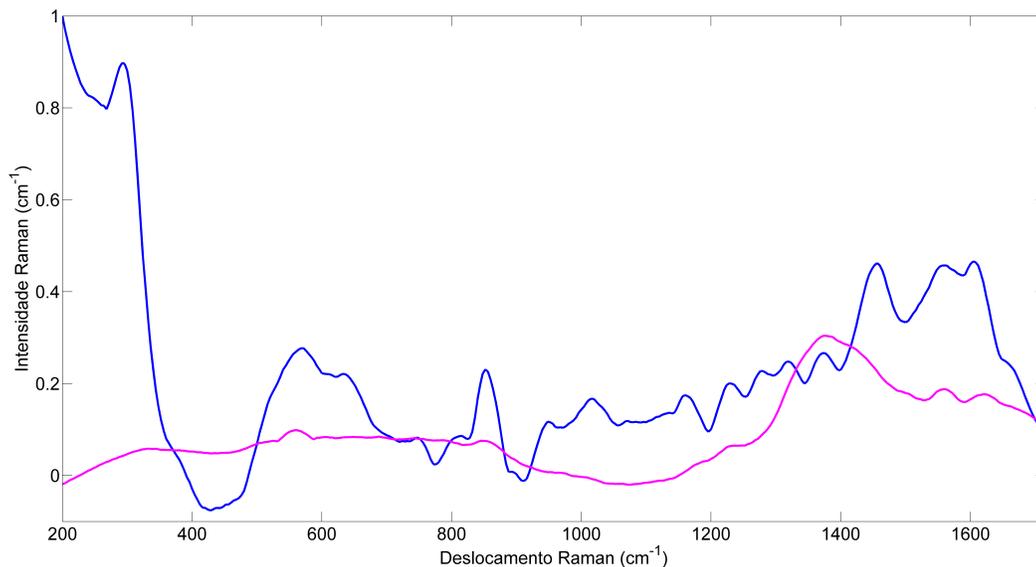


Figura 6.7: Espectros (normalizados) de um filme polimérico depositado sobre área ativa SERS (azul) e sobre área não ativa (magenta) de uma superfície de ouro nanoestruturado.

6.3.2 Cálculo da estimativa inicial e otimização de espectros

Quando é aplicado o método MCR, é necessária uma matriz de espectros para iniciar a resolução de curvas. No caso dos filmes poliméricos, duas opções podem a princípio serem aplicadas:

- Adquirir os espectros de cada componente por separado, sob as mesmas condições do preparo dos filmes, ou
- Estimar os componentes empregando um algoritmo adequado (como o SIMPLISMA).

Porém, a aquisição dos espectros separadamente, não considera a interação dos componentes na resposta espectral total e o cálculo das concentrações perde exatidão. No

presente caso, a estimativa inicial foi calculada aplicando o algoritmo SIMPLISMA para obter os espectros da Fig.6.8, a partir dos dados originais apresentados na Fig.6.9.

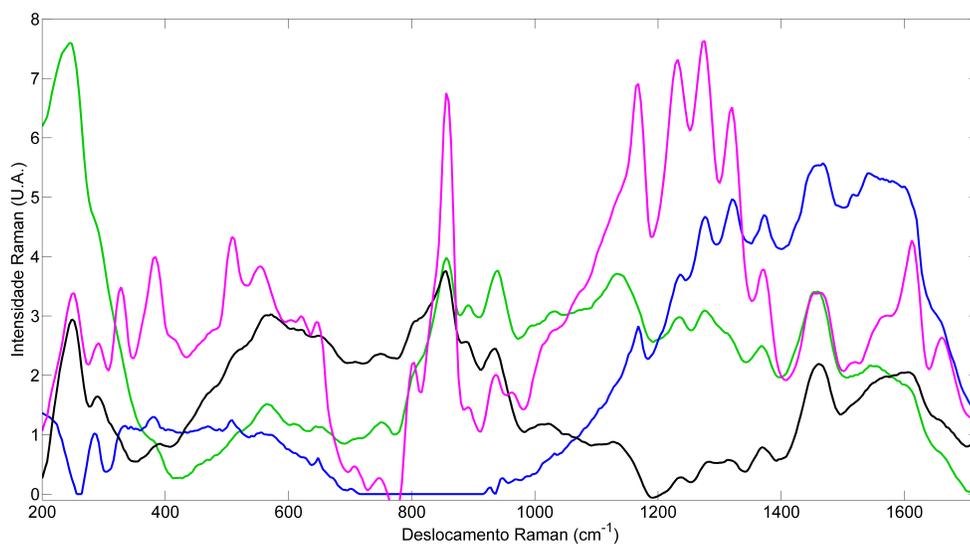


Figura 6.8: Espectros da estimativa inicial calculados com SIMPLISMA, correspondentes a HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta).

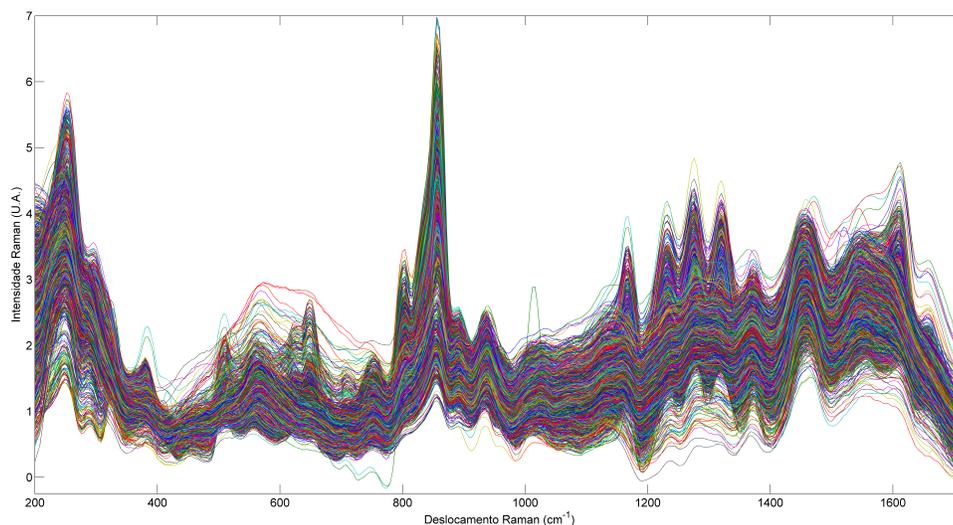


Figura 6.9: Espectros SERS originais de um filme polimérico contendo HPMC, PVP, PEG e paracetamol.

Quando utilizados como estimativa inicial os espectros adquiridos separadamente, da Fig.6.10, não foram obtidos resultados satisfatórios, uma vez que as respostas SERS individuais podem mudar na presença dos outros componentes afetando como consequência a precisão na quantificação.

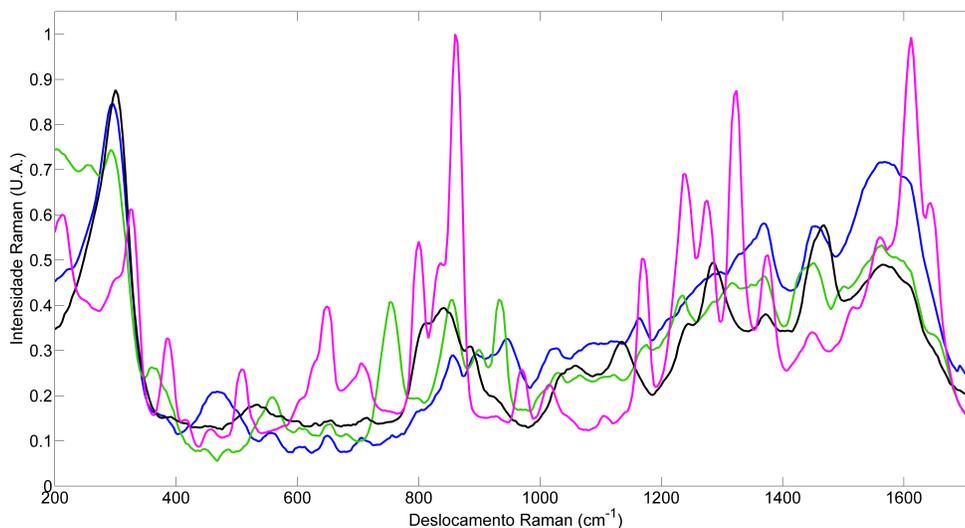


Figura 6.10: Espectros SERS de HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta) adquiridos separadamente.

6.3.3 Avaliação dos espectros

Após efetivada a resolução espectral, a primeira avaliação qualitativa do processo de otimização dos espectros, é a comparação da estimativa inicial com as respostas ressolvidas. A Fig.6.11 mostra como para o HPMC e PVP há um bom ajuste dos espectros, enquanto diminui um pouco para o PEG e o paracetamol. Voltando aos espectros da Fig.6.8, há uma banda comum centrada em 860 cm^{-1} para o PEG e o paracetamol que poderia eventualmente não ser completamente ressolvida. De outro lado, no caso específico do

paracetamol, a diferença principal está no deslocamento da linha de base que é maior no espectro estimado com SIMPLISMA, devido à pouca quantidade de paracetamol nos filmes (se comparada com a quantidade total de polímeros) e ao fato que o algoritmo não decompõe as contribuições em função das proporções dos componentes em uma dada mistura. A porcentagem de falta-de-ajuste, lof (Eq.2.12) calculada pelo MCR foi de 9,04%.

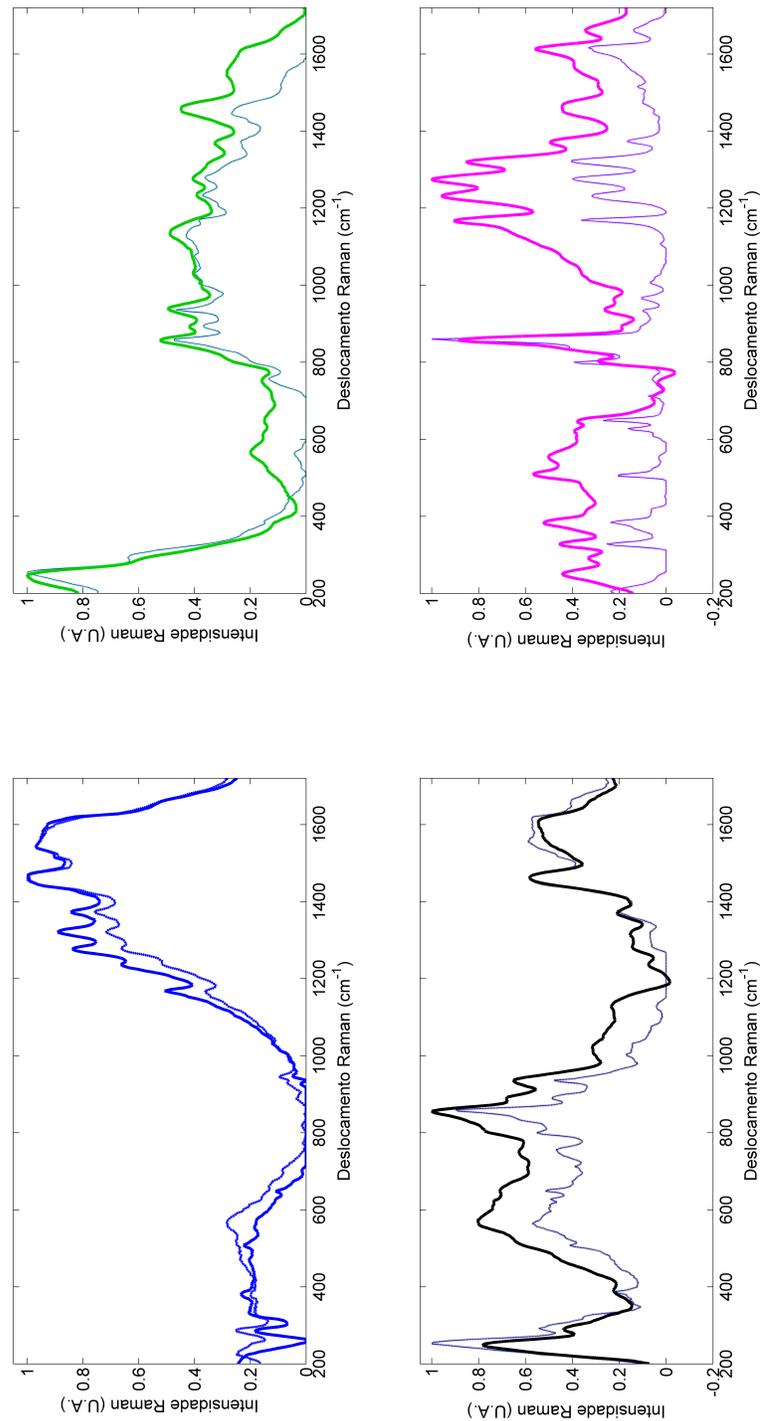


Figura 6.11: Espectros SERS da estimativa inicial de HPMC (azul), PVP (verde), PEG (preto) e paracetamol (magenta) calculados com SIMPLISMA (linhas sólidas) e otimizados com MCR (linhas pontilhadas).

6.3.4 Construção de imagens químicas: Estudo da distribuição

Os valores da matriz **C** que representam a porcentagem de cada componente, foram redobrados para gerar as imagens químicas apresentadas nas Fig 6.12 até 6.15, onde as escalas em RGB mostram a abundância percentual de cada componente por filme, sendo as áreas vermelhas onde o respectivo componente está mais concentrado e as azuis onde seu teor é baixo.

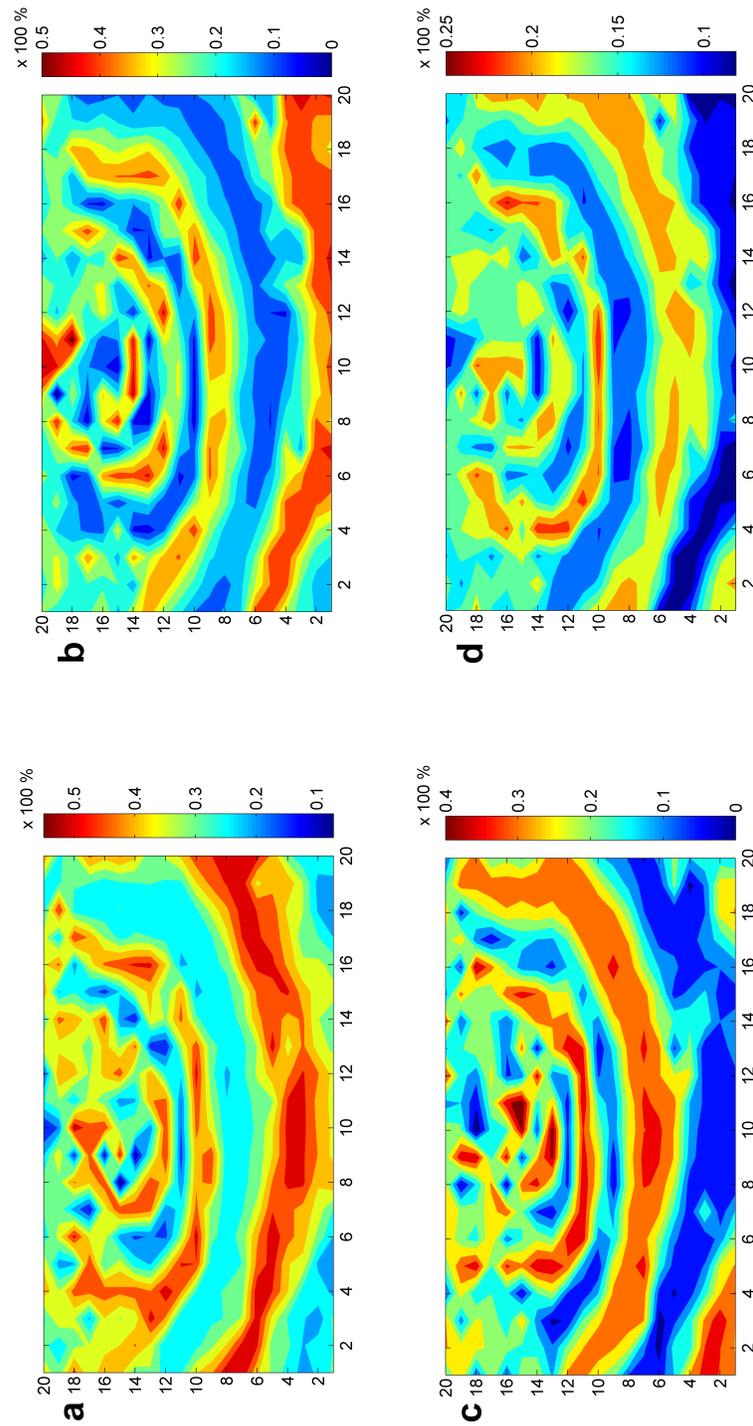


Figura 6.12: Mapas de distribuição de a) HPMC, b) PVP, c) PEG e d) paracetamol no filme polimérico 1.

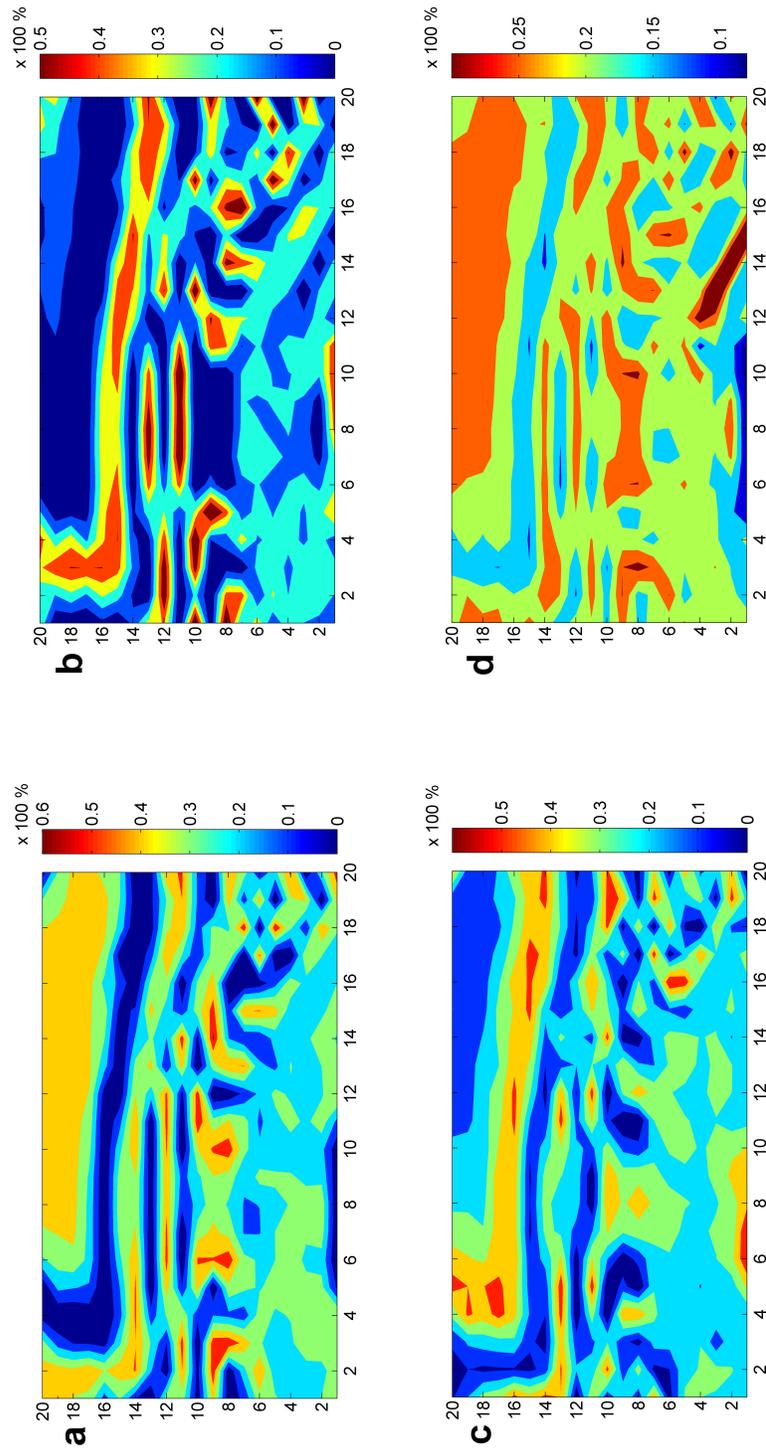


Figura 6.13: Mapas de distribuição de a) HPMC, b) PVP, c) PEG e d) paracetamol no filme polimérico 2.

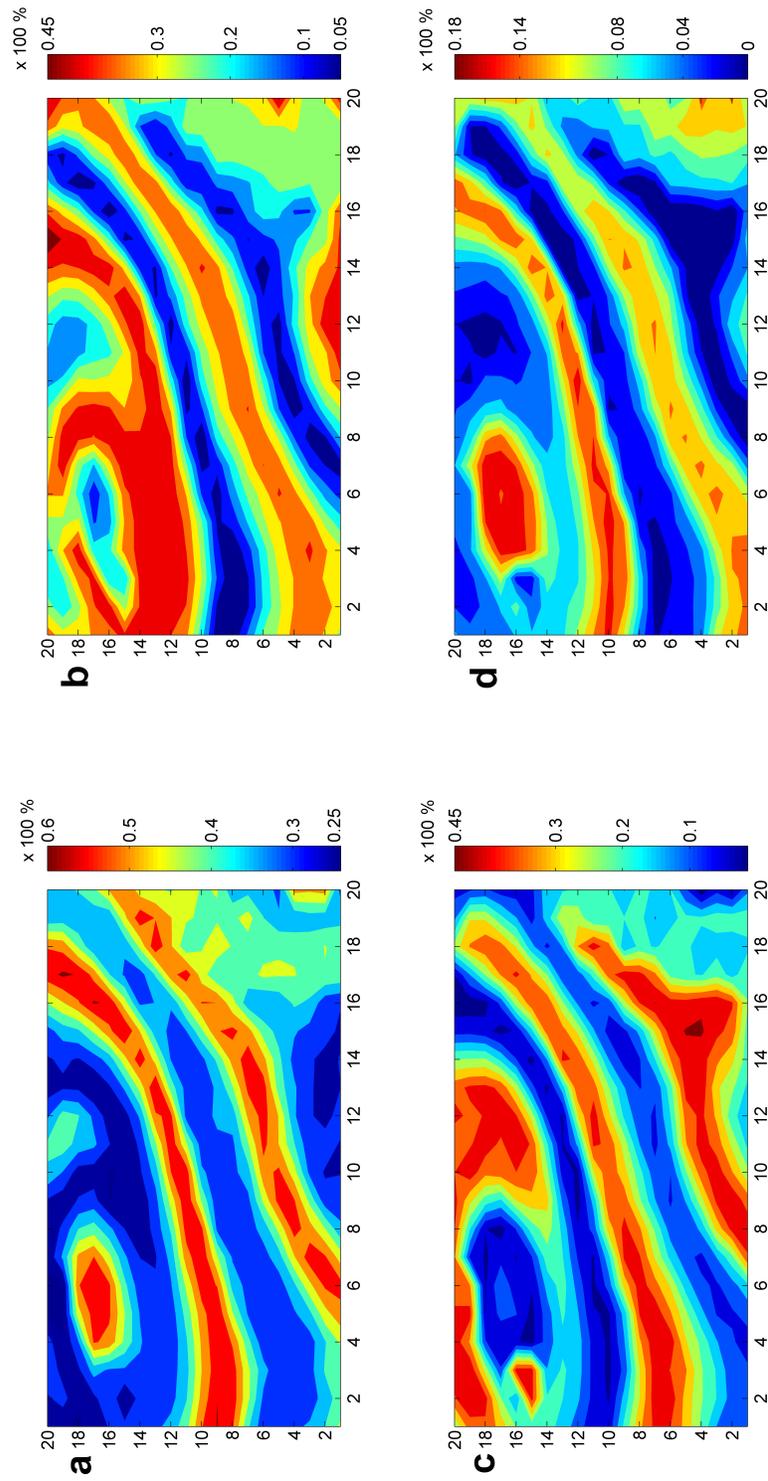


Figura 6.14: Mapas de distribuição de a) HPMC, b) PVP, c) PEG e d) paracetamol no filme polimérico 3.

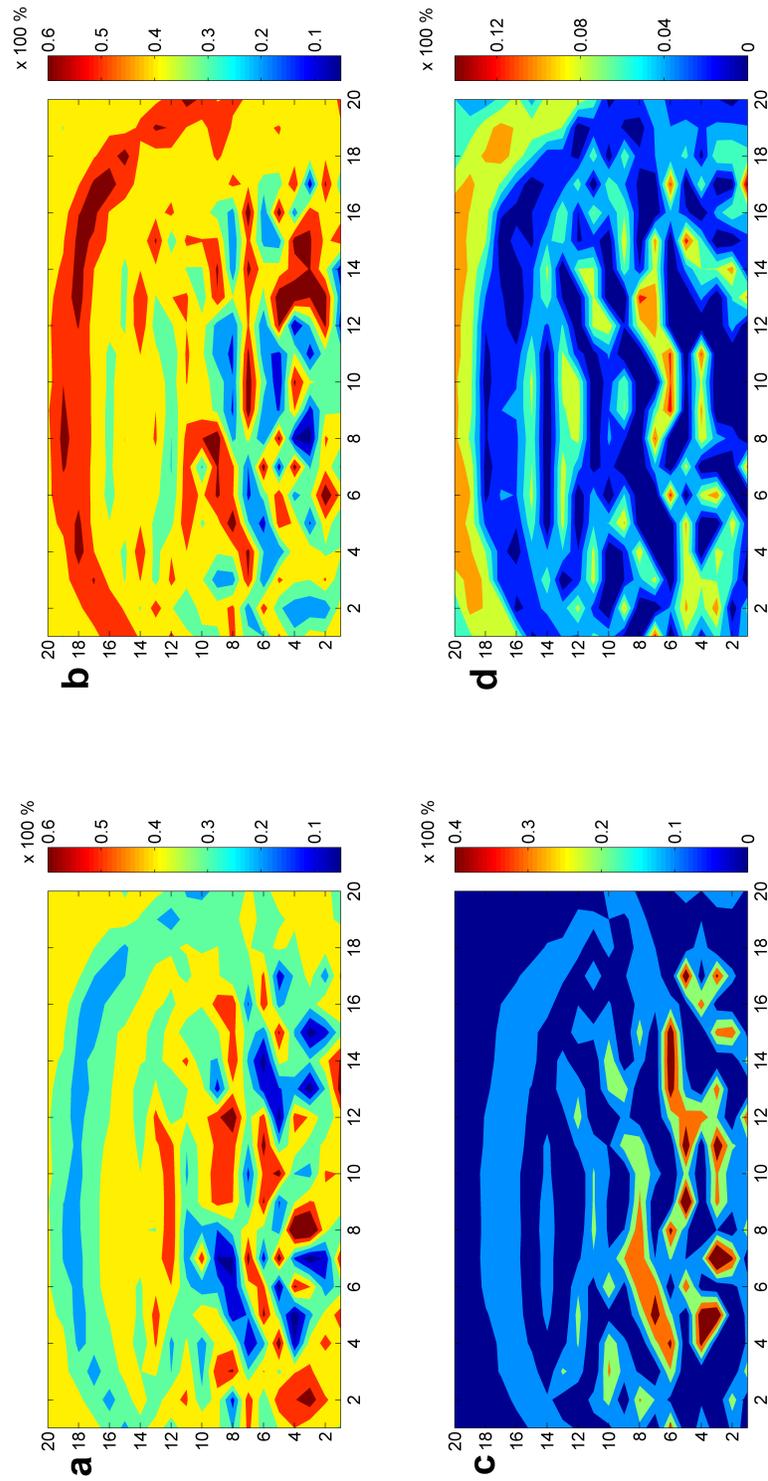


Figura 6.15: Mapas de distribuição de a) HPMC, b) PVP, c) PEG e d) paracetamol no filme polimérico 4.

Foi observada uma baixa homogeneidade na distribuição dos componentes dos filmes, mais notável no filme 3, provavelmente devido à maior proporção de HPMC, o polímero menos solúvel em meio aquoso. A complementariedade das imagens permite avaliar as interações entre os polímeros e o fármaco. Foi observado que nos filmes 1, 2 e 3, há uma interação entre HPMC e o paracetamol, uma vez que são comuns as regiões onde eles estão mais concentrados. Entre o fármaco e a PVP parece não haver interação, exceto para o filme 4 que contém um teor maior do polímero e a menor concentração do paracetamol. Também foram observadas tendências opostas de distribuição entre o HPMC e o PEG

Adicionalmente, foi calculada a concentração média de cada componente, como mostrado na Tabela 6.2, utilizando os escores da matriz **C**.

Tabela 6.2. Composição dos filmes poliméricos (valores do MCR)

Filme	Composição percentual(%)			
	HPMC	PVP	PEG	PAR*
1	36,23	21,49	26,02	19,42
2	28,61	28,04	20,57	29,50
3	40,57	27,90	23,69	8,51
4	39,26	44,80	11,05	5,14

*% de paracetamol em (HPMC + PVP + PEG)=100%

Com esses resultados foram calculados os erros relativos da Tabela 6.3. Como esperado, a determinação do paracetamol teve uma maior exatidão devido à grande quantidade da informação contida no espectro que garantiu uma melhor resolução com o MCR.

Tabela 6.3. Erros relativos

Filme	Erros relativos(%)			
	HPMC	PVP	PEG	PAR
1	5,32	12,64	2,85	3,57
2	5,81	5,29	7,84	5,12
3	4,83	11,99	11,17	5,43
4	8,51	7,59	8,33	4,86

Além dos filmes apresentados no presente estudo, também foram preparados filmes com concentrações maiores do que 30 % de paracetamol, mas com o aumento da quantidade de componentes é formada uma camada de maior espessura que impede a detecção dos sinais amplificados pela superfície nanoestruturada, gerando como consequência uma combinação de respostas Raman e SERS, e a resolução de curvas perde eficiência.

6.4 Conclusões

Embora técnicas de espectroscopia vibracional como Raman ou infravermelho sejam adequadas para realizar estudos com espectroscopia de imagem, a técnica SERS pela sua superior detectabilidade permite atingir formulações com concentrações em níveis mais baixos.

O emprego do algoritmo SIMPLISMA no cálculo dos espectros da estimativa inicial é uma opção que permite se aproximar mais à realidade de um sistema onde são esperadas possíveis interações entre os componentes cuja intensidade ou efeito pode variar em

função das proporções presentes como no caso dos filmes poliméricos. Embora para este caso é possível adquirir os espectros individualmente, estes não refletem essas interações, afetando negativamente o resultado da resolução multivariada.

O emprego de imagens SERS projeta-se como uma promissora ferramenta no estudo de sistemas de liberação controlada de fármacos uma vez que permite estabelecer interações entre os componentes, além de avaliar sua distribuição espacial e propriedades como homogeneidade, sendo de grande aplicabilidade na otimização de sistemas de liberação controlada de fármacos.

Capítulo 7

Aplicação 3: QUANTIFICAÇÃO DO ANTIBIÓTICO MOXIFLOXACINA EM URINA

7.1 Introdução

As quinolonas são agentes quimioterapêuticos com atividade antibacterial que pertencem à família dos inibidores da enzima girase e possuem a estrutura básica da Fig.7.1. Apresentam notável potência contra bactérias entéricas gram-negativas e gram-positivas e com menor efetividade, contra as não-entéricas [72]. Consideráveis quantidades de quinolonas são usadas na área agropecuária, principalmente em produção de aves, gado, porco e também na medicina humana.

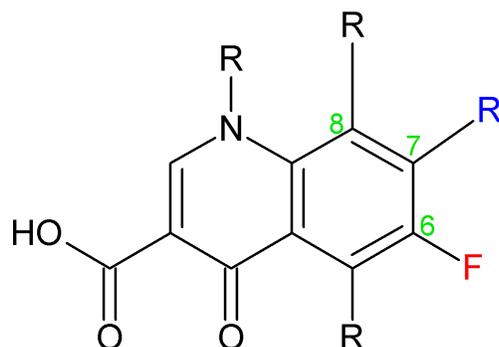


Figura 7.1: Estrutura molecular dos antibióticos fluoroquinolona.

A efetividade e potência antibacteriana das quinolonas é quimicamente modificada pela substituição de alguns grupos funcionais no núcleo quinolona como no caso da enoxacina e do ácido nalidíxico onde foi substituído um átomo de C por um de nitrogênio na posição 8. A substituição de um anel piperazina na posição 7 gera compostos com atividade incrementada contra *Pseudomonas aeruginosa*. De outro lado, a fluoração na posição 6 produz os antibióticos do tipo fluoroquinolona que, junto com outras modificações nas cadeias laterais, aumenta a atividade contra bactérias gram-positivas e pneumococos; melhora os perfis fármaco-cinéticos e incrementa os tempos de meia vida no plasma [73]. Apesar que inúmeras pesquisas químicas, microbiológicas e espectroscópicas não conseguem ainda elucidar o mecanismo exato de atuação dessas moléculas, sabe-se que os inibidores da girase atacam o complexo DNA-girase bacteriana que é responsável pelo superenrolamento do DNA bacteriano, e necessário para a replicação das bactérias.

Uma considerável quantidade de analitos que podem potencialmente entrar em contato com sistemas biológicos, requerem monitoramento regular principalmente se possuem efeitos adversos em organismos vivos. Dentre eles, os antibióticos quinolona e fluoro-

quinolona têm atraído grande interesse pela sua associação com efeitos acumulativos como lesões do cérebro, esclerose múltipla, problemas no coração e diversas neuropatias [74–76]. Especificamente o antibiótico moxifloxacina é um agente antibacterial de quarta geração com melhorada atividade *in vitro* contra bactérias anaeróbicas gram-positivas e é amplamente usado em prática clínica e terapias, seguindo mecanismos renais e hepáticos de eliminação [77].

Várias técnicas têm sido empregadas para determinar essa espécie em fluídos corporais, incluindo cromatografia, eletroforese, espectrofluorimetria e voltametria [78–82]. Embora a resposta Raman para algumas quinolonas já esteja publicada, sua determinação empregando SERS ainda não foi reportada.

7.2 Metodologia

7.2.1 Amostras e padrões

A determinação da moxifloxacina foi realizada em amostras de urina de três doadores voluntários. A coleta das amostras foi feita da primeira urina da manhã e posteriormente filtrada através de filtros *Millex* de 0,22 μm . Depois, as amostras foram dopadas com quantidades adequadas de uma solução de moxifloxacina a 1000,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtendo concentrações de 70,0 e 150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo finalmente diluídas até 1,0%.

Para a quantificação, foram preparadas quatro soluções em triplicata de adições do padrão em incrementos de 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para obter o espectro SERS, foram depositados volumes (gotas) separados de 0,50 μL distribuídos na área ativa das placas na-

noestruturadas de ouro, e os espectros foram adquiridos após evaporação do solvente a temperatura ambiente. Foi empregada uma placa nanoestruturada para cada curva analítica.

De outro lado, foi avaliada a variabilidade da resposta SERS entre amostras de diferentes indivíduos. Para isso, foram utilizadas amostras de urina de seis indivíduos (três homens e três mulheres), coletadas e tratadas com o procedimento anteriormente descrito.

7.2.2 Condições espectrais

Os espectros foram adquiridos com 10 exposições de 8 segundos, e com 100% de potência do laser (250 mW). A varredura foi feita entre 200 e 2200 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} . Para cada gota depositada foram adquiridos 15 espectros com os quais foi calculado o espectro médio.

Além disso, foi avaliada a distribuição espacial da amostra no substrato, realizando um mapeamento de uma área de 0,25 × 0,25 mm, por aquisição de 625 espectros sob as mesmas condições explicadas anteriormente.

7.2.3 Tratamento quimiométrico

A resolução multivariada de curvas foi aplicada no espectro na faixa de comprimentos de onda entre 332 e 1852 cm^{-1} . Os dados foram pré-processados com segunda derivada *Savitzky-Golay* com um polinômio de segunda ordem e janela de 15 pontos.

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Atividade SERS da moxifloxacina

A estrutura molecular da moxifloxacina mostrada na Fig.7.2 exibe um núcleo quinolona com um grupo metoxi na posição 8 e um anel diazabicyclonil na posição 7. Embora até o momento ainda não tenha sido reportada a caracterização SERS para esse antibiótico, algumas associações podem ser feitas a partir do espectro Raman [73].

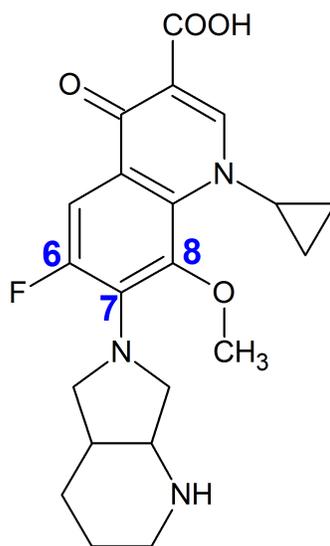


Figura 7.2: Estrutura molecular do antibiótico moxifloxacina.

Assim, as três bandas características da moxifloxacina na Fig.7.3, comuns tanto em SERS quanto em Raman são:

- Vibração de estiramento do sistema do anel quinolona, centrada em 1372 cm^{-1}
- Vibração da ligação -C-N, centrada em 548 cm^{-1}
- Vibração dos grupos -COO⁻ e -C=O em 1616 cm^{-1}

No entanto, quando comparado com a resposta SERS da moxifloxacina em urina a 1,0%, há uma importante perda de intensidade nas bandas já mencionadas e outras, como a centrada em 1044 cm^{-1} estão completamente ausentes na presença da urina, que exibe uma banda de alta intensidade em 1000 cm^{-1} (banda da uréia). Essa comparação é apresentada na Fig.7.4. A moxifloxacina também apresenta atividade SERS em nanoestruturas coloidais de ouro. Porém, a presença dos componentes da urina, ainda diluída a 1,0%, causa uma importante agregação das nanopartículas e a diminuição do efeito SERS incrementa os valores de LD acima dos níveis esperados para a presente aplicação. A Fig.7.5 compara as respostas sobre substratos sólidos e sobre ouro coloidal para a faixa de concentrações entre $0,5$ e $4,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, e é observado que para a máxima concentração testada ($4,50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$), a intensidade no substrato sólido atinge quase 2×10^4 (U.A.) e no ouro coloidal cai para valores inferiores a 5×10^2 (U.A.).

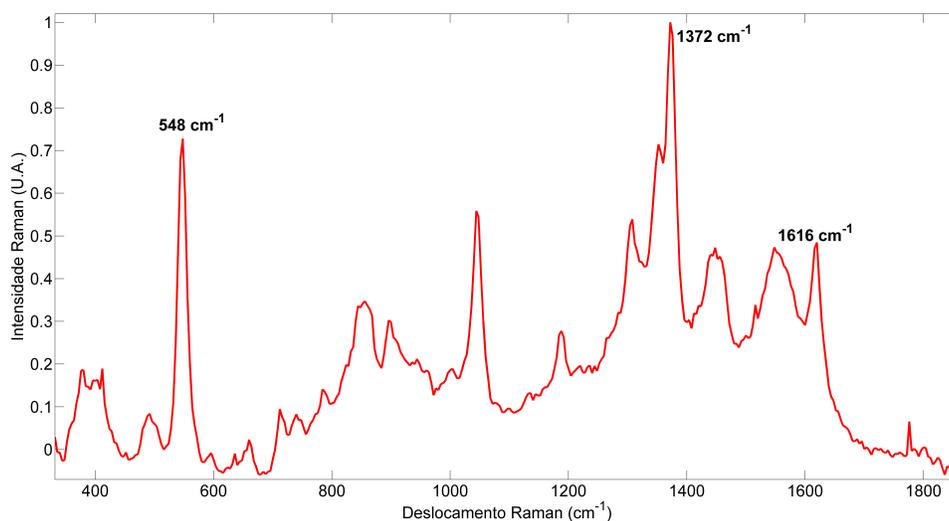


Figura 7.3: Espectro SERS (normalizado) do antibiótico moxifloxacina em solução aquosa.

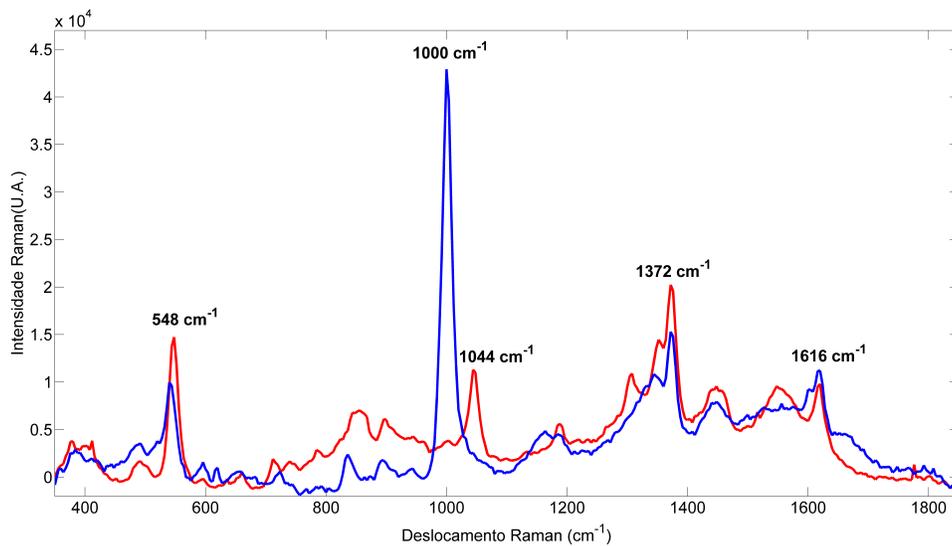


Figura 7.4: Espectros SERS de moxifloxacina a $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em solução aquosa (vermelho) e em uma solução de urina a 1,0% (azul).

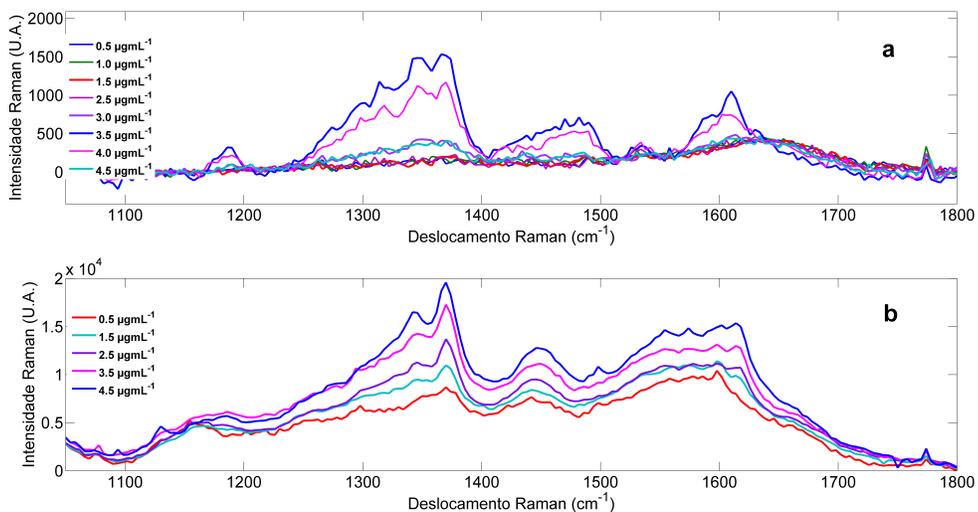


Figura 7.5: Espectros SERS da moxifloxacina em urina a 1,0% sobre (a) ouro coloidal e (b) sobre substratos sólidos nanoestruturados.

A interação da estrutura do antibiótico com os substratos sólidos nanoestruturados é dife-

rente, em primeiro lugar pela morfologia das nanopartículas e em segundo lugar porque o fato delas estarem fixas sobre um sólido, elimina as possibilidades de agregação induzida por cargas elétricas.

7.3.2 Variabilidade das amostras de urina: necessidade do método de adição de padrão

Uma vez que os processos metabólicos são completamente diferentes para cada organismo como é amplamente conhecido, é de se esperar que a composição da urina dependa fortemente de fatores desconhecidos não controláveis analiticamente. Para avaliar essa variabilidade mediante espectroscopia SERS e se ela influencia na determinação do analito, foram comparadas as respostas de amostras de urina de seis indivíduos, tratadas sob as condições descritas anteriormente. Essas respostas são apresentadas na Fig.7.6.

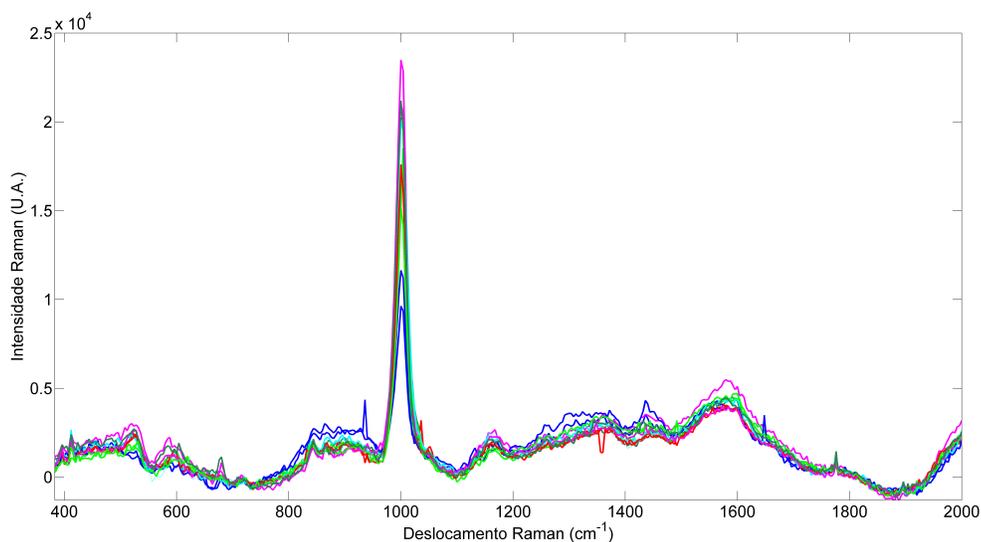


Figura 7.6: Espectros SERS de amostras de urina a 1,0%, provenientes de seis indivíduos.

Embora por inspeção visual não seja possível identificar diferenças notáveis entre as respostas, a análise PCA dos espectros mostrou que cerca de 91% da variância é explicada com duas componentes principais e foi observado um claro agrupamento por indivíduos como mostrado na Fig.7.7.

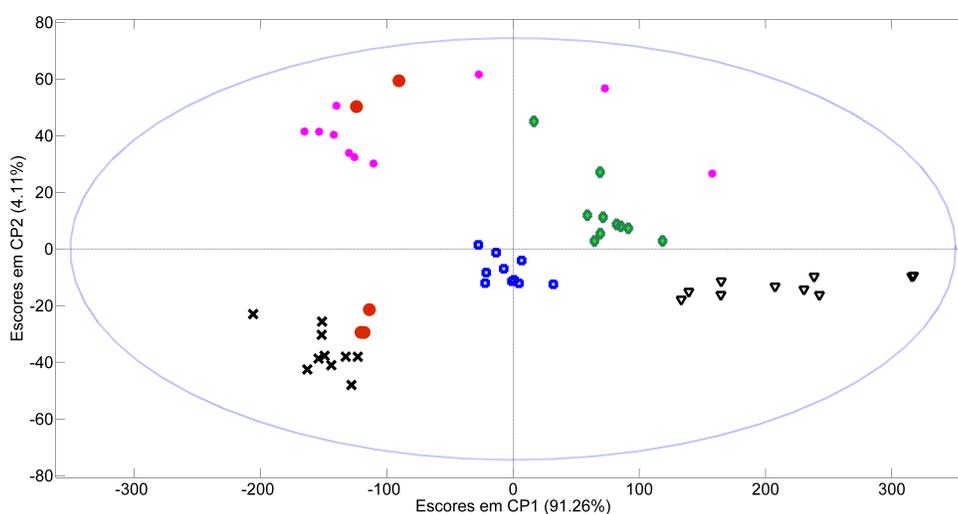


Figura 7.7: Gráfico de escores das componentes principais CP1 *versus* CP2 de amostras de urina a 1,0%, de seis indivíduos.

Além disso, o gráfico dos pesos da Fig.7.8, mostrou que a banda centrada em 1000 cm^{-1} , proveniente da uréia [83] tem a maior influência na separação dos grupos. Sendo que tanto o conteúdo de ureia quanto dos outros componentes naturalmente presentes na urina não são controláveis nem calibráveis, além do efeito de diminuição do sinal mostrado na Fig.7.3; a adição de padrão é necessária para eliminar o efeito de matriz.

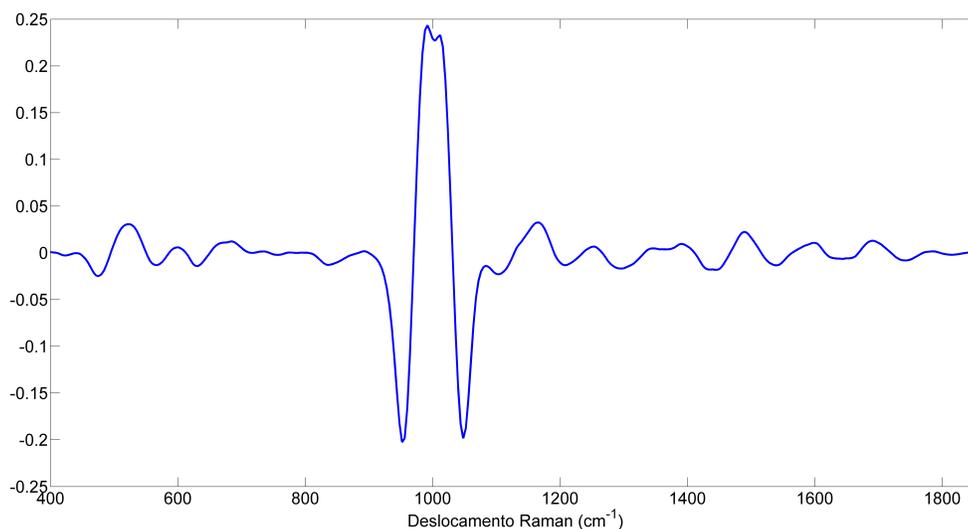


Figura 7.8: Gráfico de pesos da componente 1 para a análise PCA de amostras de urina de seis indivíduos, diluída a 1,0%.

7.3.3 Determinação da moxifloxacina

A moxifloxacina é usualmente administrada em dose única de 400 mg, na forma oral ou como infusão i.v. (intravenosa), e é eliminada através da urina na sua forma farmacologicamente ativa, sendo encontrada nas concentrações apresentadas na Tabela 7.1.

Tabela 7.1. Valores de referência de moxifloxacina em urina após administração de uma única dose de 400 mg [84].

Tempo após administração (h)	Urina		Urina diluída a 1,0%	
	Oral	i.v.	Oral	i.v.
8	55,1	127,0	0,55	1,27
12	69,4	71,5	0,69	0,72
24	38,1	38,2	0,38	0,38

Levando em consideração as concentrações de referência, foram construídas duas curvas analíticas para 0,70 e 1,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em urina diluída a 1,0% (correspondentes a 70,0 e 150,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na urina sem diluir) com quatro adições de 1,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de moxifloxacina.

Devido a que o processo de aquisição espectral é feito a partir de uma amostra líquida depositada sobre uma superfície plana com posterior evaporação do solvente, há uma distribuição natural governada por fatores como as interações físicas e químicas do sistema metal-analito (e outros componentes da matriz), a velocidade e temperatura de evaporação do solvente e a forma de deposição da gota, dentre outras. Isto faz necessária uma avaliação preliminar da homogeneidade da distribuição do analito, que garanta reprodutibilidade na aquisição dos espectros usados para a determinação quantitativa.

Esta avaliação foi feita por mapeamento da gota depositada mostrada na Fig.7.9 após secagem.

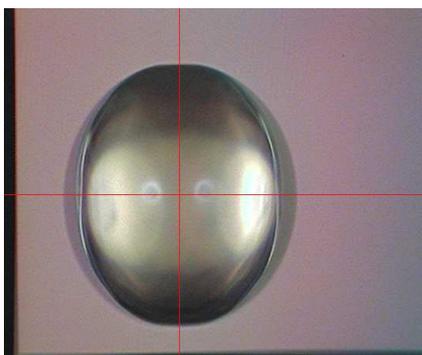


Figura 7.9: Fotografia de uma gota de 0,50 μL depositada sobre uma superfície de ouro nanoestruturado.

Para cada espectro dos 625 espectros registrados foi calculada a correlação com o espectro de referência (moxifloxacina em urina a 1,0%) e rearranjada para construir o mapa da Fig.7.10, que mostra a variação da correlação desde cor vermelho até azul. Embora seja observada uma alta concentração de amostra nas bordas da gota -como esperado-, a área central possui uma alta homogeneidade e portanto a probabilidade do espectro de referência ser registrado nessa área é alta.

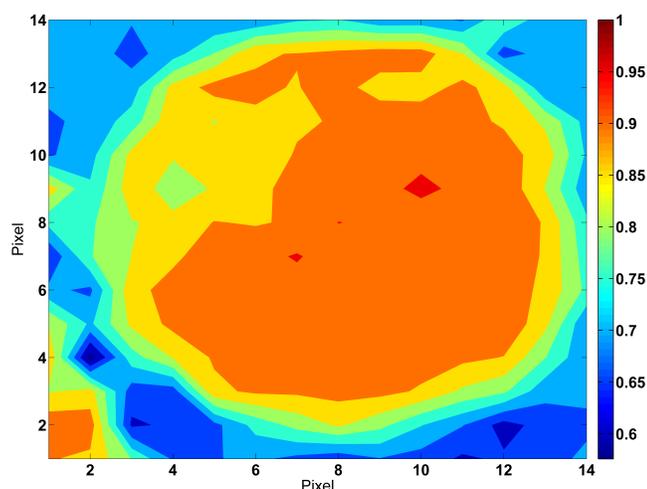


Figura 7.10: Mapa de correlação para 0,50 μL de solução de moxifloxacina depositada sobre ouro nanoestruturado (mapeamento realizado após secagem).

Com base nos resultados da distribuição, para cada amostra das curvas analíticas foram adquiridos ≈ 15 espectros na área central de cada gota e foi calculado o espectro médio. Para evitar o registro de espectros da borda das gotas, o posicionamento da fonte foi assistido pela câmera de alta resolução e o mecanismo movel do equipamento que permitem observar em detalhe como na Fig.7.9 mostrada anteriormente.

Para aplicar o MCR, os espectros foram empilhados na matriz **D**, com a primeira linha contendo o(s) espectro(s) da amostra e nas outras, os das adições do padrão. Para corrigir algumas características do espectro e selecionar as regiões com maior quantidade de informação, foram testados vários intervalos e pré-processamentos e finalmente foi utilizado o espectro na faixa entre 332 e 1852 cm^{-1} e aplicada segunda derivada *Savitzky-Golay*. Os espectros antes e após o pré-processamento são mostrados na Fig.7.11.

Uma vez que o interesse era a determinação unicamente da concentração da moxifloxacina, a estimativa inicial foi construída com três vetores ou espectros apresentados na Fig.7.12, e que correspondem a:

- Espectro da moxifloxacina
- Espectro da urina a 1,0%
- Espectro da área ativa do substrato nanoestruturado de ouro

Usando o mesmo pré-processamento para a matriz de espectros e a estimativa inicial, foi aplicada a restrição de não negatividade nos escores. Com os valores obtidos em **C**, foram construídas as curvas analíticas pseudo-univariadas mostradas nas Fig.7.13 e 7.14, correspondentes à moxifloxacina a 0,70 e 1,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

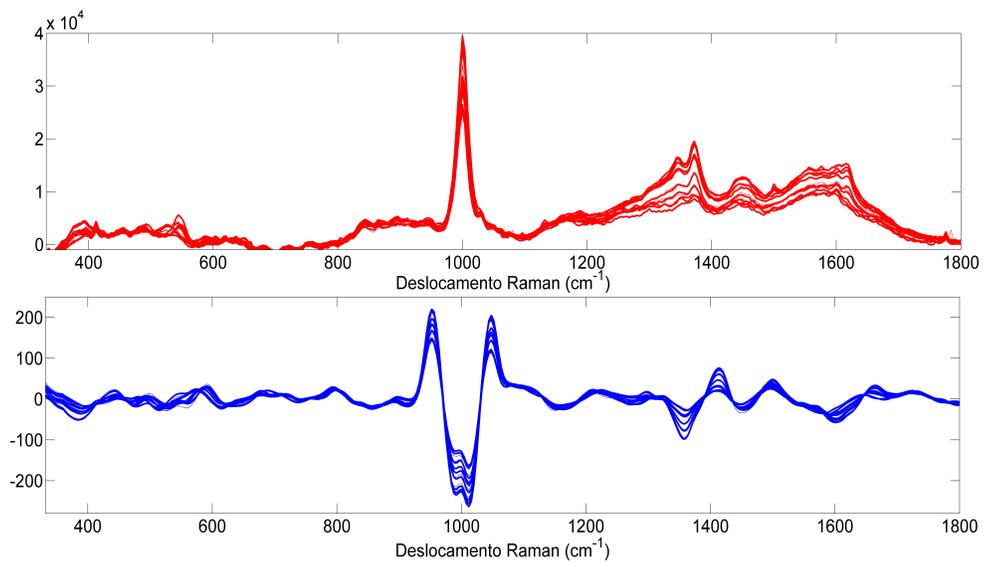


Figura 7.11: Espectros de moxifloxacina em urina antes e após pré-processamento com segunda derivada *Savitzky-Golay*.

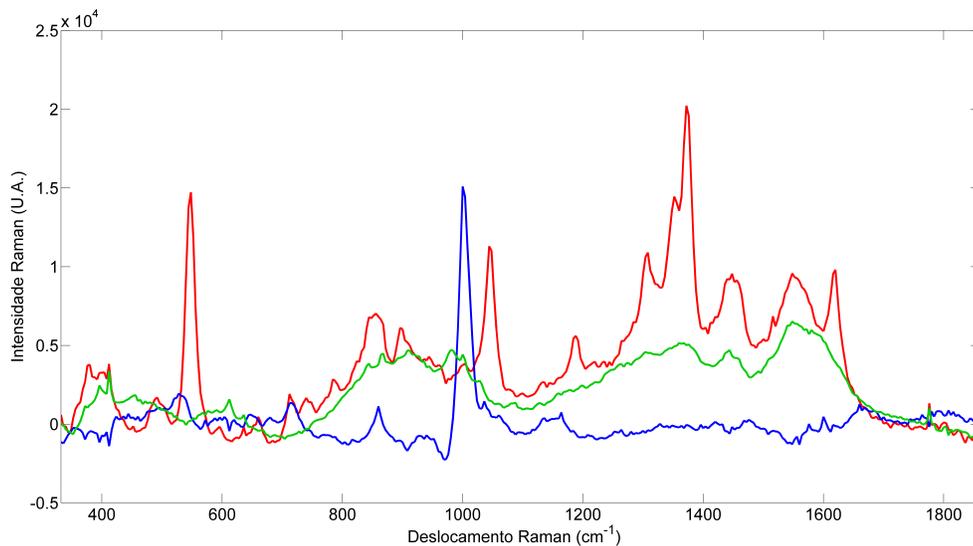


Figura 7.12: Espectros SERS utilizados como estimativa inicial de moxifloxacina (vermelho), urina a 1,0% (azul) e resposta da superfície nanoestruturada de ouro (verde).

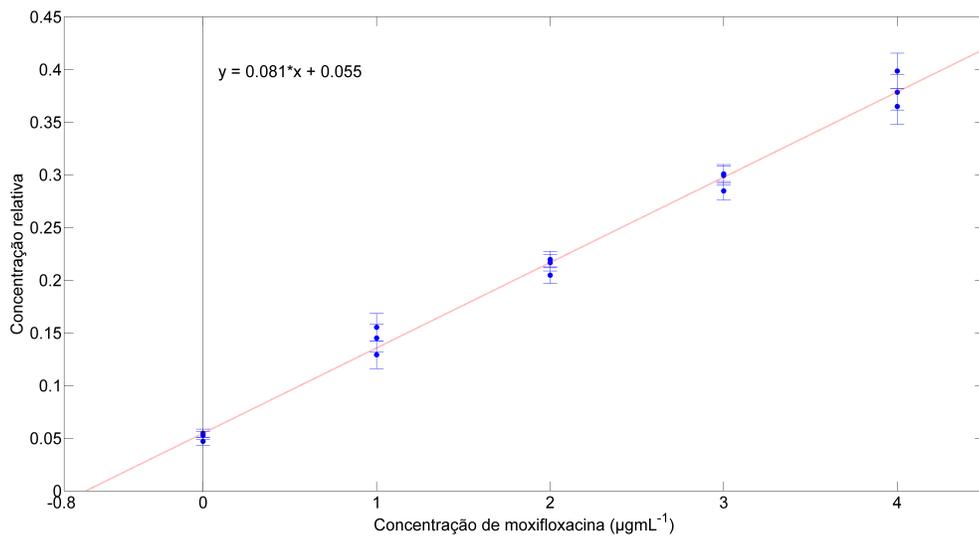


Figura 7.13: Curva analítica para a determinação de moxifloxacin a $0,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ em urina diluída a 1,0%, com replicatas.

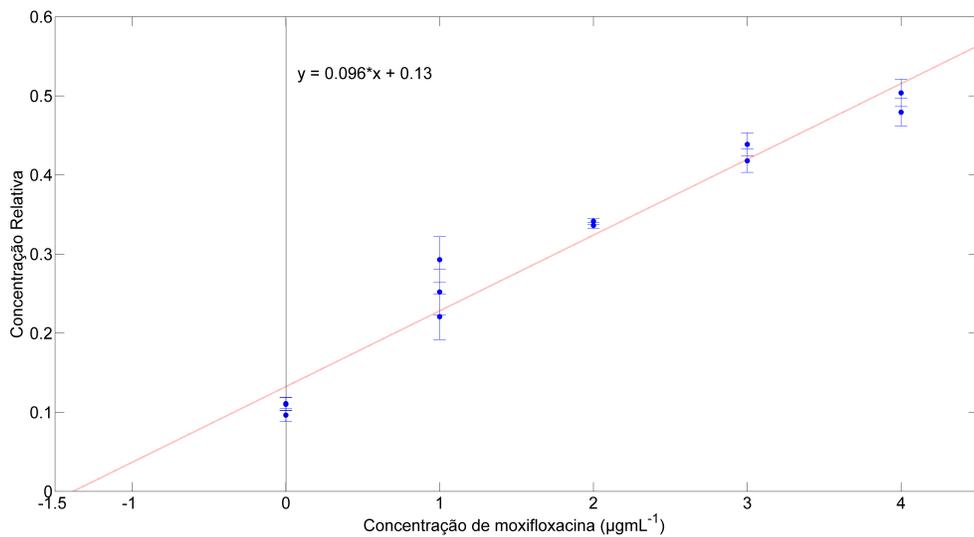


Figura 7.14: Curva analítica para a determinação de moxifloxacin a $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em urina diluída a 1,0%, com replicatas.

Como mostrado na Tabela 7.2, houve uma notável diferença nos erros relativos para as duas concentrações estudadas: 8,7% para $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 4,2% para $0,70 \mu\text{g mL}^{-1}$, a qual pode ser atribuída à esperada saturação da superfície nanoestruturada como foi observado em testes preliminares feitos com soluções de moxifloxacina acima de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde os espectros apresentaram uma baixa relação S/N e o efeito de amplificação não é mais observado.

Por outro lado, já que foi utilizada uma placa nanoestruturada para cada curva analítica, foi realizado um teste de reprodutibilidade entre elas, expresso como % de desvio padrão DP, para avaliar se existe diferença significativa entre os resultados para cada replicata. O valor de DP foi menor para a concentração de $0,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ como esperado, e um teste F de duas caudas mostrou que não há diferença significativa entre os dois valores. Como já foi mencionado, um fenômeno de saturação é comumente observado com o aumento da concentração, diminuindo a relação S/N, mas segundo os resultados obtidos no presente estudo, uma concentração de até $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ não gera mudanças significativas para a qualidade das análises.

A correlação e linearidade do modelo desenvolvido foram avaliadas calculando o coeficiente R e mediante análise de variância ANOVA. Todos os valores calculados de F_{LOF} foram menores do que o valor F_C , portanto não há uma falta de ajuste significativa ao comportamento linear apesar que para o valor de $1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, o valor de R diminuiu drasticamente, indo de 0,99 para 0,96. De outro lado, os valores obtidos para LD e LQ mostraram que sob nossas condições, é possível determinar concentrações acima de $0,26 \mu\text{g mL}^{-1}$ (em urina a 1,0%), o que significa que com este procedimento, seria possível quantificar moxifloxacina em até 24 h após uma dose única de 400 mg.

Tabela 7.2. Figuras de mérito para a determinação de moxifloxacina em urina diluída a 1%.

	Moxifloxacina em urina a 1,0% ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	0,70	1,50
R	0,9977	0,9599
F_{LOF} (F_C)	0,941(4,667)	0,110(4,667)
DP (S_x/y)*	0,013	0,028
Reprodutibilidade(DP)	0,17	0,30
LD($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,085	0,15
LQ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,26	0,43
$E_R\%$	4,23	8,70

*Desvio padrão da regressão

7.4 Conclusões

A moxifloxacina foi determinada em amostras de urina, nos valores de concentração esperados após uma dose única (oral ou i.v.) de 400 mg, mediante um procedimento experimental simples de filtração, diluição e deposição sobre a superfície nanoestruturada. Os valores obtidos de LD e LQ mostraram que a metodologia proposta permitiria o monitoramento do antibiótico em meio urinário até 24 horas após uma única dose i.v.

Uma importante característica do procedimento quimiométrico empregado foi o ganho da vantagem de segunda ordem, toda vez que a contribuição espectral do analito pode ser matematicamente isolada ainda na presença de quaisquer número de interferências

que não podem ser calibradas ou modeladas. Como mostrado, os procedimentos experimentais necessários para a presente determinação, são notavelmente minimizados e o consumo de reagentes é extremamente baixo.

O forte efeito de amplificação observado e a quase nula interferência da água, faz com que a técnica SERS seja conveniente na determinação de analitos de interesse biológico onde comumente há presença de água que no caso de outras técnicas espectroscópicas pode ser de difícil manipulação.

Capítulo 8

Aplicação 4: MODELAMENTO DA REAÇÃO DE DEGRADAÇÃO FOTOLÍTICA DE MOXIFLOXACINA EM MEIO ALCALINO

8.1 Introdução

O uso estendido dos antibióticos fluoroquinolona, associado ao fato de não serem completamente metabolizados no organismo humano (até o 90% da sua forma farmacologicamente ativa pode ser excretada) gera cargas significativas dessas substâncias em solos e águas residuais de uso doméstico. Diversos efeitos colaterais têm sido reportados para as fluoroquinolonas, sendo que um dos mais importantes é a fotossensibi-

lidade na pele que pode gerar lesões agudas e crônicas e que eventualmente podem degenerar em câncer. A ação desses fotossensibilizadores depende da produção de moléculas extremamente reativas (espécies de oxigênio reativas, radicais livres, fotoprodutos), que modificam lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos nas células. A fototoxicidade das fluoroquinolonas parece ser particularmente dependente do substituinte na posição 8, mostrada na Fig.8.1, aumentando na ordem: $-H < -OCH_3 < -F^-$, $-Cl^-$. Essas características estruturais são também determinantes na sua fotodegradação [85].

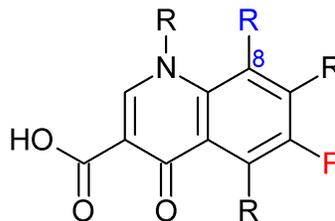


Figura 8.1: Núcleo estrutural das fluoroquinolonas

Por outra parte, os tratamentos de descontaminação convencionais resultam em prolongadas exposições das bactérias a concentrações de fluoroquinolonas próximas do valor mínimo inibitório (a menor concentração de antibiótico capaz de inibir o crescimento de um dado microorganismo após sua incubação) para vários tipos de cepas bacterianas. A exposição estendida a comunidades bacterianas nesses níveis pode induzir a geração de patógenos resistentes a esse tipo de antibióticos ou toxicidade crônica em organismos aquáticos.

No entanto, importantes avanços foram surgindo na área de tratamento químico de águas, conduzindo a um melhoramento dos procedimentos de degradação de compostos orgânicos dissolvidos ou suspensos em meio aquoso e que são conhecidos como procesos de

oxidação avançada, POA (Processos Oxidativos Avançados) [86, 87].

De forma geral, os POA abrangem uma série de procedimentos químicos baseados na produção *in situ* de radicais hidroxila altamente reativos ($\bullet\text{OH}$) e planejados para remover material orgânico e inorgânico em meio aquoso. Os contaminantes podem ser oxidados empregando quatro reagentes diferentes: peróxido de hidrogênio, oxigênio, ar e ozônio, em quantidades, combinações e sequências diferentes. As várias tecnologias POA estão resumidas na Fig.8.2 [88] .

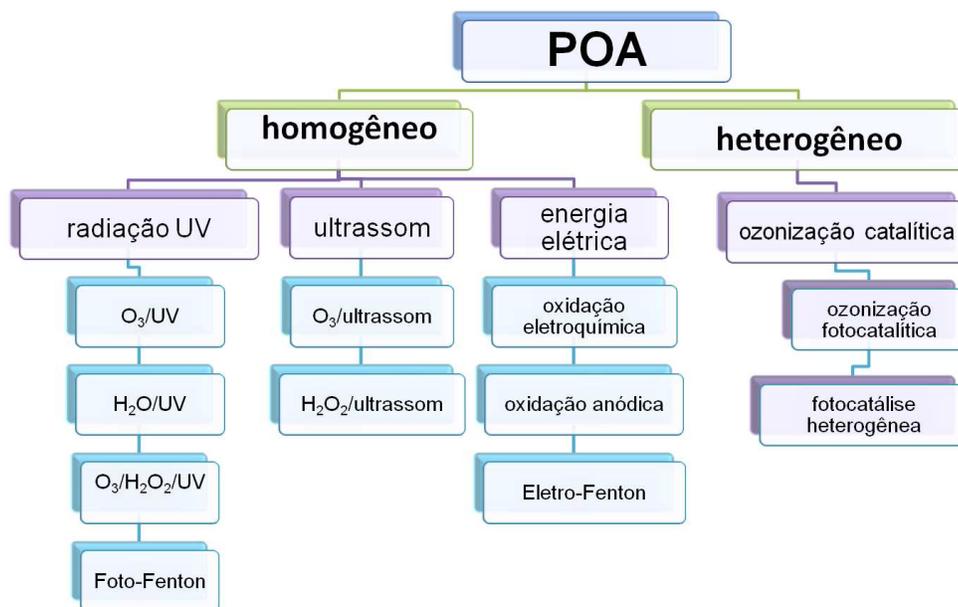
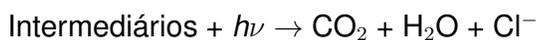
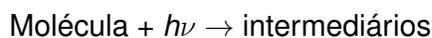


Figura 8.2: Classificação dos métodos POA

O radical $\bullet\text{OH}$, reagente principal dos POA, é uma espécie com um alto potencial padrão de redução (2.8 V *versus* ENH em meio ácido), propriedade que o faz capaz de oxidar uma ampla variedade de compostos orgânicos até dióxido de carbono (CO_2) e água, exceto os de estrutura mais simples (ácidos acético, malêico, oxálico ou acetona, dentre

outros). Dependendo da natureza dos compostos orgânicos, são possíveis duas formas de ataque inicial, a primeira retira um átomo de hidrogênio (no caso de alcanos e álcools) e na segunda, o radical se liga à molécula, como no caso dos compostos aromáticos. Na grande maioria dos casos os materiais contaminantes são convertidos em espécies inorgânicas como água, CO₂ ou sais.

Uma das tecnologias POA mais simples, é a fotólise direta que envolve a interação da luz (comumente radiação UV) com moléculas de água do meio, seguindo a rota mecanística geral:



Vários estudos utilizando fotólise-UV resultaram em uma degradação efetiva de contaminantes em soluções aquosas diluídas e experimentos com fotólise direta conduziram a compostos benzenóides não clorados [89]. Porém, a efetividade desses processos é menor quando comparada com métodos que combinam radiação com peróxido de hidrogênio ou ozônio ou os que utilizam catálise heterogênea ou homogênea.

Houve uma importante evolução e melhoramento desses processos na década de 2000, ligada a interesses principalmente de remediação ambiental e em concordância com as modificações legislativas que são continuamente realizadas. Os POA se caracterizam por uma baixa seletividade de ataque, a qual é útil em aplicações ambientais, especificamente em tratamentos de águas residuais. A versatilidade é melhorada pelas diferentes formas ou rotas de geração dos radicais •OH. Outras vantagens dos POA são as altas velocidades de reação, possibilidade de degradação completa, não utilização nem pro-

dução de materiais que requeiram posterior tratamento como no caso do carvão ativo por exemplo, e não geração de grandes volumes de resíduos como nos métodos físico químicos ou biológicos. No entanto, se é requerida uma aplicação específica, devem ser feitos cuidadosos ajustes na química dos processos e algumas aplicações exigem a eliminação do excesso de peróxido de hidrogênio.

Diversas publicações mostram que os POA são tratamentos viáveis na degradação e/ou mineralização das quinolonas [90–93], cuja rota degradativa tem sido comumente monitorada usando técnicas como cromatografia líquida, cromatografia gasosa e eletroforese capilar.

Várias técnicas espectroscópicas têm sido utilizadas em estudos mecanísticos e estruturais, como a Ressonância Magnética Nuclear, NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) e a espectroscopia Raman, sendo essa última, uma ferramenta útil na obtenção de informação sobre a estrutura e propriedades das moléculas embora a atribuição de bandas em moléculas poliatômicas seja de maior complexidade. Não obstante algumas aproximações às características do espectro SERS já tenham sido realizadas para fluoroquinolonas, ainda não tem sido reportada a caracterização da moxifloxacina nem sua determinação.

Nesse trabalho, pretende-se utilizar a técnica SERS para o monitoramento da degradação da moxifloxacina em meio alcalino.

8.2 Metodologia

8.2.1 Fotólise

Foram preparadas soluções estoque de moxifloxacina a $200,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ em solução tampão de fosfato (Sistema $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Na}_3\text{PO}_4$, $\text{pH} = 10,20$). Para a degradação fotolítica, foram utilizadas soluções de $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$, com o mesmo valor de pH. Para a fotólise foi utilizada uma lâmpada UV 254 nm e 16 W ($UV-C=100 - 280 \text{ nm}$)

Um volume de 200,00 mL da solução do antibiótico foi colocada em uma placa de Petri com diâmetro de 12 cm, a uma distância de 12 cm da lâmpada UV. Para monitorar o avanço da degradação, foram extraídas 26 alíquotas de $400 \mu\text{L}$ durante 8 h, segundo os intervalos mostrados na Tabela 8.1, armazenados protegidos da luz e analisados no mesmo dia.

Tabela 8.1. Tempos de aquisição de alíquotas do processo fotolítico.

Alíquota	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Tempo (min)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	18	20	25	30	40	50	60	80	100	120	180	240	360	480

A aquisição espectral foi realizada misturando $200,0 \mu\text{L}$ de amostra com 1,00 mL de ouro coloidal. Cada espectro foi adquirido com 6 exposições de 8 s, com 250 mW de potência do laser.

Além disso, foram preparadas soluções para a construção de uma curva analítica, sob as mesmas condições da fotólise, na faixa entre $0,00$ e $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

8.2.2 Tratamento quimiométrico

As matrizes do proceso fotolítico foram construídas empilhando os espectros registrados ao longo do processo. De forma similar, foram construídas as matrizes com os padrões, para a construção da curva analítica. Por inspeção visual do espectro foi escolhida a faixa entre 200 e 2200 cm^{-1} onde é observada a maior parte da informação útil. A aplicação do método MCR-ALS foi feita:

- Com matriz aumentada, sem pré-processamento
- Com matriz aumentada e segunda derivada

O posto químico e as estimativas iniciais foram calculadas utilizando os algoritmos SVD e SIMPLISMA respectivamente. Foi incluída também uma matriz chamada de **Csel** (com dimensões iguais a **C**), como restrição (ou filtro) onde foram fixados os valores de concentração conhecidos dos padrões da curva analítica para forçar esses resultados na matriz **C**. Esse procedimento é ilustrado na Fig.8.3.

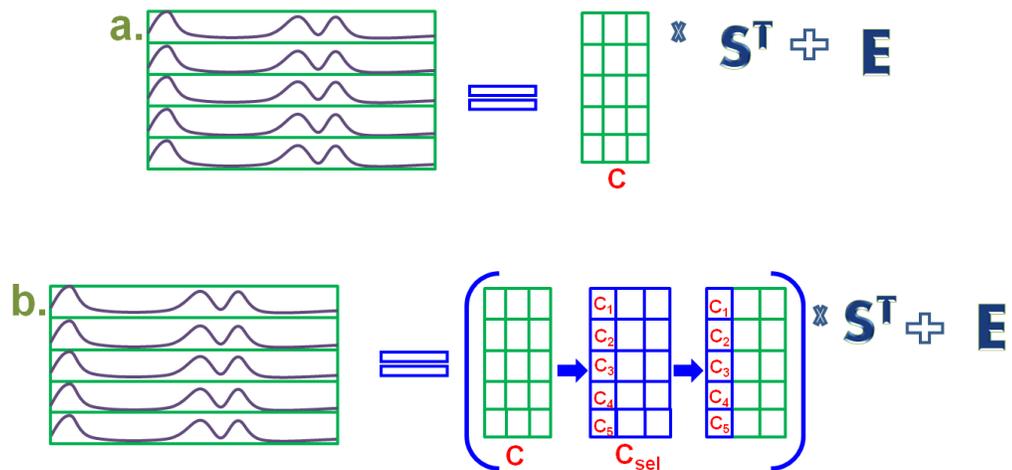


Figura 8.3: Método MCR-ALS a) Convencional e b) Aplicando a matriz filtro **Csel**

8.3 Resultados e Discussão

Uma vez que o sistema multicomponente sob estudo, corresponde a um processo de degradação que segue uma rota onde nem todos os intermediários podem ser identificados mediante espectroscopia SERS, a primeira informação necessária na aplicação do MCR-ALS é o número de espécies presentes ao longo da fotólise que, neste caso deve ser calculado mediante um algoritmo. Para isso, foi aplicado inicialmente o SVD, o qual mostrou três contribuintes independentes à resposta total, como mostrado na Fig.8.4. Estas respostas foram recuperadas com o algoritmo SIMPLISMA e utilizadas como estimativa de inicialização do MCR-ALS.

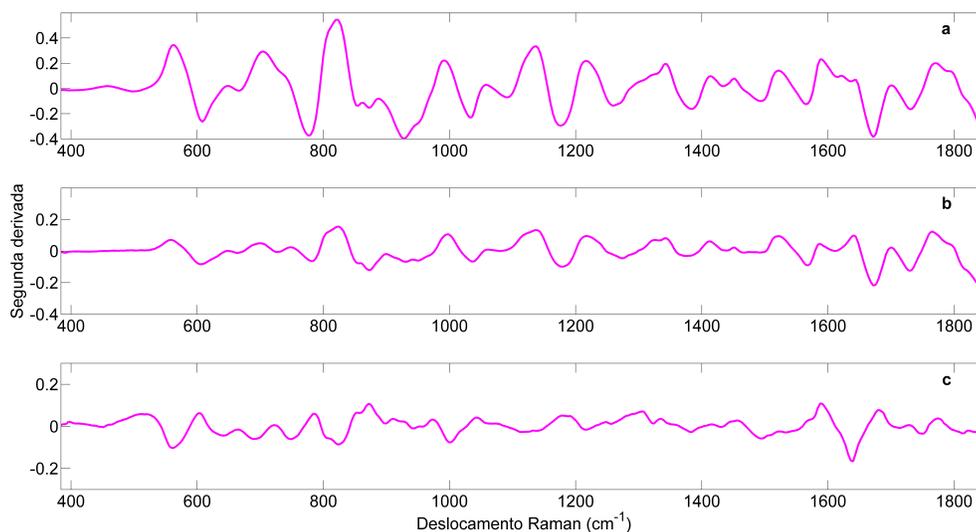


Figura 8.4: Respostas espectrais calculadas com SIMPLISMA da degradação fotolítica da moxifloxacina. a) Moxifloxacina, b) Intermediário A e c) Intermediário B.

A resolução multivariada de curvas foi aplicada com restrições de não-negatividade para concentração e espectros e feita inicialmente com a matriz contendo a sequência de

respostas da degradação. Alternativamente, a resposta da superfície nanoestruturada foi digitalmente subtraída de cada espectro e portanto este espectro foi retirado da estimativa inicial. Em ambos os casos, os resultados não foram satisfatórios pois as concentrações relativas para o intermediário B, não mostraram sentido químico. Essa dificuldade na resolução das concentrações pode estar associada a uma espécie com baixa estabilidade sob as condições utilizadas. Como uma forma de direcionar o resultado com base nas informações químicas do sistema, foi construída a matriz aumentada colocando os espectros da curva analítica embaixo dos espectros da fotólise. Adicionalmente foi uma matriz **Csel**, com as mesmas dimensões de **C**, onde as colunas correspondentes aos intermediários são restritas para valores iguais a zero, devido a que estão ausentes nessas soluções. Além disso, os espectros foram pré-processados com segunda derivada que gerou um melhor ajuste entre a estimativa inicial e as respostas otimizadas, que, expresso mediante a $\text{lof}(\%)$, teve uma diminuição de 2,1% se comparado com a matriz sem pré-processamento. Como mostrado na comparação com os espectros otimizados da Fig.8.5, houve um alto ajuste para a moxifloxacina e o intermediário A, enquanto para o terceiro componente (Intermediário B) há um baixo ajuste. De outro lado, uma avaliação complementar por análise PCA foi realizada empregando os espectros SERS ao longo da fotólise e, como observado na Fig.8.6, mostra três agrupamentos claros, o primeiro correspondente aos primeiros 10 min do processo, onde ainda a moxifloxacina está presente em quantidades maiores a 50%.

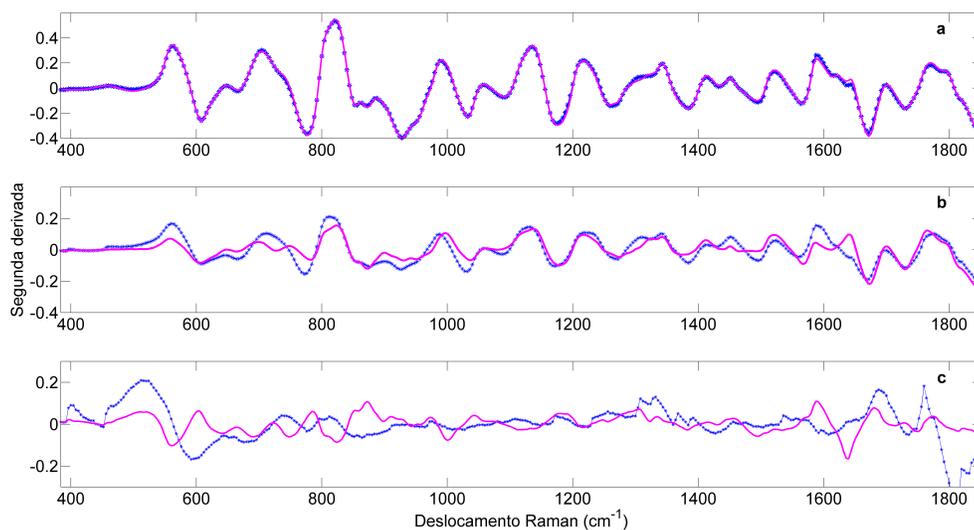


Figura 8.5: Espectros da estimativa inicial (magenta) e otimizados pelo MCR (azul) de a) Moxifloxacina, b) Intermediário A e c) Intermediário B.

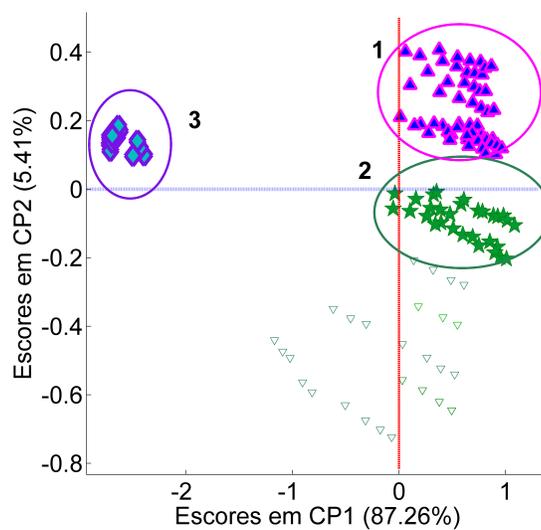


Figura 8.6: Gráfico PCA para o processo degradativo da moxifloxacina. Grupo 1: $t=0-10$ min, Grupo 2: $t= 12-20$ min, Grupo 3: $t=100-240$ min.

O grupo 2, corresponderia ao intermediário A, resolvido pelo MCR que parece estar presente entre 10 e 20 min de irradiação. Após os primeiros 20 min e até ≈ 80 min, não é observada nenhuma tendência de agrupamento e poderia haver uma mistura de intermediários que não são completamente resolvidos. Já para o grupo 3, a resposta espectral é de baixa intensidade e corresponde a tempo de irradiação após 100 min, onde a moxifloxacina está em menos do que 20% da sua concentração inicial. Para monitorar o processo degradativo foram utilizados somente a moxifloxacina e o intermediário A. Para avaliar a variação da concentração do composto inicial e do intermediário A durante o processo, foi construído o gráfico da Fig.8.7, com os valores da matriz **C**. Como observado, há uma diminuição próxima de 50% da concentração da moxifloxacina nos primeiros 60 min do processo, acompanhada da formação de um intermediário que atinge seu valor máximo em 50 min de fotólise para depois começar a se degradar, chegando à não detectabilidade no tempo $t=100$ min.

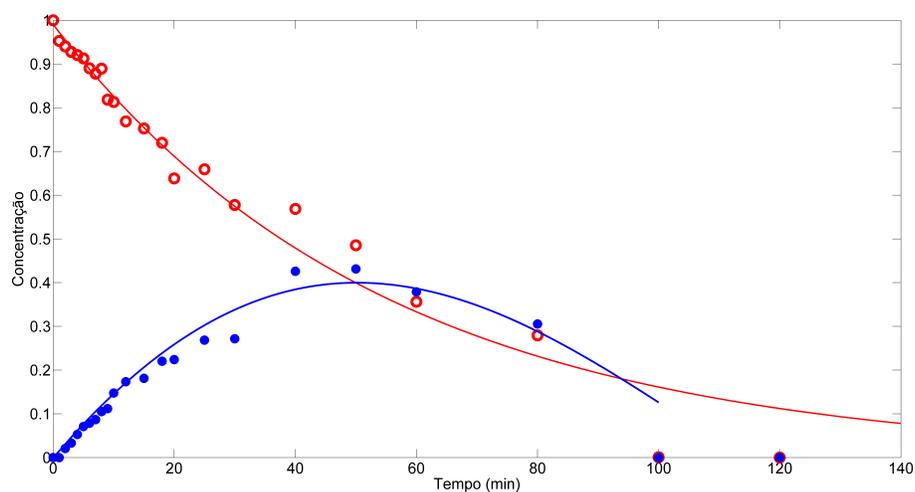


Figura 8.7: Perfís de concentração (normalizada) da moxifloxacina (vermelho) e o intermediário A (azul) em função do tempo. Valores recuperados pelo MCR.

O modelo cinético para o sistema foi postulado com base na regressão calculada para:

- C/C_0 versus tempo(t)
- $\ln(C/C_0)$ versus tempo(t)

Onde C e C_0 são as concentrações do analito em qualquer tempo, t e no tempo inicial, t_0 , respectivamente. O ajuste linear mostrou que a reação segue uma cinética de aparente primeira ordem com respeito à moxifloxacina, como observado na Fig.8.8.

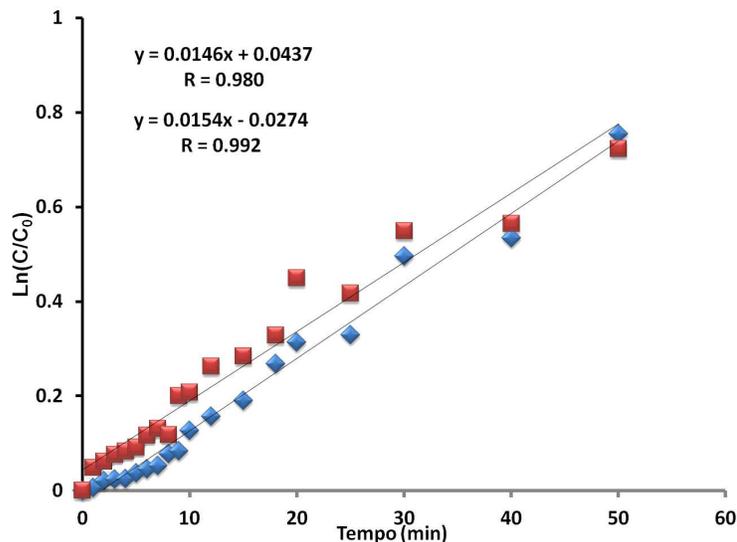


Figura 8.8: $\ln \frac{C}{C_0}$ versus t para a fotólise de moxifloxacina. Dados com matriz aumentada (verde) e pré-processados com segunda derivada (roxo).

A constante de velocidade k, foi calculada com base nos resultados do MCR para os espectros sem pré-processamento (com matriz aumentada) e com segunda derivada, a partir da inclinação da reta $\ln(C/C_0)$ versus t. Para os mesmos dados, foi calculado também o tempo de meia vida, $t_{1/2}$ segundo a Eq.8.1, resultando nos valores mostrados

na Tabela 8.2.

$$t_{1/2} = \ln 2/k \quad (8.1)$$

Tabela 8.2. Valores calculados de k e $t_{1/2}$ para a fotólise de moxifloxacina.

Pré-processamento dos espectros	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
Matriz aumentada	0,0146	47,5
Segunda derivada	0,0154	46,2

Foi observado que o valor de k calculado, se encontra dentro da faixa calculada por Van Doorslaer e colaboradores [94], quem para a degradação fotolítica de moxifloxacina a $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em $\text{pH} = 10,0$, calcularam os seguintes valores:

- $k = 0,006 \text{ min}^{-1}$, sob radiação UV-A
- $k = 0,058 \text{ min}^{-1}$, sob radiação UV-C

Algumas hipóteses sobre a natureza do intermediário podem ser formuladas com base nas diferenças observadas nas bandas espectrais dos intermediários resolvidos pelo MCR e a informação reportada na literatura. Mudanças observadas nas bandas entre 700 e 800 cm^{-1} (vibração simétrica da ligação $-\text{C}-\text{F}$) sugerem um processo de desfluorização, que está reportada como sua principal fotoreação [73, 95].

Foram também observadas mudanças em torno de $1260, 1630 \text{ cm}^{-1}$ (Fig.8.9), que correspondem às vibrações do grupo $-\text{COO}^-$, onde provavelmente houve um processo de descarboxilação. Outras variações visíveis no espectro dificilmente podem ser associadas com transformações da molécula devido à insuficiência de informação.

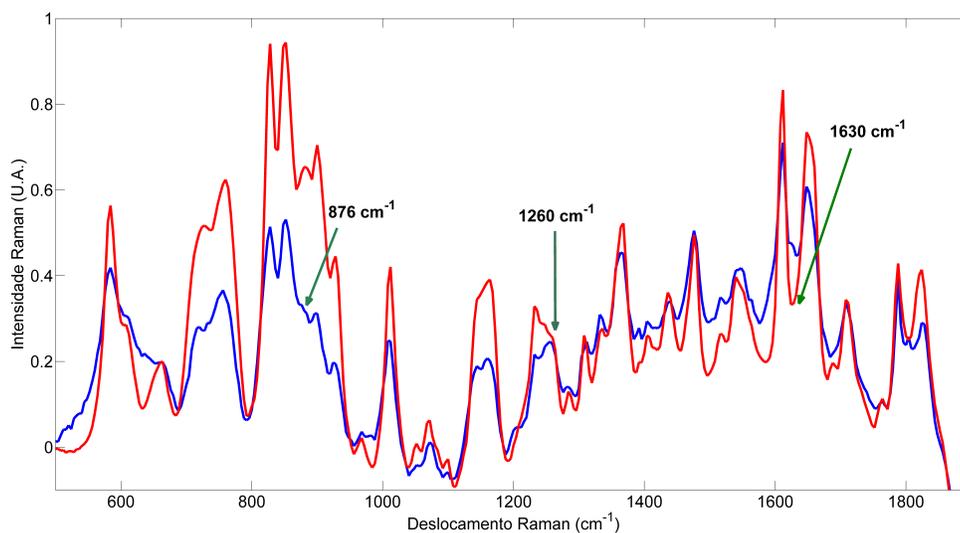


Figura 8.9: Espectros SERS da moxifloxacina (vermelho) e o intermediário A (azul) obtidos com SIMPLISMA.

As figuras de mérito para a determinação do antibiótico moxifloxacina são apresentadas na Tabela 8.3 onde é observado que mediante o presente procedimento, a quantificação da moxifloxacina é possível até a degradação do 96,4% da concentração inicial e sua detecção até o 98,8%, o qual significa que para o presente estudo, a concentração final do antibiótico sem degradar não é superior a $0,12 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 8.3. Figuras de mérito para a quantificação de moxifloxacina.

R	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	F_{LOF}/F_C
0,989	0,12	0,36	2,06/3,03

Já na construção da curva analítica da Fig.8.10, o valor do coeficiente R é inferior a 0,990, mas a avaliação da linearidade utilizando o test F_{LOF} mostrou que não houve falta de ajuste ao comportamento linear na faixa entre $0,00$ e $10,00 \mu\text{g mL}^{-1}$.

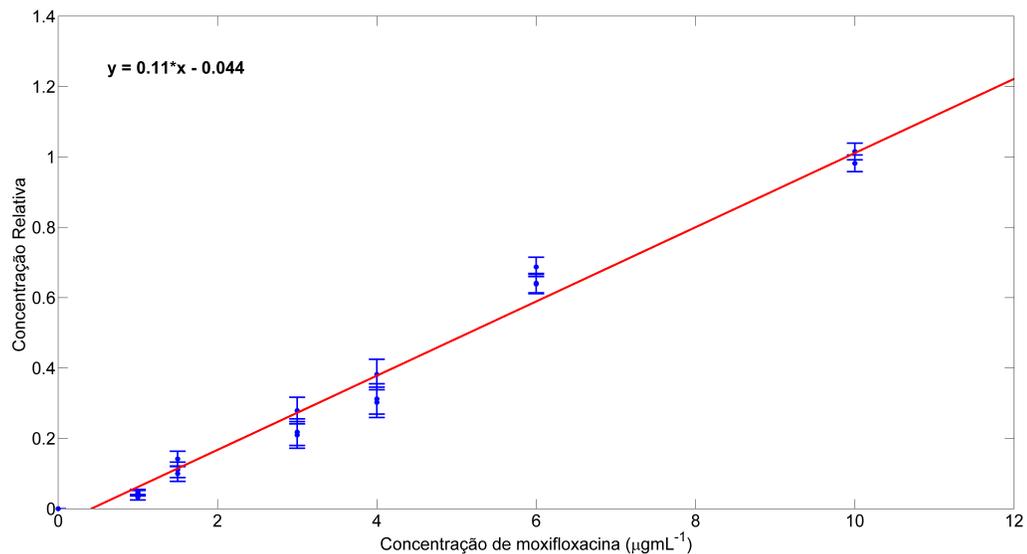


Figura 8.10: Curva analítica para a determinação de moxifloxacina em água.

8.4 Conclusões

O método MCR-ALS é uma ferramenta útil no monitoramento de sistemas multicomponente como um processo fotolítico de degradação, uma vez que permitiu isolar a resposta espectral do composto de partida e determinar a variação da sua concentração no tempo. O emprego dos algoritmos SVD e SIMPLISMA é uma alternativa interessante na recuperação do número de constituintes puros do espectro e na construção da estimativa inicial, respectivamente, tornando possível o estudo de processos químicos onde os espectros dos intermediários não são conhecidos ou sua aquisição envolve procedimentos experimentais adicionais e/ou complexos.

Por outro lado, a grande quantidade de informação fornecida pelo espectro SERS, permi-

tiu observar mudanças importantes que estão associadas com a rota degradativa e que permitiram confirmar as principais fotoreações do analito.

A possibilidade de extrair ou recuperar as concentrações relativas de uma dada espécie, no transcurso de um processo degradativo e o valor de LD atingido mediante o presente procedimento, fez possível detectar o composto inicial até que a degradação atingiu 98,8% do seu valor inicial.

Capítulo 9

CONCLUSÕES GERAIS

- A espectroscopia SERS mostrou-se como uma técnica promissora no campo da química analítica, uma vez que características tais como a sua alta detectabilidade, abundância de respostas espectrais, baixa interferência da água e facilidade na aplicação fazem com que seja uma opção atrativa frente a outras técnicas cujos procedimentos associados são de maior complexidade.
- Embora até o momento ainda não tenham sido desenvolvidos os substratos SERS ideais que garantam uma maior reprodutibilidade, diversas estratégias experimentais podem ser adotadas para melhorar esta propriedade que é o principal desafio da técnica quando são realizadas quantificações. Assim, por exemplo, para as aplicações onde foi utilizado ouro coloidal sintetizado no laboratório, houve estrito controle nas condições experimentais tanto de preparação quanto de armazenamento e para cada série de análises foi utilizado o mesmo colóide. Isto minimizou as variações provenientes do processo de fabricação dos substratos.

- A inclusão de ferramentas quimiométricas como parte essencial dos procedimentos analíticos aqui propostos permitiu minimizar drasticamente a complexidade experimental das metodologias, uma vez que foi possível isolar matematicamente as respostas das espécies de interesse ao utilizar a resposta instrumental completa nas determinações, em contraste com os métodos univariados usualmente empregados.
- A versatilidade dos procedimentos analíticos assistidos por algoritmos como MCR, SIMPLISMA, EFA foi corroborada nas aplicações apresentadas, onde foram realizadas duas quantificações em presença de interferentes e com eliminação do efeito de matriz; um processo dinâmico de degradação fotolítica e um estudo de distribuição gerando mapas químicos.
- Com a utilização de substratos sólidos nanoestruturados foram adquiridas imagens SERS, com as quais foi obtida informação química espacial, que além de quantificações permite realizar estudos de distribuição, abrindo novas possibilidades para a aplicação da técnica no interessante campo das imagens hiperespectrais.

Capítulo 10

PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora a espectroscopia SERS tenha se desenvolvido como uma solução à baixa intensidade dos sinais Raman, atraindo fortemente o interesse da comunidade científica, atualmente o maior desafio e limitação é ainda a reprodutibilidade das medidas, derivada das características físico-químicas dos sistemas metálicos nanoparticulados. Uma busca geral na base de dados Scopus com as palavras «SERS» e «*quantification*» gera 80 artigos, dos quais o 70 % foram publicados nos últimos três anos [96–99] e dos 17 artigos publicados em 2013, cinco deles fazem uso de ferramentas quimiométricas. Esta breve passagem pela literatura científica dos últimos três anos é um indicativo do quanto a técnica pode ser ainda aplicada em procedimentos que conduzam a determinações quantitativas que, quando assistidas por métodos multivariados, oferecem simplicidade nas metodologias e alta detectabilidade nos resultados. Amostras provenientes das áreas da biologia e farmácia podem ser estudadas com a técnica SERS, principalmente pela mínima interferência da água, comumente presente neste tipo de matrizes.

Outro campo de aplicação que pode ser amplamente aproveitado com a espectroscopia

SERS, é a imagem hiperespectral, de interesse para estudos de materiais de origem biológico ou farmacéutico porque permite análises de superfícies onde é importante avaliar propriedades como processos de distribuição de uma dada espécie em um tecido ou a homogeneidade de um princípio ativo em comprimidos farmacêuticos, por exemplo.

Referências Bibliográficas

- [1] Adar F, Delhaye M, and DaSilva E. Evolution of instrumentation for detection of the raman effect as driven by available technologies and by developing applications. *J Chem Educ*, (1):50–61, 2007.
- [2] Kneipp K. Surface-enhanced raman scattering. *Physics Today*, pages 40–46, 2007.
- [3] Sharma B, Frontiera RR, Henry AI, Ringe E, and Van Duyne P. Sers: Materials, applications, and the future. *Materials Today*, 15:16–25, 2012.
- [4] Mody VV, Siwale R, Singh A, and Mody HR. Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci*, (4):282–289, 2010.
- [5] Fan M, Andrade G F S, and Brolo A G. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. *Anal Chim Acta*, (693):7–25, 2011.
- [6] Evans SD, Freeman TL, Flynn TM, and Batchelder DN. Raman spectroscopy of self-assembled mono- and multilayer films of alkanethiolate on gold. *Thin Solid Films*, 244:778–783, 1994.
- [7] McGlashen ML, Guhathakurta U, Davis KL, and Morris MD. Sers microscopy: Laser illumination effects. *Appl Spectrosc*, 45(4):543–545, 1991.
- [8] Gough KM and Kaminskyj SGW. sftir, raman, and sers imaging of fungal cells. In *Vibrational Spectroscopic Imaging for Biomedical Applications*. McGraw Hill, New York, 2010.
- [9] Fujita K, Ishitobi S, Hamada K, Smith NI, Taguchi A, Inouye Y, and Kawata S. Time-resolved observation of surface-enhanced raman scattering from gold nanoparticles during transport through a living cell. *J Biomed Opt*, (14):02403871–02403877, 2009.

- [10] Ravindranath SP, Henne KL, Thompson DK, and Irudayaraj J. Surface-enhanced raman imaging of intracellular bio-reduction of chromate in *Shewanella oneidensis*. *PLoS ONE*, (6):e16634, 2011.
- [11] Lee M, Lee S, Lee J, Lim H, Seong GH, Lee EK, Chang SI, Oh CH, and Choo J. Highly reproducible immunoassay of cancer markers on a gold-patterned microarray chip using surface-enhanced raman scattering imaging. *Biosens Bioelectron*, (26):2135–2141, 2011.
- [12] Keren S, Zavaleta C, Cheng Z, de la Zerda A, Gheysens O, and Gambhir S. Non-invasive molecular imaging of small living subjects using raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci*, (105):5844–5849, 2008.
- [13] Zavaleta CL, Smith BR, Walton I, Doering W, Davis G, Shojaei B, Natan MJ, and Gambhir SS. Multiplexed imaging of surface enhanced raman scattering nanotags in living mice using noninvasive raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci*, (106):13511–13516, 2009.
- [14] Ruckebush C and Blanchet L. Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges. *Anal Chem Acta*, (765):28–36, 2013.
- [15] Long DA. Classical theory of rayleigh and raman scattering. In *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. John Wiley & Sons, Chichester,UK, 2002.
- [16] Laserna J J. *Modern Techniques in Raman Spectroscopy*. John Wiley and Sons, West Sussex, England, 1996.
- [17] Aroca R. *Surface-enhanced Vibrational Spectroscopy*. Ontario:John Wiley & Sons,Ltd, 2006.
- [18] Cialla D, Marz A, Bohme R, Theil F, Weber K, Schmitt M, and Popp J. Surface-enhanced raman spectroscopy (sers): progress and trends. *Anal Bioanal Chem*, 403(403):27–54, 2012.
- [19] García-Vidal FJ and Pendry JB. Collective theory for surface-enhanced raman-scattering. *Phys Rev Lett*, (77):1163–1166, 1996.
- [20] Willets KA and Van Duyne RP. Localized surface plasmon resonance spectroscopy

- and sensing. *Annu Rev Phys Chem*, (58):267–297, 2007.
- [21] Blackie E Le Ru EC, Meyer M, and Etchegoin PG. Surface enhanced raman scattering enhancement factors: A comprehensive study. *J Phys Chem C*, (111):13794–13803, 2007.
- [22] Hulteen JC, Treichel DA, Smith MT, and Duval ML. Nanosphere lithography: Size-tunable silver nanoparticle and surface cluster arrays. *J Phys Chem B*, (103):3854–3863, 1999.
- [23] Tauler R and de Juan A. Multivariate curve resolution. In *Practical Guide to Chemometrics*. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2006.
- [24] Antunes M C, Simão J E J, Duarte A C, and Tauler R. Multivariate curve resolution of overlapping voltammetric peaks: quantitative analysis of binary and quaternary metal mixtures. *Analyst*, (127):809–817, 2002.
- [25] Tauler R, Smilde A, and Kowalski B. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *J Chemom*, (9):31–58, 1995.
- [26] de Juan A and Tauler A. Multivariate curve resolution (mcr) from 2000: Progress in concepts and applications. *Crit Rev Anal Chem.*, (36):163–176, 2006.
- [27] Goicoechea H, Olivieri A C, and Tauler R. Application of the correlation constrained multivariate curve resolution alternating least-squares method for analyte quantitation in the presence of unexpected interferences using first-order instrumental data. *Analyst*, (135):636–642, 2010.
- [28] Lozano V A, Tauler R, Ibanez G A, and Olivieri A. Standard addition analysis of fluoroquinolones in human serum in the presence of the interferent salicylate using lanthanide-sensitized excitation-time decay luminescence data and multivariate curve resolution. *Talanta*, (77):1715–1723, 2009.
- [29] Peré-Trepat E, Lacorte S, and Tauler R. Alternative calibration approaches for lc-ms quantitative determination of coeluted compounds in complex environmental mixtures using multivariate curve resolution. *Anal Chim Acta*, (595):228–237, 2007.
- [30] Miller JN and Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson-Prentice Hall, New York, USA, 2005.

- [31] Olivieri A. Recent advances in analytical calibration with multi-way data. *Anal Methods*, (4):1876–1886, 2012.
- [32] Olivieri A. Analytical advantages of multivariate data processing. one, two, three, infinity? *Anal Chem*, (80):5713–5720, 2008.
- [33] Goicoechea H C, Olivieri A, and Tauler R. Application of the correlation constrained multivariate curve resolution alternating least-squares method for analyte quantitation in the presence of unexpected interferences using first-order instrumental data. *Analyst*, (135):636–642, 2010.
- [34] Culzoni MJ, Goicoechea HC, Ibañez GA, Lozano VA, Marsili NR, Olivieri AC, and Pagani AP. Second-order advantage from kinetic-spectroscopic data matrices in the presence of extreme spectral overlapping: A multivariate curve resolution-alternating least-squares approach. *Anal Chim Acta*, (9):31–58, 1995.
- [35] Danzer K and Currie L A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. part 1. fundamentals and single component calibration. *Pure Appl Chem*, (70):993–1014, 1998.
- [36] Hubaux A and Vos G. Decision and detection limits for linear calibration curves. *Anal Chem*, (8):849–855, 1970.
- [37] Saurina J, Leal C, Compañó R, Granados M, Dolors Prat M, and Tauler R. Estimation of figures of merit using univariate statistics for quantitative second-order multivariate curve resolution. *Anal Chim Acta*, (432):241–251, 2001.
- [38] Rodríguez-Cuesta MJ, Boqué R, and Rius X. Influence of selectivity and sensitivity parameters on detection limits in multivariate curve resolution of chromatographic second-order data. *Anal Chem Acta*, (467):111–122, 2003.
- [39] María José Rodríguez Cuesta. Limit of detection for second-order calibration methods, Rovira I Virgili University, Tarragona, ES, 2006.
- [40] Zachariassen CB, Larsen J, van den Berg F, Bro R, de Juan A, and Tauler R. Multi-way analysis for investigation of industrial pectin using an analytical liquid dilution system. *Chemom Intell Lab Syst*, (83):13–25, 2006.
- [41] Windig W and Guilment J. Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal Chem*,

(14):1425–1432, 1991.

- [42] Windig W, Lippert JL, Robbins MJ, Kresinske KR, and Twist JP. Interactive self-modeling multivariate analysis. *Chemom Intell Lab Syst*, (9):7–30, 1990.
- [43] Siepmann F, Siepmann J, Walther M, MacRae RJ, and Bodmeier R. Blends of aqueous polymer dispersions used for pellet coating: importance of the particle size. *J Control Release*, (105):226–239, 2005.
- [44] Sabin GP, Souza AM de, Breitzkreitz MC, and RJ Poppi. Development of an algorithm for identification and correction of spikes in raman imaging spectroscopy. *Quim Nova*, (3):612–615, 2012.
- [45] Zhang L and Henson MJ. A practical algorithm to remove cosmic spikes in raman imaging data for pharmaceutical applications. *Appl Spectrosc*, (61):1015–1020, 2007.
- [46] Behrend CJ, Tarnowski CP, and Morris MD. Identification of outliers in hyperspectral raman image data by nearest neighbor comparison. *Appl Spectrosc*, (56):1458–1461, 2002.
- [47] Feuerstein D, Parker KH, and Boutelle MG. Practical methods for noise removal: applications to spikes, nonstationary quasi-periodic noise, and baseline drift. *Anal Chem*, (81):4987–4994, 2009.
- [48] Rinnan A, van den Berg F, and Enggelsen SB. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Trends Anal Chem*, (10):1201–1221, 2009.
- [49] Otto A, Bruckbauer A, and Chen YX. On the chloride activation in sers and single molecule sers. *J Mol Struct*, (661-662):501–514, 2003.
- [50] Klarite^(R)-substrates for surface enhanced raman scattering. Application Note from Renishaw Diagnostics, 2010.
- [51] Jaumot J, Gargallo R, de Juan A, and Tauler R. A graphical user-friendly interface for mcr -als: a new tool for multivariate curve resolution in matlab. *Chemom Intell Lab Syst*, (76):101–110, 2005.
- [52] Zebin S, Gourlay SG, and Benowitz NL. Clinical pharmacology of nicotine. *Clin*

Dermatol, (16):557–564, 1998.

- [53] Hukkanen J, Jacob P, and Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*, (1):79–115, 2005.
- [54] Miller E I, Norris H K, Rollins D E, Tiffany S T, and Wilkins D G. A novel validated procedure for the determination of nicotine, eight nicotine metabolites and two minor tobacco alkaloids in human plasma or urine by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, (878):725–737, 2010.
- [55] Sastre J and van Kan H JM. Simultaneous determination of the tobacco smoke uptake parameters nicotine, cotinine and thiocyanate in urine, saliva and hair, using gas chromatography-mass spectrometry for characterisation of smoking status of recently exposed subjects. *Analyst*, (128):838–843, 2003.
- [56] Meger M, Meger-Kossien I I, Schuler-Metz A, Janket D, and Scherer G. Simultaneous determination of nicotine and eight nicotine metabolites in urine of smokers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*, (778):251–261, 2002.
- [57] Barber T E, List M S, Haas III J W, and Wachter E C. Determination of nicotine by surface-enhanced raman scattering (sers). *Appl Spectrosc*, (48):1423–1427, 1994.
- [58] Coser Gaudio A and Zandonade E. Proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. *Quim Nova*, (24):658–671, 2001.
- [59] Brunnemann K D and Hoffmann D. The ph of tobacco smoke. *Food Cosmet Toxicol*, (12):115–124, 1974.
- [60] Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, and Shakesheff KM. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev*, (99):3181–3198, 1999.
- [61] Dumitriu S. *Polymeric Biomaterials*. CRC Press, New York, USA, 2002.
- [62] Vasconcelos T, Sarmiento B, and Costa P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. *Drug Discovery Today*, (23/24):1068–1075, 2007.

- [63] Mansour HM, Sohn M, Al-Ghananeem A, and DeLuca PP. Materials for pharmaceutical dosage forms: molecular pharmaceuticals and controlled release drug delivery aspects. *Int J Mol Sci*, (11):3298–3322, 2010.
- [64] Al-Zoubi N, Koundourellis J E, and Malamataris S. Ft-ir and raman spectroscopic methods for identification and quantitation of orthorhombic and monoclinic paracetamol in powder mixes. *J Pharm Biomed Anal*, 3(403):459–467, 2002.
- [65] Alexandrino G.L and Poppi R. Nir imaging spectroscopy for quantification of constituents in polymers thin films loaded with paracetamol. *Anal Chim Acta*, (765):37–44, 2013.
- [66] Androine L, Canta S, and Cozar O. The paracetamol adsorption behaviour monitored by raman and surface-enhanced raman spectroscopy. *AIP Conf Proc*, 3(1131):191–196, 2008.
- [67] Lepp A and Siiman O. Surface resonance raman and surface-enhanced raman scattering excitation profiles for dabsyl aspartate on colloidal silver in ethanol. *J Phys Chem*, (89):3494–3502, 1985.
- [68] Borodko Y, Habas SE, Koebel M, Yang P, Frei H, and Somorjai GA. Probing the interaction of poly(vinylpyrrolidone) with platinum nanocrystals by uv-raman and ftir. *J Phys Chem B*, (110):23052–23059, 2006.
- [69] Tan X, Wang Z, Yang J, Song Ch, Zhang R, and Cui Y. *Nanotechnology*, (20):445102–445109, 2009.
- [70] Meyer N, Nestler K, Engisch L, Marx G, Fütting M, Kiesow A, Heilmann A, Wartewig S, and Kleinebudde P. Raman spectroscopic surface characterization of cellulose derivatives. *Fresenius J Anal Chem*, (370):789–791, 2001.
- [71] Kozielski M. Characterization of materials by raman scattering. *Acta Phys Pol A*, (111):343–360, 2007.
- [72] Schmitt-Kopplin Ph, Burhenne J, Freitag D, Spiteller M, and Kettrup A. Development of capillary electrophoresis methods for the analysis of fluoroquinolones and application to the study of the influence of humic substances on their photodegradation in aqueous phase. *J Chromatogr A*, (837):253–265, 1999.

- [73] Neugebauer U, Szeghalmi A, Schmitt M, Kiefer W, Popp J, and Holzgrabe U. Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones. *Spectrochim Acta A*, 61(7):1505–1517, 2005.
- [74] Stass H, Dalhoff A, Kubitzka D, and Schuhly U. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of ascending single doses of moxifloxacin, a new 8-methoxy quinolone, administered to healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother*, (42):2060–2065, 1998.
- [75] Von Keutz E and Schluter G. Preclinical safety evaluation of moxifloxacin, a novel fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother*, (43):91–100, 1999.
- [76] Boskurt B, Karakava G, and Kalvonku A F. *Allergol et Immunopathol*, (33):38–41, 2005.
- [77] Bauernfeind A. Comparison of the antibacterial activities of the quinolones bay 12-8039, gatifloxacin (am 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin. *J Antimicrob Chemother*, (40):639–651, 1997.
- [78] Vishwanathan K, Bartlett M G, and Stewart J T. *J Pharm Biomed Anal*, (30):961–968, 2002.
- [79] Lemoine T, Breilh D, Ducint D, Dubrez J, Jougon J, Velley JF, and Saux MC. Determination of moxifloxacin (bay 12-8039) in plasma and lung tissue by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection using a fully automated extraction method with a new polymeric cartridge. *J Chromatogr B*, (742):247–254, 2000.
- [80] Moller J G, Stab H, Heinig R, and Blaschke G. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence: a routine method to determine moxifloxacin in human body fluids in very small sample volumes. *J Chromatogr B*, (716):325–334, 1998.
- [81] Ocana J A, Barragán F J, and Callejón M. Spectrofluorimetric determination of moxifloxacin in tablets, human urine and serum. *Analyst*, 19(125):2322–2325, 2000.
- [82] Trindade G M A, Silva G M, and Ferreira V S. Determination of moxifloxacin in tablets and human urine by square-wave adsorptive voltammetry. *Microchem J*, (81):209–216, 2005.
- [83] Mizutani Y, Kamogawa K, and Nakanishi K. *J Phys Chem*, (93):5650–5654, 1989.
- [84] Wise R, Andrews J M, Marshall G, and Hartman G. *Antimicrob Agents Chemother*,

(43):1508–1510, 1999.

- [85] Lorenzo F, Navaratnam S, Edge R, and Allen N. Formation of secondary triplet species after excitation of fluoroquinolones in the presence of relatively strong bases. *Photochem Photobiol*, (84):1118–1125, 2008.
- [86] Sievers M. Advanced oxidation processes. In *Treatise on Water Science*. Elsevier, Oxford, 2011.
- [87] Legrini O, Oliveros E, and Braun M. Photochemical processes for water treatment. *Chem Rev*, (93):671–698, 1993.
- [88] Sharma S, Ruparelia JP, and Patel ML. A general review on advanced oxidation processes for waste water treatment. *Int Conf Curr Trends Tech Nuicone*, pages 481–488, 2011.
- [89] Pera-Titus M, García-Molina V, Baños MA, Gimenez J, and Esplugas S. Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review. *Appl Catal B*, (4):219–256, 2004.
- [90] Burhenne J, Ludwig M, Nikoloudis P, and Spiteller M. Photolytic degradation of fluoroquinolone carboxylic acids in aqueous solution. *Environ Sci & Pollut*, (1):10–15, 1997.
- [91] Sturini M, Speltini A, Maraschi F, Profumo A, Pretali L, Fasani E, and Albinì A. Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural waters. *Environ Sci Technol*, (44):4564–4569, 2010.
- [92] Hubicka U, Krzek J, Zuromska B, Walczak M, Zylewski M, and Pawlowski D. Determination of photostability and photodegradation products of moxifloxacin in the presence of metal ions in solutions and solid phase. kinetics and identification of photoproducts. *Photochem Photobiol Sci*, (11):351–357, 2012.
- [93] Melissa Roma, Marc Weller, and Samantha Wentzell. Removal of ciprofloxacin from water using adsorption, UV photolysis and UV/H₂O₂ degradation, Worcester Polytechnic Institute, Worcester, MA, 2011.
- [94] Van Doorslaer X, Demeestere K, Heynderickx P M, Van Langenhove H, and Dewulf J. TiO₂ mediated heterogeneous photocatalytic degradation of moxifloxacin: operational

variables and scavenger study. *Appl Catal B-Environ*, (111):150–156, 2012.

- [95] Albini A and Monti S. Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones. *Chem Soc Rev*, 19(32):238–250, 2003.
- [96] Stewart A and Bell SEJ. Modification of ag nanoparticles with mixed thiols for improved sers detection of poorly adsorbing target molecules: detection of mdma. *Chem Commun*, (47):4523–4525, 2011.
- [97] Chen Y, Wu L, Chen Y, Bi N, Zheng X, Qi H, Quin M, Liao X, Zhang H, and Tian Y. Determination of mercury(ii) by surface-enhanced raman scattering spectroscopy based on thiol-functionalized silver nanoparticles. *Microchim Acta*, (3-4):341–348, 2012.
- [98] Mabbot S, Correa E, Cowcher DP, Allwood JW, and Goodacre R. Optimization of parameters for the quantitative surface-enhanced raman scattering detection of mephedrone using a fractional factorial design and a portable raman spectrometer. *Anal Chem*, (85):923–931, 2013.
- [99] Tsoutsis D, Montenegro JM, Dommershausen F, Koert U, Liz-Marzán LM, Parak WJ, and Alvarez-Puebla RA. Quantitative surface-enhanced raman scattering ultradetection of atomic inorganic ions: The case of chloride. *ACS Nano*, (5):7539–7546, 2011.