

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

**CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS
PARASITOS CAUSADORES DA LEISHMANIOSE**

ADRIANO LUIZ DE QUEIROZ

ORIENTADORA: PROF.ª DR.ª RAINA AUGUSTA DA SILVA

COORIENTADOR: PROF. DR. SYDNEI MAGNO DA SILVA

Uberlândia - MG
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

**CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS
PARASITOS CAUSADORES DA LEISHMANIOSE**

ADRIANO LUIZ DE QUEIROZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Física.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Raigna Augusta da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva

Área de concentração: Física da matéria condensada.

Uberlândia - MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

Q38c Queiroz, Adriano Luiz de, 1990-
2018 Caracterização espectroscópica dos parasitos causadores da
leishmaniose / Adriano Luiz de Queiroz. - 2018.
92 f. : il.

Orientadora: Raigna Augusta da Silva.
Coorientador: Sydnei Magno da Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Física.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1126>
Inclui bibliografia.

1. Física - Teses. 2. Espectroscopia Raman - Teses. 3. Ácido
desoxirribonucleico - Teses. 4. Leishmania - Teses. I. Silva, Raigna
Augusta da. II. Silva, Sydnei Magno da. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.

CDU: 53

Maria Salete de Freitas Pinheiro – CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA



ADRIANO LUIZ DE QUEIROZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física, do Instituto de Física, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física.

Uberlândia, 23 de Abril de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Raigna Augusta da Silva
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Prof. Dr. Diego Merigue da Cunha
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Prof. Dr. Rafael Pinto Vieira
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

*Dedico esta à Deus, aos meus pais,
à minha avó e à minha orientadora.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir que eu desse início e conseguisse terminar essa empreitada.

Aos meus pais, irmãos, avó e amigos por darem apoio nos momentos difíceis que passei durante esse projeto.

Aos meus companheiros do grupo GEM, Estácio, Júlio, Fernando, Silésia, Diego, Pedro, Danilo, por proporcionarem momentos de descontração, de troca de ideias e de conhecimento durante nosso tempo juntos. Em especial ao Diego, pelo tempo que gastamos preparando as amostras, fazendo medições nos laboratórios e pelas conversas aleatórias sobre tudo.

Agradeço imensamente à professora Dr.^a Raigna por todo o apoio e incentivo dado durante esse tempo, que sem ela com certeza esse trabalho seria impossível de ser concluído.

Ao professor Dr. Sydnei que gentilmente nos cedeu um pouco de seu tempo e de amostras para o nosso trabalho.

Ao professor Dr. Noélio por nos ceder espaço no seu laboratório para fazermos as medições do nosso material.

Ao técnico Guilherme pela ajuda durante todo o longo e lento tempo de duração para a aquisição de dados.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Física pela paciência comigo, ao Instituto de Física, ao Instituto de Ciências Biomédicas e a Universidade Federal de Uberlândia, pela infraestrutura disponibilizada nessa Dissertação de Mestrado.

Por fim, agradeço as Agências de Fomento, que permitiram a realização dessa Dissertação de Mestrado, à CAPES pela Bolsa de Pós-Graduação, ao CNPq e a Fapemig.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Este trabalho diz respeito ao estudo de seis espécies de parasitos do gênero *Leishmania* causadores das doenças Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). Essas espécies foram caracterizadas por Espectroscopia Raman, através dos seus Ácidos Desoxirribonucleicos – do inglês – DNA. As espécies *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. donovani* e *L. major* apresentam nos espectros vibracionais formas de linhas semelhantes, diferindo apenas em largura de linha e intensidade do sinal espalhado.

Nesse estudo foi feito uma tentativa de atribuição dos modos vibracionais correspondentes às bases constituintes dos DNA's (Citosina – C, Guanina – G, Timina – T e Adenina – A); e em seguida, o agrupamento das espécies de *Leishmania*, em dois grupos: Grupo I – *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, e Grupo II – *L. infantum*, *L. donovani* e *L. major*. As espécies do Grupo I são responsáveis pela doença LTA e as espécies do Grupo II são responsáveis pela doença LV. Além disso, com relação à intensidade relativa das bandas vibracionais, pudemos inferir sobre a origem das espécies; sendo que a *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. infantum* são originadas do Novo Mundo – Américas; e as espécies *L. donovani* e *L. major* são originadas do Velho Mundo – Europa e Ásia.

Palavras-chave: *Leishmania*, Leishmaniose, DNA, Raman.

ABSTRACT

This work is related to the study of six species of the genus *Leishmania* parasites that cause American Tegumentary Leishmaniasis (LTA) and Visceral Leishmaniasis (LV). These species were characterized by Raman Spectroscopy, through their Deoxyribonucleic Acids, DNAs. The species *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. donovani* and *L. major* present in its vibrational spectra similar lines, differing only in line width and scattered signal intensity.

In this study, an attempt was made to assign the corresponding vibrational modes to the constituent bases of the DNAs (Cytosine - C, Guanine - G, Thymine - T and Adenine - A) and we put together the *Leishmania* species into two groups: Group I – *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. guyanensis*, and Group II – *L. infantum*, *L. donovani* and *L. major*. The species of Group I are responsible for LTA diseases and the species of Group II are responsible for LV diseases. Moreover, with respect to the relative intensity of the vibrational bands, we could infer about the origin of the species; *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and *L. infantum* originate from the New World – Americas; and the species *L. donovani* and *L. major* originate from the Old World - Europe and Asia.

Keywords: *Leishmania*, Leishmaniasis, DNA, Raman.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos constituintes do DNA, sendo eles o fosfato, o açúcar desoxirribose e as bases nitrogenadas: a) Timina; b) Citosina; c) Adenina; d) Guanina. Fonte: DE ROBERTIS, 2006.....17

Figura 2 - a) Modelo simplificado mostrando a estrutura helicoidal do DNA. Os bastões representam pares de bases, e fitas representam os arcabouços açúcar-fosfato das duas cadeias. b) Diagrama químico preciso da dupla hélice de DNA, desenrolado para mostrar os arcabouços açúcar-fosfato (azul) e degraus de pares de bases (rosa). Os arcabouços correm em sentidos opostos; as pontas 5' e 3' são denominadas pela orientação dos átomos de carbono 5' e 3' dos anéis de açúcar. Cada par de bases tem uma base purina (A ou G) e uma base pirimidina (T ou C), conectadas por ligações de hidrogênio (linhas tracejadas). Fonte: GRIFFITHS, 2008.....18

Figura 3 - Na replicação do DNA novos nucleotídeos (amarelo) são polimerizados para formar cadeias-filhas, usando nucleotídeos da dupla hélice original (azul) como molde. S – açúcar, P – grupo fosfato. Fonte: GRIFFITHS, 2008.....20

Figura 4 - Disposição das organelas presentes nas duas formas encontradas de *Leishmania*. a) Amastigota; b) Promastigota. Adaptado da Fonte: AGUIAR, 2016.....22

Figura 5 - Ciclo de vida da *Leishmania*. Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.....24

Figura 6 - Estado de endemicidade mundial da leishmaniose visceral, em 2015. Fonte: WHO, 2017.....25

Figura 7 - Estado de endemicidade mundial da leishmaniose cutânea, em 2015. Fonte: WHO, 2017.....26

Figura 8 - Casos de leishmanioses visceral por município de infecção. Fonte: SVS, 2016....26

Figura 9 - Incidência de leishmaniose cutânea e mucosa no Brasil. Fonte: PAHO, 2017.....27

Figura 10 - Onda eletromagnética que se propaga na direção x . Fonte: HOLLER, 2009.....28

Figura 11 - Características intrínsecas de uma onda. Fonte: HOLLER, 2009.....28

Figura 12 - Emissão e absorção de energia. Fonte: FERRARO, 2003.....29

Figura 13 - Relação entre faixas de radiações eletromagnéticas e exemplos de fontes. Fonte: <http://www.novafisica.net/projetos/microondas/conteudo.html>.....30

Figura 14 - Níveis de energia discriminados. Fonte: FERRARO, 2003.....31

Figura 15 - Esquema de uma molécula diatômica, constituídas por massas m_1 e m_2 , ligadas por uma mola com constante de mola k . Fonte: SALA, 2008.....35

Figura 16 - Esquema dos mecanismos de espalhamento. Fonte: SALA, 2008.....43

Figura 17 - Ilustração de uma molécula de CO ₂ e uma molécula de H ₂ O, respectivamente, para representar moléculas triatômicas lineares e não lineares. Fonte: CHALMERS, 2002 ..	45
Figura 18 - Modos vibracionais de estiramento simétrico, estiramento assimétrico e flexão. Fonte: https://www.slideshare.net/RaajMathur/department-of-chemistry-institute-of-basic-sciences ..	45
Figura 19 - Modos vibracionais de deformação no plano e fora do plano. Fonte: https://www.slideshare.net/RaajMathur/department-of-chemistry-institute-of-basic-sciences ..	45
Figura 20 - Método de Extração do DNA. Adaptado da fonte: MACHEREY-NAGEL, 2014.	49
Figura 21 - Sistema operacional do AFM. Fonte: SHIMADZU, 2006.	50
Figura 22 - Diagrama esquemático do espectrômetro Raman. Fonte: ARMOND, 1999.....	51
Figura 23 - Gel de poliacrilamida 6% demonstrando o produto da PCR realizada em DNA extraído de cultura axênica de <i>L. donovani</i> (<i>L.d.</i>); <i>L. infantum</i> (<i>L.i.</i>); <i>L. major</i> (<i>L.m.</i>); <i>L. braziliensis</i> (<i>L.b.</i>); <i>L. amazonensis</i> (<i>L.a.</i>) e <i>L. guyanensis</i> (<i>L.g.</i>). PM – Marcador de peso molecular.....	55
Figura 24 - Espectro de absorção óptica da espécie <i>L. amazonensis</i> e sua relação A ₂₆₀ /A ₂₈₀ ..	55
Figura 25 - Imagem topográfica via AFM da espécie <i>L. infantum</i>	56
Figura 26 - Imagem de fase via AFM da espécie <i>L. infantum</i>	57
Figura 27 - Espectros Raman para as seis espécies de <i>Leishmania</i> . a) <i>L. amazonensis</i> ; b) <i>L. braziliensis</i> ; c) <i>L. guyanensis</i> ; d) <i>L. infantum</i> ; e) <i>L. major</i> ; f) <i>L. donovani</i> . Região de 50 a 4000 cm ⁻¹ . Excitação do laser 325 nm, 532 nm, 633 nm e 785 nm.	58
Figura 28 - Ajustes com lorentzianas para a região entre 50 e 890 cm ⁻¹ para as seis espécies de <i>Leishmania</i>	60
Figura 29 - Partes do DNA com os principais modos vibracionais na região 890 a 1190 cm ⁻¹ . Adaptado de http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg ..	61
Figura 30 - Ajustes com lorentzianas para a região entre 890 e 1190 cm ⁻¹ para as seis espécies de <i>Leishmania</i>	62
Figura 31 - Partes do DNA com os principais modos vibracionais na região 890 a 1190 cm ⁻¹ . Adaptado de http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg ..	62
Figura 32 - Ajustes com lorentzianas para a região entre 1190 e 1890 cm ⁻¹ para as seis espécies de <i>Leishmania</i>	63
Figura 33 - Partes do DNA com os principais modos vibracionais na região 890 a 1190 cm ⁻¹ . Adaptado de http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg ..	64

Figura 34 - Ajustes com lorentzianas para a região entre 1890 e 4000 cm ⁻¹ para as seis espécies de <i>Leishmania</i>	65
Figura 35 - Razão I ₁₆₅₀ /I ₁₀₉₀ para as seis espécies de <i>Leishmania</i>	68
Figura 36 - Região de ligações duplas do carbono: C=C, C=N e C=O para as seis espécies de <i>Leishmania</i>	69
Figura 37 - Variação do deslocamento Raman para cada espécie de <i>Leishmania</i>	70
Figura 38 - Intensidade (a), variação de deslocamento Raman (b) e relação de áreas (c) das lorentzianas em 1630 cm ⁻¹ , 1654 cm ⁻¹ e 1686 cm ⁻¹ , para cada espécie de <i>Leishmania</i> ..	70
Figura 39 - Separação entre os tipos infecciosos de <i>Leishmania</i>	71
Figura 40 - Representação das bases constituintes do DNA. Fonte: http://3.bp.blogspot.com/-3v-9gwj0bPA/TWRdM8IIQI/AAAAAAAAlw/MmFZuQzPkzg/s1600/bases+nitrogenadas.jpg	72
Figura 41 - Comportamento das ligações duplas presentes nos DNAs das espécies de <i>Leishmania</i>	72
Figura 42 - Comportamento exponencial das ligações duplas presentes nos DNAs das espécies de <i>Leishmania</i> . a) C=C; b) C=N e c) C=O.....	73
Figura 43 - Razão I ₈₀₆ /I ₁₀₈₅ para as seis espécies de <i>Leishmania</i>	74
Figura 44 - Representação do emparelhamento das bases T, A, C e G.....	74
Figura 45 - Razão I ₁₃₀₀ /I ₁₃₅₀ para as seis espécies de <i>Leishmania</i>	75
Figura 46 - Funções de onda do oscilador harmônico. Fonte: SALA, 2008	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração e relação “ótima” para as seis espécies de <i>Leishmania</i>	54
Tabela 2 - Deslocamento Raman para as espécies de <i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. major</i> e a tentativa de atribuição dos modos de vibração, comparados com a literatura.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

DNA – Deoxyribonucleic Acid

C – Citosina

G – Guanina

T – Timina

A – Adenina

SERS – Surface Enhancement Raman Spectroscopy

OMS – Organização Mundial de Saúde

µm – Micrômetro

LC – Leishmaniose Cutânea

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

WHO – World Health Organization

SVS – Secretaria de Vigilância da Saúde

λ – Comprimento de onda

ν – Frequência

c – Velocidade da luz

κ – Número de onda

cm – Centímetro

E – Energia

h – Constante de Planck

ΔE – Variação de energia

ω – Frequência angular

\hbar - Constante de Planck normalizada por 2π

E_{tot} – Energia total

E_{ele} – Energia eletrônica

E_{vib} – Energia vibracional

E_{rot} – Energia rotacional

N – Número de átomos

m – massa

k – Constante de mola

F – Força

Δx – Deslocamento

$\Delta \ddot{x}$ – Derivada segunda em relação ao tempo do deslocamento

t – tempo

cos – Cosseno

sen – Seno

A e ***B*** – Constantes

ϕ – Fase

x_0 – Posição inicial

T – Energia cinética

V – Energia potencial

$\Delta \dot{x}$ – Derivada primeira em relação ao tempo do deslocamento

L – Lagrangeana

μ - Massa reduzida

H - Hamiltoniana

\hat{p} – Operador momento

i – Número complexo

q – Coordenada interna

Ψ – Função de onda

\vec{P} – Vetor dipolo induzido

α – Polarizabilidade da molécula

\vec{E} – Vetor campo elétrico

ν_v – Frequência vibracional

ν_0 – Frequência da radiação incidente

I_A – Intensidade anti-Stokes

I_S – Intensidade Stokes

C – Carbono

O – Oxigênio

H – Hidrogênio

ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

μl – Microlitro

T1, B3, BW, B5 e BE – Tampões químicos

K – Proteinase

°C – Grau Celsius

rpm – Rotações por minuto

ml – Mililitro

AFM – Atomic Force Microscope

UV – Ultravioleta

CCD – Charge Coupled Device

nm – Nanômetro

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

ng – Nanograma

N – Nitrogênio

PO₂⁻ – Fosfato

ρ – Modos angulares

δ – Deformação

vs – Estiramento simétrico

vas – Estiramento assimétrico

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Fundamentação Biológica	16
2.1.1 O Ácido Desoxirribonucleico (DNA).....	16
2.1.2 Leishmaniose	21
2.1.2.1 Morfologia	22
2.1.2.2 Ciclo de vida	23
2.1.2.3 Epidemiologia	24
2.2 Fundamentação Física	27
2.2.1 Radiação e espectro eletromagnético.....	27
2.2.2 Espectroscopia Raman	31
2.2.2.1 Modelo clássico.....	33
2.2.2.2 Modelo quântico.....	39
2.2.2.3 Espectro Raman	40
2.2.2.4 Modo normais de vibração.....	44
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 Parasitos.....	47
3.2 Método de extração do DNA.....	47
3.3 Microscopia de força atômica	49
3.4 Espectrômetro Raman.....	51
3.5 Descrição da montagem do material	52
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
4.1 Determinação da relação A _{260 nm} /A _{280 nm}	54
4.2 Imagem de AFM do parasito <i>L. infantum</i>	56
4.3 Caracterização Raman	57
4.3.1 Região I – 50 a 890 cm ⁻¹	60
4.3.2 Região II – 890 a 1190 cm ⁻¹	61
4.3.3 Região III – 1190 a 1890 cm ⁻¹	62

4.3.4 Região IV – 1890 a 4000 cm ⁻¹	63
4.3.5 Região de ligações duplas entre carbono e carbono; oxigênio; nitrogênio C=(C, O, N)	69
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE A	84

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A espectroscopia Raman é um método espectroscópico baseado no espalhamento inelástico da luz monocromática por uma determinada amostra. Durante o processo, o fóton transfere energia para a amostra (Stokes) ou recebe energia dela (anti-Stokes). Esta diferença de energia do fóton espalhado corresponde às transições vibracionais ou rotacionais do material em questão. As informações obtidas a partir dos níveis vibracional e rotacional da amostra permitem o estudo de sua estrutura. Assim, a espectroscopia Raman é usada para identificar uma grande variedade de produtos químicos^[1-4] e existem bases de dados contendo espectros de referência de diferentes materiais^[5,6]. Esta técnica espectroscópica é amplamente utilizada no estudo de materiais biológicos, como por exemplo, proteínas^[7,8], DNA^[9-12] e cromossomos^[13]. Com esta técnica obtém-se informação valiosa sobre a composição química, a estrutura secundária presente nas macromoléculas e o envolvimento químico de subunidades específicas^[14].

Entre as diferentes modalidades da técnica de espectroscopia Raman^[15], foi escolhida para este trabalho a espectroscopia micro-Raman, que consiste de um espectrômetro Raman especialmente projetado e integrado com um microscópio óptico, seja este para focalizar o feixe na amostra ou seja para coletar a radiação espalhada por ela, permitindo adquirir espectros Raman de amostras microscópicas ou áreas microscópicas de amostras maiores. As vantagens são que muito menos amostras são necessárias e certos efeitos também podem ser melhorados em regiões muito localizadas.

Uma vez que essa técnica se mostrou uma ferramenta muito promissora para identificar propriedades fundamentais, como por exemplo a estrutura molecular, eletrônica, ótica, etc, características e únicas para cada amostra, isto é, atuando como “impressões digitais” para cada amostra. O seu sucesso tem sido fortemente impulsionado pelo desenvolvimento de métodos

de análise de dados específicos que permitem obter informações importantes dos espectros Raman de amostras complexas, tais como tecidos, fluidos e tumores humanos^[16]. Além disso, a espectroscopia Raman intensificada pela superfície (Surface Enhancement Raman Spectroscopy – SERS) foi combinado com a configuração micro-Raman para melhorar a resposta do sinal a partir das amostras de DNA^[10,14].

O DNA é uma molécula grande com uma estrutura helicoidal dupla bem conhecida (Figura 2). É constituída por duas cadeias unidas por ligações de hidrogênio entre as bases. A "espinha dorsal" de cada vertente consiste em grupos alternados de açúcar e fosfato. O açúcar envolvido é a desoxirribose. Anexo a esta estrutura estão quatro bases, cuja sequência específica o código genético. Duas das bases são grupos de anel único (pirimidinas), chamadas timina e citosina, enquanto as outras duas bases são grupos de anel duplo (purinas), chamadas adenina e guanina. As bases em sequências opostas devem ser complementares: adenina com timina, e guanina com citosina^[17-20].

Como o DNA é o responsável por conter toda a informação genética necessária para o desenvolvimento e replicação das células dos organismos, utilizaremos esse fato para analisar e estudar o parasito causador da leishmaniose através do seu DNA.

A leishmaniose é um complexo de doenças de grande abrangência mundial. Dentre as suas ações e tipos, podemos citar a leishmaniose visceral (LV), que é endêmica em 79 países, com cerca de 500 mil novos casos notificados anualmente; dos quais 90% estão concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Sudão do Sul, Bangladesh e Brasil (sendo este último, responsável por aproximadamente 95% dos casos nas Américas)^[21]. Sua importância levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a incluí-la entre as seis doenças consideradas prioritárias no programa de controle da referida instituição^[22]. Apesar disso, as doenças causadas pelos parasitos do gênero *Leishmania* ainda são negligenciadas. Isso se deve ao fato de afetar, na sua maioria, pessoas em situação de vulnerabilidade socioeconômica.

A infecção humana é causada por cerca de 21 das 30 espécies de *Leishmania* descritas. No Brasil, atualmente, são encontradas oito espécies de *Leishmania*, das quais, sete causam a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e uma que causa a LV. As responsáveis pela LTA, que provoca úlceras na pele e mucosas, são compostas por uma espécie do subgênero *Leishmania* e seis do subgênero *Vianna*, sendo elas: a *L. (L.) amazonensis*, a *L. (V.) braziliensis*, a *L. (V.) guyanensis*, a *L. (V.) lainsoni*, a *L. (V.) naiffi*, a *L. (V.) shawi* e a *L. (V.) lindenberg*, das quais, as três primeiras são as mais importantes^[23]. Por último temos a LV, doença infecciosa sistêmica, caracterizada por febre de longa duração, aumento do fígado e baço, perda de peso, fraqueza, redução da força muscular, anemia e outras manifestações, a qual é causada

pela espécie *L. (L.) infantum*^[24]. Esta última é a forma mais agressiva da doença, fatal se não diagnosticada e tratada em tempo hábil.

Neste trabalho analisamos o DNA de seis parasitos causadores de leishmaniose com o intuito de discriminá-los, sua estrutura e componentes, a fim de caracterizá-las, identificá-las e separá-las umas das outras, já que uma substância submetida à espectroscopia Raman nos informa suas “impressões digitais”, com as quais, esperamos montar um banco de dados para identificar de qual espécie é o parasito que está causando a leishmaniose.

Capítulo 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fundamentação Biológica

2.1.1 O Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

O surgimento de novas células é o resultado de grandes números de divisões celulares, e essas células se diferenciam umas das outras tanto morfológica quanto bioquimicamente a fim de atender a uma variedade de funções, tornando-se, por exemplo, células sanguíneas, nervosas, musculares e secretoras. Desde sua formação, o zigoto contém a informação que especifica a sequência das etapas de seu desenvolvimento e as propriedades biológicas do organismo, que são o produto final desse desenvolvimento. Dentre essas propriedades, podemos citar a diversidade de estrutura; capacidade de se replicar; mutabilidade; e tradução^[25].

A estrutura dos organismos e seus ativos processos fisiológicos são baseados, na maior parte, em proteínas. A informação genética para a síntese dessas proteínas pelas células está contida no ácido desoxirribonucleico (DNA). O DNA é constituído, principalmente, por desoxirribonucleotídeos, cada um composto por um grupo fosfato ligado a um açúcar desoxirribose, que se liga a uma base nitrogenada de dois anéis (purinas) ou de apenas um anel (pirimidinas)^[26]. Uma molécula de DNA é feita de duas fitas enroladas uma na outra, em uma longa dupla hélice. Cada uma das duas fitas consiste em uma estrutura feita de cópias repetidas de cada grupo açúcar-fosfato ao longo da estrutura. As bases nitrogenadas encontradas nos ácidos nucléicos são também de dois tipos: pirimidinas e purinas. As pirimidinas possuem um anel heterocíclico, enquanto as purinas têm dois anéis fundidos entre si^[27]. No DNA, as

pirimidinas são a timina (T) e a citosina (C); e as purinas são a adenina (A) e a guanina (G), conforme Figura 1.

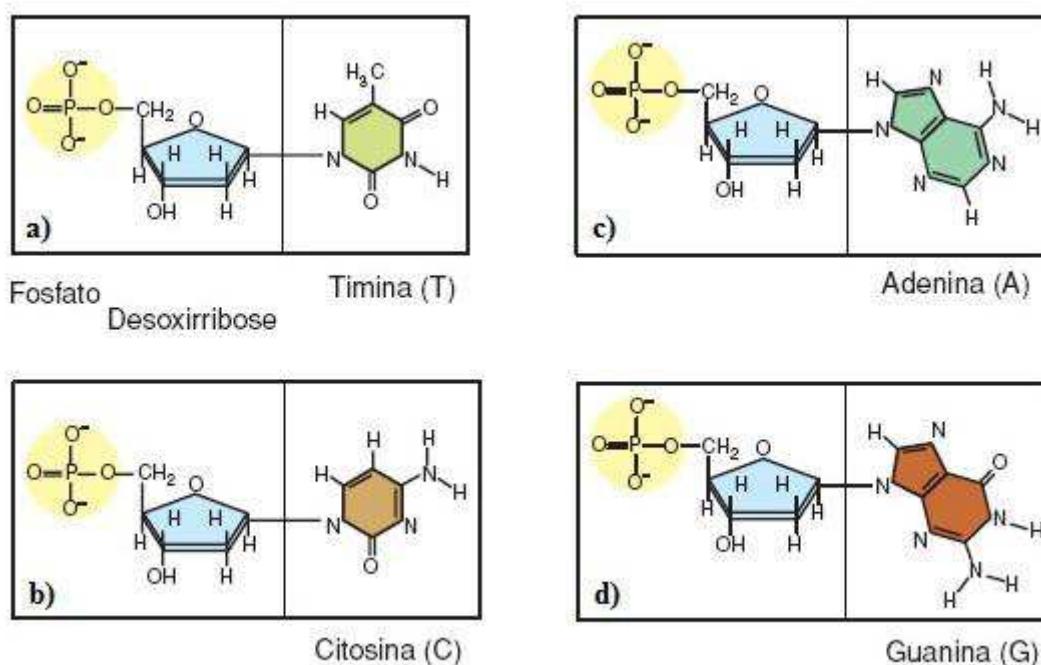


Figura 1 - Representação esquemática dos constituintes do DNA, sendo eles o fosfato, o açúcar desoxirribose e as bases nitrogenadas: **a)** Timina; **b)** Citosina; **c)** Adenina; **d)** Guanina. **Fonte:** DE ROBERTIS, 2006.

Em 1953, James Watson (geneticista microbiano americano) e Francis Crick (físico inglês) descobriram a estrutura do DNA. A estrutura tridimensional decifrada por Watson e Crick é composta de duas cadeias lado a lado (“fitas ou filamentos”) de nucleotídeos torcidos na forma de uma dupla hélice. As duas fitas de nucleotídeos são mantidas juntas por ligação de hidrogênio entre as bases de cada fita, formando uma estrutura como uma escada em espiral; como mostra a Figura 2a). O arcabouço de cada fita é formado de unidades alternadas de fosfato e desoxirribose que são conectadas por ligações fosfodiéster, Figura 2b). Na molécula em dupla hélice, a estrutura está por fora da hélice, enquanto cada base nucleotídica projeta-se para dentro e faz par com a fita oposta. Os átomos de carbono nas bases têm números para facilitar a referência. Os átomos de carbono no grupo açúcar também têm números. Nesse caso, o número é seguido de um primo (1', 2', e assim por diante).

Podemos usar essas ligações para descrever como uma cadeia de nucleotídeos é organizada. Os átomos de carbono das desoxirriboses são numerados de 1' a 5'. Uma ligação fosfodiéster conecta o átomo de carbono 5' de uma desoxirribose ao átomo de carbono 3' da desoxirribose adjacente. Assim, cada ligação açúcar-fosfato é dita como tendo uma polaridade

5' para 3', ou sentido 5' para 3'. A compreensão dessa polaridade é essencial na compreensão de como o DNA desempenha suas funções. Na molécula bifilamentar de DNA, os dois arcabouços estão em orientação oposta, ou em polaridade inversa^[25].

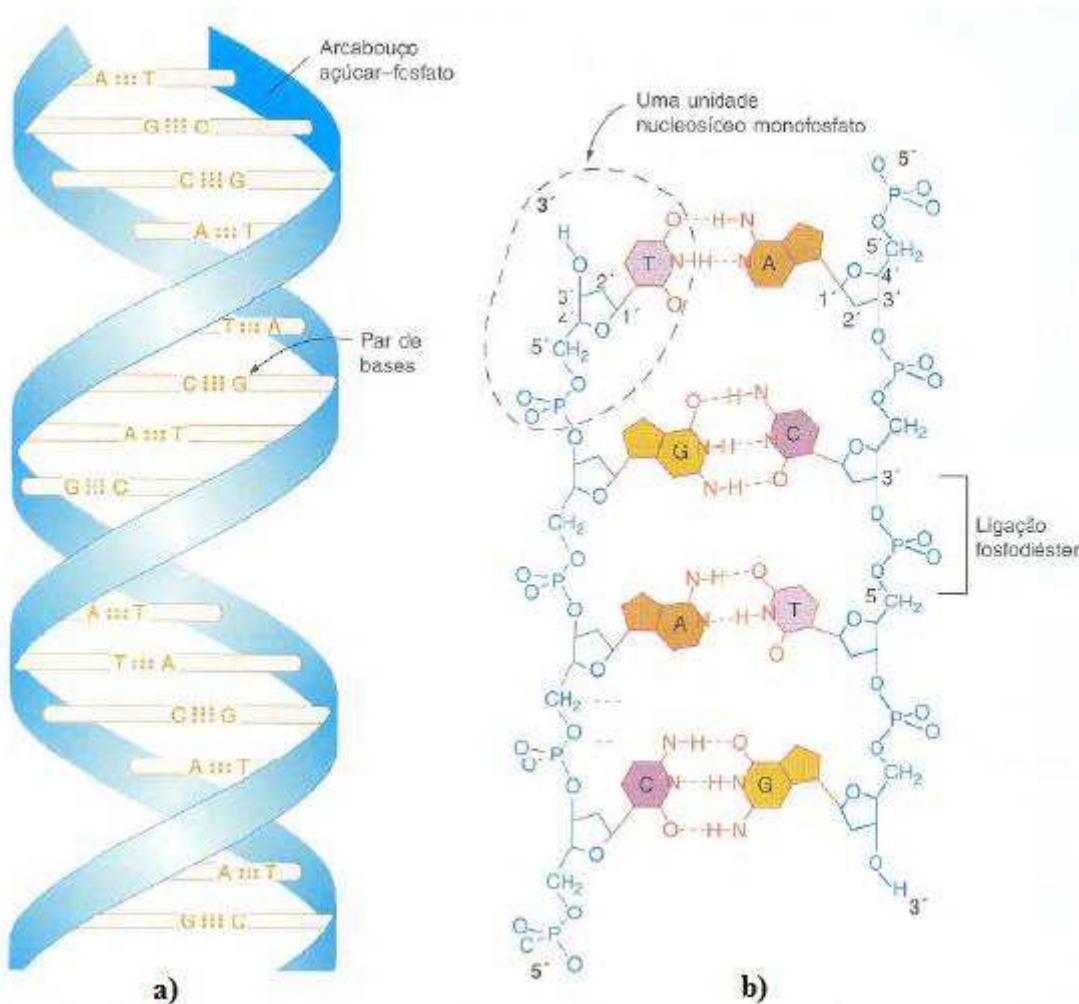


Figura 2 - a) Modelo simplificado mostrando a estrutura helicoidal do DNA. Os bastões representam pares de bases, e fitas representam os arcabouços açúcar-fosfato das duas cadeias. **b)** Diagrama químico preciso da dupla hélice de DNA, desenrolado para mostrar os arcabouços açúcar-fosfato (azul) e degraus de pares de bases (rosa). Os arcabouços correm em sentidos opostos; as pontas 5' e 3' são denominadas pela orientação dos átomos de carbono 5' e 3' dos anéis de açúcar. Cada par de bases tem uma base purína (A ou G) e uma base pirimidína (T ou C), conectadas por ligações de hidrogênio (linhas tracejadas). **Fonte:** GRIFFITHS, 2008.

Os dois filamentos de nucleotídeos pareados com polaridade inversa automaticamente assumem uma conformação de dupla hélice, principalmente pela interação de pares de bases. Os pares de bases, que são estruturas planares achatadas, empilham-se uns sobre os outros no centro da dupla hélice. O empilhamento dá estabilidade a molécula de DNA, excluindo as moléculas de água dos espaços entre os pares de bases. A forma mais estável que resulta do empilhamento de bases é uma dupla hélice com dois tamanhos distintos de “sulcos” ocorrendo

em uma hélice: o “sulco” maior e o “sulco” menor^[25], os quais são possíveis de serem observados na Figura 2.

Devido ao espaço ocupado pelas bases nucleotíidas, a adenina sempre pareia com timina, enquanto a guanina sempre pareia com a citosina. As bases que formam pares são ditas complementares. Em suma, o DNA é composto de duas cadeias nucleotíidas mantidas unidas pelo pareamento de A com T e G com C^[25].

É importante observar que entre as A e as T formam-se duas ligações de hidrogênio, e entre as C e G, três. Consequentemente, o par C – G é mais estável que o par A – T. A dupla estrutura helicoidal mantém-se estabilizada graças às ligações de hidrogênio e às interações hidrofóbicas existentes entre as bases de cada cadeia^[27]. Vale ressaltar que, em cada molécula de DNA, a quantidade de adenina é igual à de timina ($n_A = n_T$) e a quantidade de guanina é igual à de citosina ($n_G = n_C$). Consequentemente, o número de purinas é idêntico ao número de pirimidinas ($n_A + n_G = n_T + n_C$).

Essa conjuntura molecular fornece a base para as quatro propriedades que caracterizam a informação genética:

- Diversidade de estrutura: embora existam apenas quatro tipos de nucleotídeos em um único filamento de DNA, esses nucleotídeos podem estar em qualquer ordem, e o trecho de DNA correspondente a determinado gene pode ter qualquer tamanho.
- Habilidade de se replicar: devido ao pareamento de A em um filamento com T no outro, e C em um filamento com G no outro, cada filamento contém uma especificação completa de seu filamento pareado complementar. Na replicação da dupla hélice, a primeira etapa é a separação dos dois filamentos (duas fitas) complementares. Então é feito um novo filamento-filho em cada um dos filamentos separados. Onde o filamento-molde tem um A, o novo filamento feito contém um T, um T fará par com A, um C com G e um G com C. O resultado é que são produzidas duas cópias idênticas da dupla hélice original, como mostrado na Figura 3. A enzima responsável de trazer as bases para a dupla hélice-molde é chamada de DNA polimerase.

OBS.: Um único filamento de nucleotídeos não tem estrutura helicoidal; a forma helicoidal do DNA depende totalmente do pareamento e empilhamento das bases nos filamentos de polaridade inversa; portanto, no momento da quebra para a replicação, cada um dos filamentos (filamento-filho) está disposto linearmente – processo chamado de deselicoidização; apenas após a adesão de novos nucleotídeos livres a cada um desses filamentos, é que as novas cadeias reassumem um formato helicoidal.

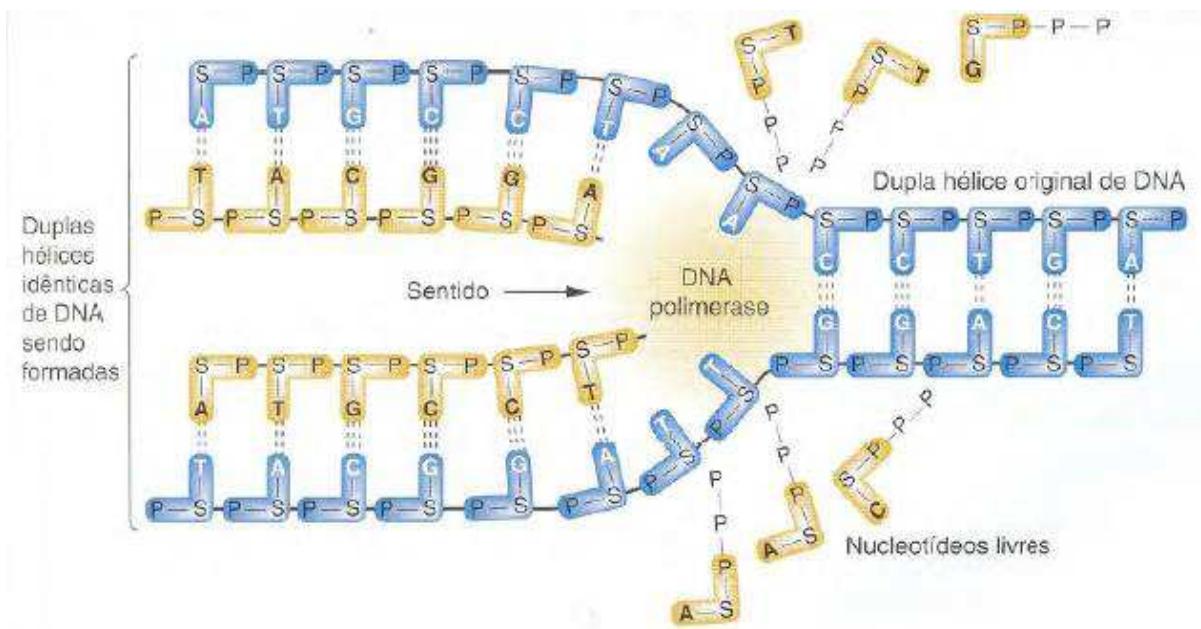


Figura 3 - Na replicação do DNA novos nucleotídeos (amarelo) são polimerizados para formar cadeias-filhas, usando nucleotídeos da dupla hélice original (azul) como molde. S – açúcar, P – grupo fosfato. **Fonte:** GRIFFITHS, 2008.

- **Mutabilidade:** no curso da replicação, base incorreta pode ser colocada ou bases podem ser perdidas ou duplicadas. Caso ocorra tal evento, a nova cópia de DNA e todas as cópias decorrentes dessa cópia serão diferentes da molécula ancestral. Terá ocorrido uma mutação herdável.
- **Tradução em forma e função:** de algum modo, determinada sequência de A, T, G e C deve ser usada pela célula para criar moléculas de proteínas com sequências particulares de aminoácidos. Além disso, alguma parte do DNA deve agir como um sinal para o maquinário da célula de que a tradução de determinado gene em uma sequência de aminoácidos deve ocorrer em algumas células e em outras não; em determinados tecidos; e em certas épocas do desenvolvimento e vida do organismo^[25].

Apesar que, nas diferentes moléculas de DNA, as sequências das bases ao longo das cadeias variam consideravelmente, em uma mesma molécula de DNA, as sequências das duas cadeias são complementares. Devido a esta propriedade, quando as cadeias se separam durante a duplicação do DNA, cada uma delas serve de molde para a síntese de uma nova cadeia complementar. Deste modo são geradas duas moléculas-filhas de DNA com a mesma constituição molecular que possuía a progenitora^[27].

2.1.2 Leishmaniose

As leishmanioses são um complexo de doenças infecciosas, que atinge várias regiões do globo, afetando seres humanos e diversas espécies de animais silvestres e domésticos, podendo se manifestar através de diferentes formas clínicas. Têm-se verificado a ocorrência dessa parasitose na Ásia, Europa, África e Américas; sendo que existem relatos sobre a doença no continente americano desde a era colonial^[28].

As leishmanias são protozoários parasitos, isto é, são seres que vivem em dependência metabólica de seus hospedeiros, causando-lhes algum tipo de dano. Em 1898, o pesquisador russo Piotr Fokich Borovsky demonstrou que era um protozoário, o responsável pela infecção^[29]. O nome do gênero *Leishmania* foi dado em homenagem ao patologista escocês William Boog Leishman.

A primeira observação dos parasitos que causavam o calazar (posteriormente denominada leishmaniose visceral) ocorreu na Índia em 1885, por Cunningham, em indivíduos acometidos pela doença. Em 1903, Leishman e Charles Donovan realizaram as primeiras descrições do protozoário responsável pelo calazar indiano, mais tarde renomeado para *Leishmania donovani*, por Ronald Ross. Como o calazar na região do Mediterrâneo afetava principalmente crianças, intensificou-se a ideia de que se tratava de uma espécie diferente de *Leishmania*, que foi confirmada por Charles Nicole em 1908, denominada de *Leishmania infantum*.

Na América do Sul, o primeiro caso de LV foi relatado por Migone, em 1913 no Paraguai, em material de necropsia de paciente que havia contraído a doença no estado do Mato Grosso, Brasil. Evandro Chagas e colaboradores, entre 1936 e 1939 nomearam o parasito *Leishmania chagasi*^[30] como agente etiológico do calazar neotropical. Atualmente *L. chagasi* e *L. infantum* são consideradas a mesma espécie, sendo adotada a nomenclatura de *L. infantum* como agente etiológico da LV nas Américas.

Como já citado, na região das Américas também se tinha casos de lesões em vários lugares causadas pelo protozoário, que foi confirmada por Gaspar Vianna, em 1909 na atual Fundação Osvaldo Cruz, denominada de *Leishmania braziliensis*^[28]. Apenas em 1954, dissociando-se da então conhecida *L. brasiliensis*, na região das Guianas e norte da Amazônia brasileira, Hervé Alexandre Floch denominou à *Leishmania guyanensis* como sendo agente causador do “pian bois” (lesão framboesóide do bosque) nessas regiões. Enquanto trabalhavam nos estados do Pará e Mato Grosso em 1972, Ralph Lainson e Jeffrey Jon Shaw, notaram

diferenças biológicas marcantes entre uma espécie de *Leishmania* comumente encontrada em roedores, à qual denominaram de *Leishmania amazonensis*^[31].

Em 1914, Wasili Larionovich Yakimoff e N. I. Schokhor denominaram uma das espécies de *Leishmania* que são encontradas em regiões de deserto e savana do norte da África, Oriente Médio e Ásia Central até o subcontinente indiano como *Leishmania major*.

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considerou a leishmaniose como a segunda doença, proveniente de protozoário, de importância na saúde pública.

2.1.2.1 Morfologia

O gênero *Leishmania* é encontrado em duas formas evolutivas: amastigota e promastigota. Nos hospedeiros vertebrados, a forma encontrada, parasitando intracelularmente os macrófagos – células de grandes dimensões encontradas no tecido conjuntivo e que se concentram em órgãos com a função de defesa do organismo, fagocitando elementos estranhos ao corpo –, é a amastigota. Nos vetores invertebrados (flebotomíneos), ela é encontrada na forma promastigota, habitando o meio extracelular, principalmente no aparelho digestivo do inseto. As formas amastigotas medem entre 2 e 5 μm de diâmetro, as quais apresentam um flagelo internalizado (imóvel) e uma forma ovoide; enquanto a forma promastigota mede entre 15 e 20 μm de comprimento, possuindo um flagelo livre e longo, que emerge do corpo do parasito na sua porção anterior, conforme Figura 4.

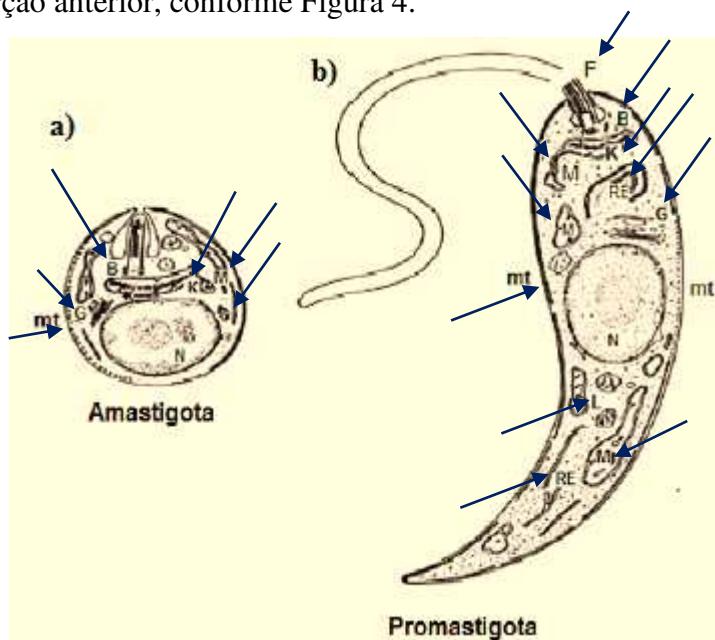


Figura 4 - Disposição das organelas presentes nas duas formas encontradas de *Leishmania*. **a)** Amastigota; **b)** Promastigota. **Adaptado da Fonte:** AGUIAR, 2016.

A bolsa flagelar (B) é onde se localiza o flagelo; os flagelos (F) são formados de actina, cuja função é mover o parasito como um todo; o complexo de Golgi (G) é responsável pela síntese de carboidratos e condensação da secreção proteica; o cinetoplasto (K) é uma região especializada da mitocôndria e rica em DNA; os lisossomos (L) são responsáveis pela digestão intracelular; a mitocôndria (M) é responsável pela produção de energia; a membrana (mt) é responsável pela proteção, nutrição, excreção e revestimento; e o retículo endoplasmático (RE) é responsável pela síntese de esteroides e proteínas^[29]; e (N) é o núcleo, onde se encontra o material genético.

As formas promastigotas responsáveis pela infecção nos vertebrados são chamadas de promastigotas metacíclicas pois possuem flagelo muito longo, cerca de duas vezes o comprimento do corpo. Possuem mobilidade intensa e são encontrados livres nas porções anteriores do trato digestivo do inseto^[32].

2.1.2.2 Ciclo de vida

Os vetores da leishmaniose, os flebotomíneos, são dípteros da família Psychodidae, hematófagos, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia* (Américas), onde somente as fêmeas são agentes infectantes, já que os vetores machos têm mandíbulas rudimentares; fato que os impossibilitam de penetrar na pele dos vertebrados, razão pela qual não se alimentam de sangue. As amastigotas ingeridas pelos insetos vetores rapidamente se transformam em promastigota, a forma típica do vetor. As promastigotas metacíclicas, formas infectantes para os vertebrados, são inoculadas e regurgitadas juntamente com a saliva dos insetos por ocasião da alimentação destes^[32]. A Figura 5 representa o ciclo de vida da *Leishmania*.

O parasito é transmitido pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, as quais regurgitam o estágio infeccioso (promastigotas metacíclicas) de sua probóscide – em insetos, é uma estrutura oca, correspondente ao prolongamento do aparelho bucal, que então funciona como sugador, ou picador-sugador – durante refeições repasto sanguíneo (1). Com isso, as promastigotas metacíclicas que atingem a ferida de punção no hospedeiro humano são internalizadas por macrófagos (2) e outros tipos de células mononucleares fagocitárias. As promastigotas se transformam, nestas células, para a forma evolutiva de tecido do parasito (isto é, amastigotas) (3), que se multiplicam por divisão simples e procedem para a infecção de outras células mononucleares fagocitárias (4). Parasito, hospedeiro e outros fatores afetam no fato de que se a infecção se torna sintomática ou se resulta em leishmaniose cutânea ou visceral. Os

flebotomíneos se infectam pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo (5, 6). Nos flebótomos, as amastigotas se transformam em promastigotas, desenvolvem-se no intestino (7) (no intestino posterior para parasitos do subgênero *Vianna* e no intestino médio para parasitos do subgênero *Leishmania*) e migram para a probóscide (8)^[33].

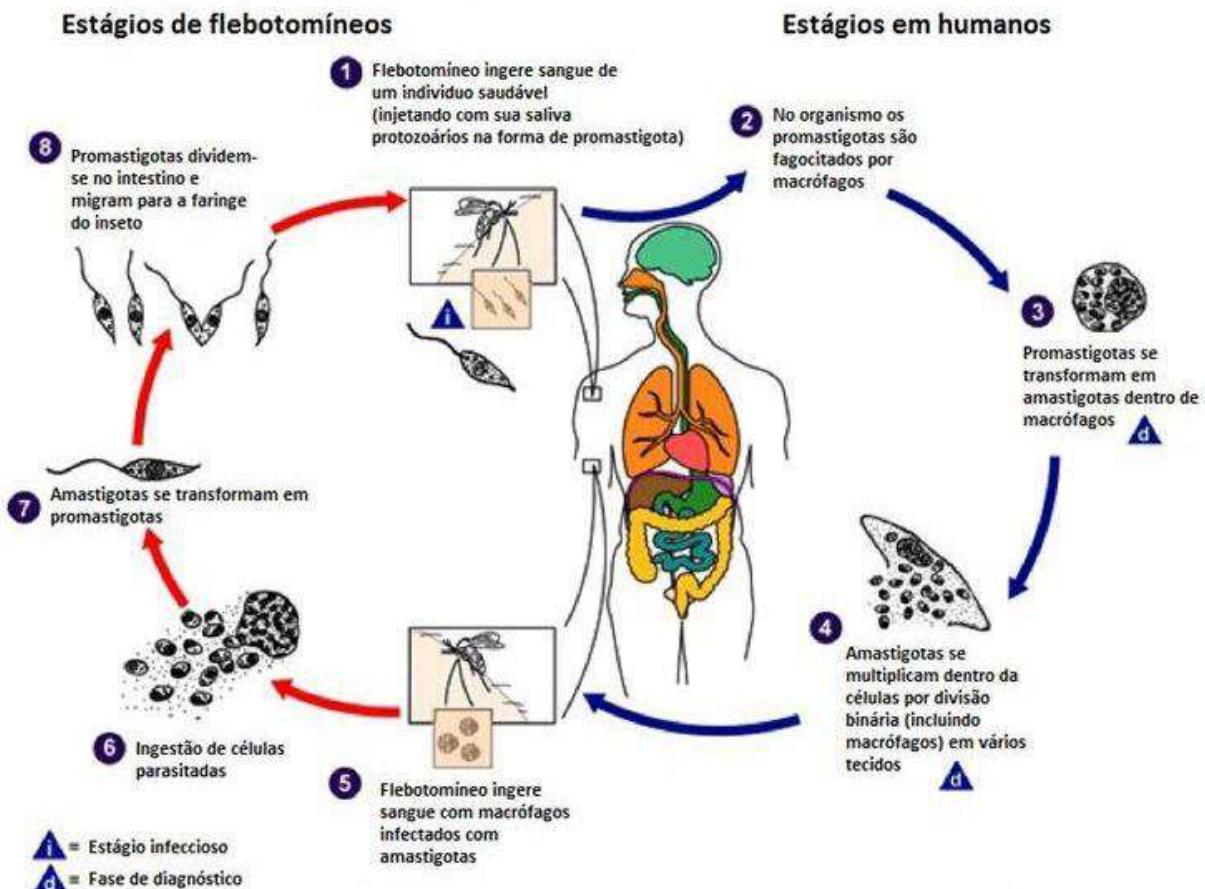


Figura 5 - Ciclo de vida da *Leishmania*.

Fonte:

<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.

2.1.2.3 Epidemiologia

A doença afeta algumas das pessoas mais pobres da Terra e está associada a desnutrição, deslocamento de população, infraestrutura habitacional precária, um sistema imune fraco e falta de recursos financeiros. A doença também pode estar ligada a mudanças ambientais como desmatamento, construção de barragens, esquemas de irrigação e urbanização. Estima-se que, anualmente, ocorrem entre 700.000 a 1 milhão de novos casos e entre 20.000 a 30.000 mortes^[34].

Existem três formas principais que podemos encontrar a leishmaniose, sendo elas: a leishmaniose visceral (também conhecida como calazar, que é a forma mais grave da doença), a leishmaniose cutânea (a mais comum) e a leishmaniose mucocutânea.

I. Leishmaniose visceral (LV): é fatal em mais de 95% dos casos, se não for tratada. É caracterizada por ataques irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e fígado e, anemia. É altamente endêmico no subcontinente indiano e na África Oriental. Cerca de 500.000 novos casos de LV ocorrem em nível mundial a cada ano. Em 2015, mais de 90% dos novos casos notificados ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão.

II. Leishmaniose cutânea (LC): causa lesões cutâneas, principalmente úlceras, indolores, únicas ou múltiplas em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes duradouras e deficiência grave. Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos de LC ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Estima-se que cerca de 0,6 milhões a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente no mundo todo.

III. Leishmaniose mucocutânea (LMC): leva a destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru^[34].

As Figura 6 e Figura 7 mostram o panorama mundial do estado endêmico proveniente de infecção para os casos LV e LC.

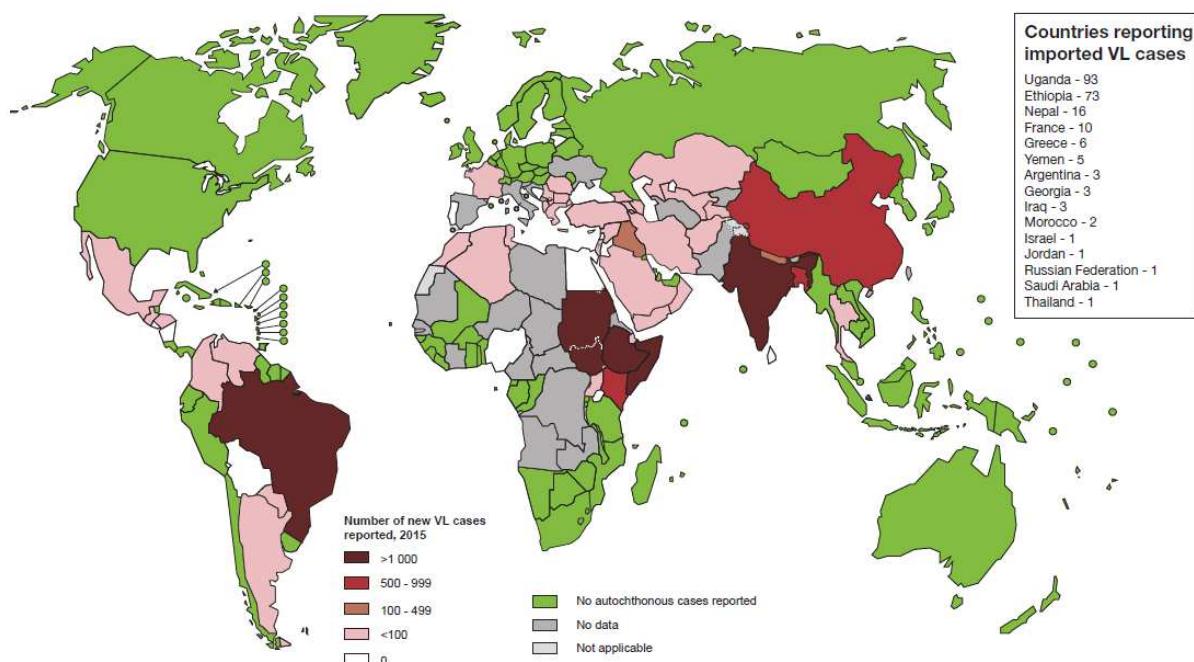


Figura 6 - Estado de endemidade mundial da leishmaniose visceral, em 2015. **Fonte:** WHO, 2017.

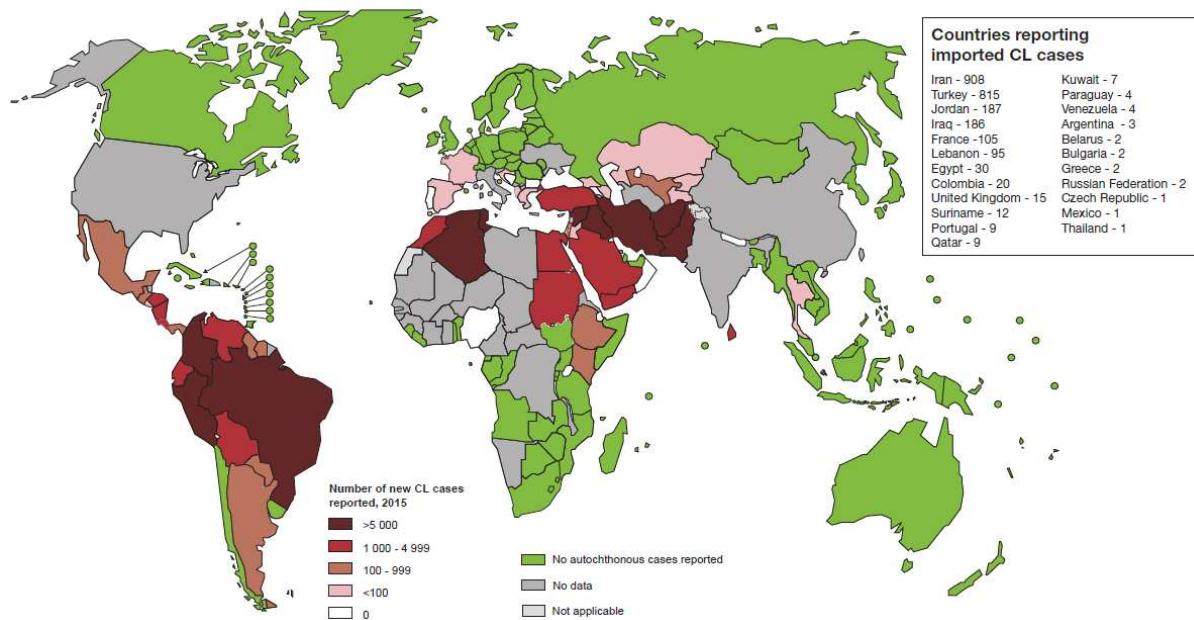


Figura 7 - Estado de endemicidade mundial da leishmaniose cutânea, em 2015. **Fonte:** WHO, 2017.

Analisando apenas a situação do Brasil, de acordo com dados de 2015, o país é responsável por 95,2% dos casos de leishmaniose visceral registrado nas Américas, o que corresponde a 3290 casos em média por ano. Destes, a distribuição etária é de: 31,0% para menores de 5 anos; 8,4% entre 5 e 9 anos; 10,1% entre 10 e 19 anos; 35,0% entre 20 e 49 anos; 14,6% para maiores de 50 anos e; 0,9% não especificado. Relativo ao gênero, temos que 65% dos casos ocorrem em homens e 35% em mulheres. A incidência por 100.000 habitantes é de 2,54^[37]. A Figura 8 mostra um panorama geral da situação no país.

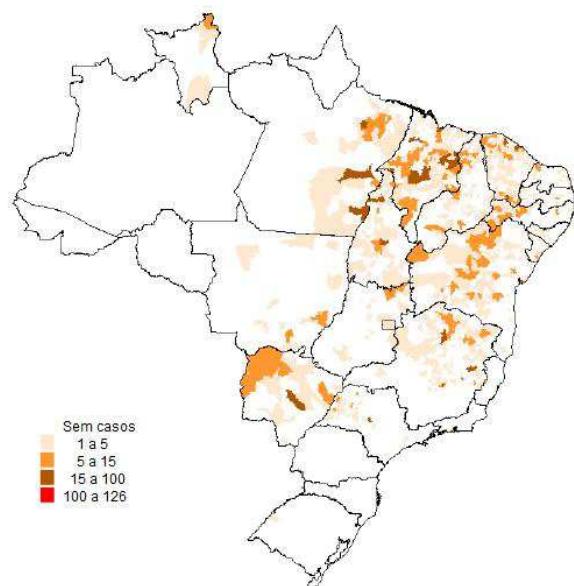


Figura 8 - Casos de leishmaniose visceral por município de infecção. **Fonte:** SVS, 2016.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), que abrange as formas cutânea e mucocutânea, é considerada uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas. Para a leishmaniose tegumentar, temos a ocorrência de 19.395 casos, sendo 18.324 cutânea (94,5%) e 1.071 mucosas (5,5%). Dos afetados pela doença, a distribuição etária é de: 3% para menores de 5 anos; 3,6% entre 5 e 9 anos; 15,7% entre 10 e 19 anos; 52,6% entre 20 e 49 anos; 23,8% para maiores de 50 anos e; 1,3% desconhecido. Relativo ao gênero, temos que 73% dos casos ocorrem em homens e 27% em mulheres^[37]. A Figura 9 mostra um panorama geral da situação no país, mostrando regiões que sofrem com a doença.

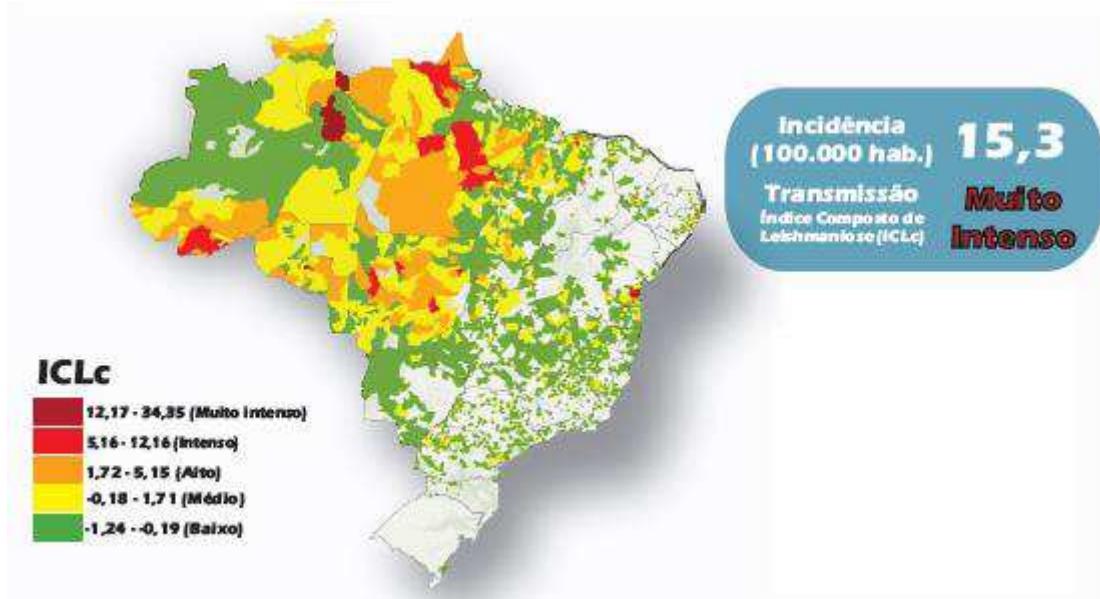


Figura 9 - Incidência de leishmaniose cutânea e mucosa no Brasil. **Fonte:** PAHO, 2017.

2.2 Fundamentação Física

2.2.1 Radiação e espectro eletromagnético

A radiação eletromagnética tem sua descrição ondulatória estabelecida por James C. Maxwell (1831 – 1879), podendo ser descrita por dois vetores dependentes do tempo, que descrevem a oscilação em fase dos campos elétrico e magnético durante o percurso da onda no espaço ao decorrer do tempo. Os campos elétrico e magnético são ondas perpendiculares entre si e ambos também são perpendiculares em relação a direção de propagação da onda.

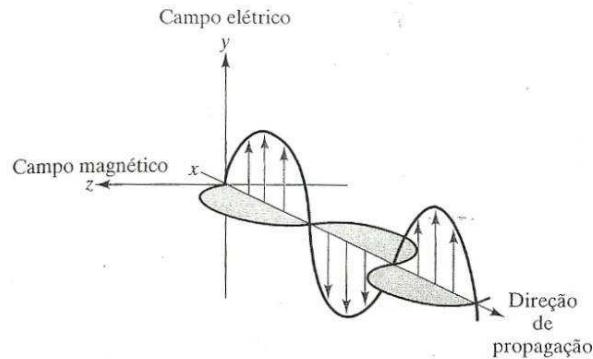


Figura 10 - Onda eletromagnética que se propaga na direção x. **Fonte:** HOLLER, 2009.

Na Figura 10, têm-se uma representação gráfica de uma onda eletromagnética com suas componentes elétrica polarizada na direção xy e sua componente magnética polarizada na direção xz .

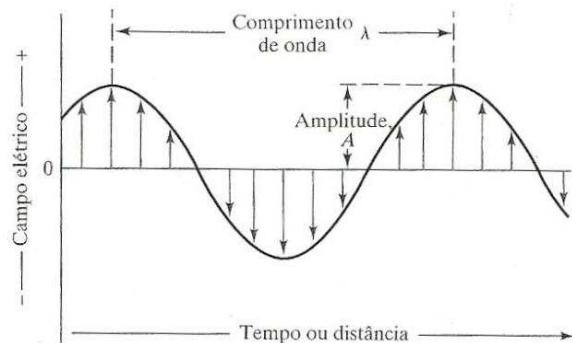


Figura 11 - Características intrínsecas de uma onda. **Fonte:** HOLLER, 2009.

A distância entre dois pontos repetidos sucessivos num padrão de onda é chamado de comprimento de onda (λ), conforme ilustrado na Figura 11, enquanto que a frequência (ν) é o número de ocorrências de um evento (ciclos, voltas, oscilações, etc) em um determinado intervalo de tempo. A relação entre frequência e comprimento de onda é dada por

$$c = \lambda\nu , \quad (1)$$

onde c é a velocidade da luz no vácuo. Um terceiro parâmetro, comumente utilizado em espectroscopia vibracional, é o número de onda κ , definido como sendo o inverso do comprimento de onda,

$$\kappa = \frac{1}{\lambda} , \quad (2)$$

com dimensão cm^{-1} , nos permitindo reescrever a relação (1) da seguinte forma:

$$\kappa = \frac{\nu}{c}. \quad (3)$$

A radiação eletromagnética, descrita pela teoria da Mecânica Quântica, é definida como pacotes quantizados de energia, sem massa, chamados de fôtons ou quanta, viajando na direção da propagação, com a velocidade da luz. Quando essa radiação interage com uma molécula, pode ocorrer uma transferência de energia da radiação eletromagnética para a molécula apenas em pacotes quantizados de energia. Essa energia, energia de um fôton, é dependente da frequência, e dada por

$$E = h\nu = \frac{h}{\lambda} = hck. \quad (4)$$

onde h é a constante de Planck $h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$.

Supondo que,

$$\Delta E = E_2 - E_1, \quad (5)$$

onde E_2 e E_1 são, respectivamente, as energias dos estados excitados e fundamental e ΔE é a diferença de energia entre os dois estados quantizados. Então, a molécula “absorve” ΔE quando excitado de E_1 para E_2 , e “emite” ΔE quando volta de E_2 para E_1 ^[40].

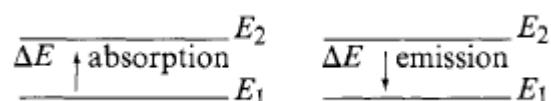


Figura 12 - Emissão e absorção de energia. **Fonte:** FERRARO, 2003.

Usando a relação (4), ficamos com

$$\Delta E = E_2 - E_1 = hck. \quad (6)$$

A magnitude de ΔE é diferente dependendo da transição.

A energia também pode ser escrita em termos angulares, já que $\omega = 2\pi\nu$, onde ω é a frequência angular. Reescrevendo a relação (4) com base na definição da frequência angular, teremos

$$E = h \frac{\omega}{2\pi} = \hbar\omega . \quad (7)$$

Energias mais baixas (valores de 10^2 a 10^{-5} m em comprimento de onda, ou 10^6 a 10^{14} Hz em frequência) são capazes de acelerar elétrons livres até provocar vibrações nas moléculas. Energias mais altas (valores de 10^{-6} a 10^{-13} m em comprimento de onda, ou 10^{15} a 10^{22} Hz em frequência) provocam transições nos orbitais atômicos, dos mais externos aos mais internos, até a fissão do núcleo, ao se aumentar a energia. Como consequência, a energia envolvida no fenômeno determinará a frequência da radiação eletromagnética irradiada. A Figura 13 exibe as faixas de radiações eletromagnéticas e as fontes capazes de produzi-las com determinada frequência^[41].

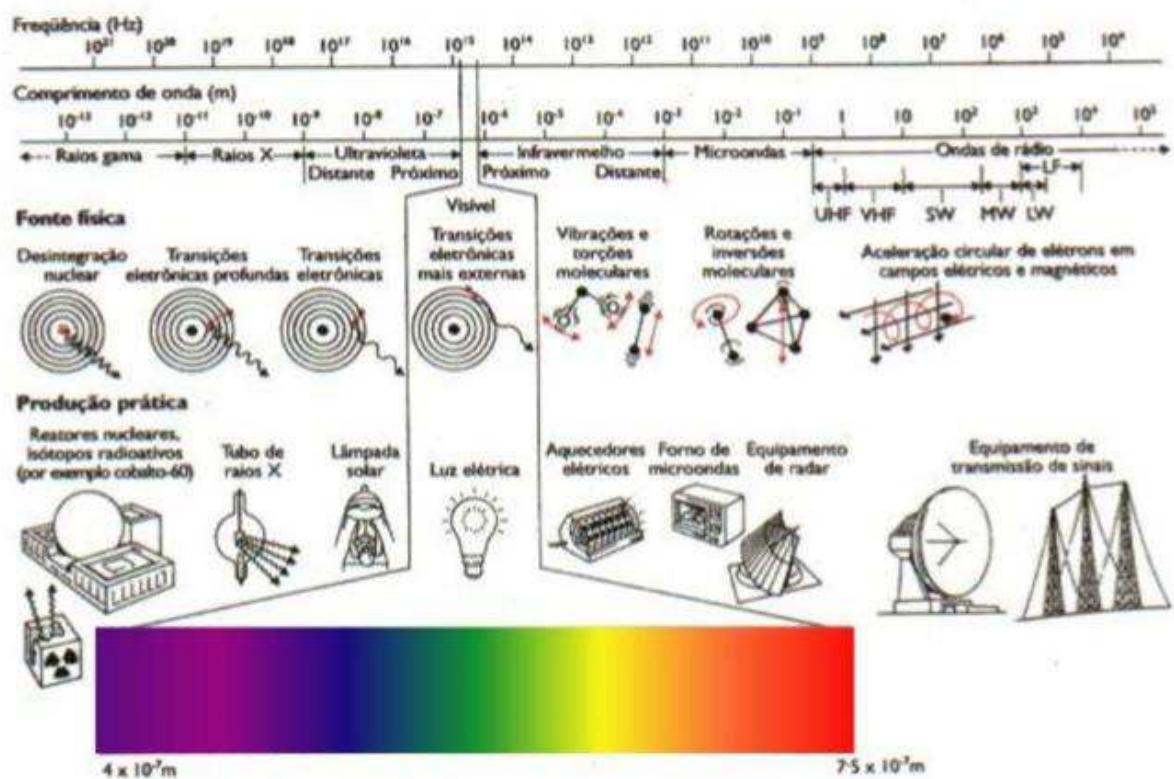


Figura 13 - Relação entre faixas de radiações eletromagnéticas e exemplos de fontes. **Fonte:** <http://www.novafisica.net/projetos/microondas/conteudo.html>

As regiões espectrais são faixas do espectro eletromagnético subdividido seguindo o critério energético. O espectro eletromagnético estende-se desde as radiofrequências até às radiações gama, em ordem crescente de energia. Maior energia implica maior frequência e menor comprimento de onda.

2.2.2 Espectroscopia Raman

A espectroscopia é o ramo da ciência que estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia dos átomos ou moléculas. Os espectros fornecem as transições (diferença de energia entre os níveis) e a partir destas medidas são determinadas as posições relativas dos níveis energéticos. No caso de moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos, sendo eles: nível eletrônico, nível vibracional ou nível rotacional, vide Figura 14. Normalmente, as transições eletrônicas estão situadas na região do ultravioleta ou visível, as vibracionais na região do infravermelho e as rotacionais na região de micro-ondas. Cada tipo de espectroscopia tem uma tecnologia própria^[1].

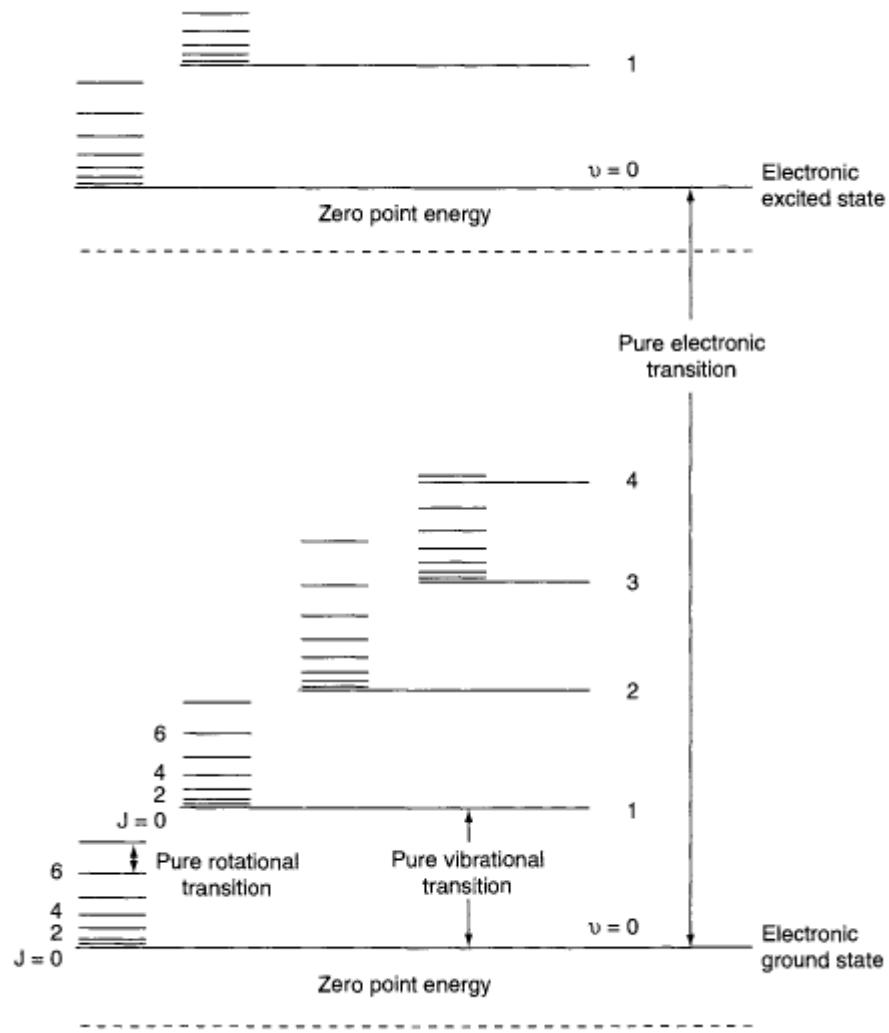


Figura 14 - Níveis de energia discriminados. **Fonte:** FERRARO, 2003.

A energia total (E_{tot}) de uma molécula será a soma das energias eletrônica (E_{ele}), vibracional (E_{vib}) e rotacional (E_{rot}),

$$E_{tot} = E_{ele} + E_{vib} + E_{rot} , \quad (8)$$

sendo que

$$E_{ele} \gg E_{vib} \gg E_{rot} , \quad (9)$$

o que nos permite estudar cada espectro em separado independentemente da interação que há entre eles.

A separação entre os movimentos dos núcleos e dos elétrons conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer, resulta principalmente da grande diferença entre as massas do núcleo e dos elétrons. Como o movimento dos elétrons em relação ao movimento do núcleo ocorre de maneira muito mais rápida, podemos considerar que a posição do núcleo permanece fixa durante a transição eletrônica. A interação da radiação eletromagnética com o movimento vibracional dos núcleos da origem ao espectro vibracional no infravermelho ou ao espalhamento Raman^[1].

A espectroscopia vibracional analisa as transições vibracionais com o intuito de obter informações a respeito da geometria da molécula (através do número de modos vibracionais ativos nos espectros infravermelho e Raman), da natureza das ligações químicas presentes na molécula (valores das frequências vibracionais), bem como identificar substâncias a partir de espectros característicos, como se fosse uma “impressão digital”.

O espalhamento Raman é uma maneira indireta de se obter os espectros vibracionais normalmente observados no infravermelho, no qual transporta-se para a região do visível as informações adquiridas. O efeito Raman é o espalhamento inelástico proveniente da interação da radiação eletromagnética monocromática com a material alvo. Define-se a diferença entre as frequências da radiação espalhada e da radiação incidente como sendo a frequência vibracional. No espalhamento Raman uma radiação monocromática interage com a molécula e é espalhada com frequências ligeiramente modificadas. Esta variação de frequência corresponde à diferença de energia entre dois estados vibracionais^[1].

Veremos na continuação deste tópico, os pormenores referentes ao espalhamento Raman; como por exemplo, os requisitos necessários para que o mesmo seja possível de obtenção e observação.

2.2.2.1 Modelo clássico

A princípio, deveríamos utilizar mecânica quântica quanto ao tratamento de vibrações moleculares. Entretanto, o método clássico desenvolvido por Edgar Bright Wilson Jr. (1908 – 1992) é uma maneira prática e eficiente de tratarmos vibrações, conforme veremos no decorrer do texto.

Cada átomo possui 3 graus de liberdade (movimento nas três dimensões). Em uma molécula com N átomos haverá $3N$ graus de liberdade. Como nos interessa os movimentos vibracionais, podemos descartar 3 graus de liberdade referentes ao movimento de translação, provenientes do movimento em fase de todos os átomos nas três dimensões; ou seja, dos movimentos translacionais do centro de massa da molécula. Podemos ainda desconsiderar mais 3 graus de liberdade devido às moléculas não lineares, correspondentes aos movimentos rotacionais da molécula. Logo, os $3N-6$ graus de liberdade restantes são os que correspondem aos movimentos vibracionais fundamentais. Para moléculas lineares, temos uma situação com somente dois 2 graus de liberdade rotacional, uma vez que consideramos os núcleos sendo fixos (pontuais), não ocorre rotação no eixo da molécula, de modo que teremos então $3N-5$ graus de liberdade vibracional.

Para o estudo de vibrações, faremos uso do modelo físico clássico do oscilador harmônico. Tomemos os núcleos como sendo corpos de massa pontual, os quais estão ligados por meio de molas de massa desprezível (ligações químicas). Assim sendo, consideremos uma partícula de massa m ligada a uma parede rígida (massa infinita) por uma mola com constante de força k . Para pequenos deslocamentos em torno do ponto de equilíbrio, temos a Lei de Hooke

$$F = -k\Delta x , \quad (10)$$

onde Δx é o deslocamento sofrido e o sinal negativo indica que a força é oposta ao deslocamento. Aplicando a segunda lei de Newton, temos a equação de movimento:

$$F = -k\Delta x = -k\Delta\ddot{x} , \quad (11)$$

ou ainda

$$\Delta\ddot{x} + \frac{k}{m}\Delta x = 0 . \quad (12)$$

onde $\Delta\ddot{x}$ é a segunda derivada em relação ao tempo de Δx . Definindo

$$\omega^2 = \frac{k}{m} , \quad (13)$$

temos,

$$\Delta\ddot{x} + \omega^2\Delta x = 0 . \quad (14)$$

Logo,

$$\Delta x = A \cos(\omega t + \phi) + B \sin(\omega t + \phi) , \quad (15)$$

com A e B constantes. Uma possível solução para a equação acima é do tipo

$$\Delta x = x_0 \cos(2\pi\nu t + \phi) , \quad (16)$$

já que $\omega = 2\pi\nu$, onde ν é a frequência de oscilação da partícula, t é o tempo de oscilação e ϕ é uma fase.

A segunda derivada de Δx é

$$\Delta\ddot{x} = -4\pi^2\nu^2 x_0 \cos(2\pi\nu t + \phi) . \quad (17)$$

Substituindo Δx e $\Delta\ddot{x}$ na equação (12), obtém-se:

$$-4\pi^2\nu^2 x_0 \cos(2\pi\nu t + \phi) + \frac{k}{m} x_0 \cos(2\pi\nu t + \phi) = 0 ,$$

que nos leva a

$$\begin{aligned} 4\pi^2\nu^2 &= \frac{k}{m} \\ 2\pi\nu &= \sqrt{\frac{k}{m}} \\ \nu &= \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m}} . \end{aligned} \quad (18)$$

Moléculas diatômicas

Consideremos agora um sistema constituído por duas massas pontuais (dois núcleos) m_1 e m_2 , ligados por uma mola de massa desprezível (ligação química) com constante de força k , conforme mostrado na Figura 15.

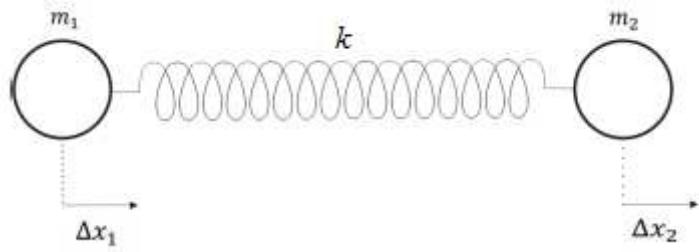


Figura 15 - Esquema de uma molécula diatômica, constituídas por massas m_1 e m_2 , ligadas por uma mola com constante de mola k . **Fonte:** SALA, 2008.

Interessa-nos o pequeno deslocamento dos nucleos durante a vibração, melhor descritos pelas coordenadas cartesianas de deslocamento, as quais representam as variações das coordenadas cartesianas de movimento (Δx , Δy , Δz), não as confundindo com as coordenadas cartesianas das posições de equilíbrio dos núcleos (x , y , z)^[1].

Desconsiderando os movimentos de translação e de rotação, a energia cinética para a molécula diatômica é

$$T = \frac{1}{2} (m_1 \Delta \dot{x}_1^2 + m_2 \Delta \dot{x}_2^2) , \quad (19)$$

enquanto a energia potencial é

$$V = \frac{1}{2} k (\Delta x_2 - \Delta x_1)^2 . \quad (20)$$

Sabemos que este tipo de problema pode ser resolvido por equação de Lagrange (L), na qual $L = T - V$, e então,

$$\frac{d}{dt} \left[\frac{\partial L}{\partial \dot{x}} \right] - \frac{\partial L}{\partial x} = 0 \rightarrow \frac{d}{dt} \left[\frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta x} = 0 . \quad (21)$$

Assim sendo, calculando a lagrangeana (21) para cada um dos núcleos, teremos:

$$\frac{d}{dt} \left[\frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}_1} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta x_1} = 0 , \quad (22)$$

e

$$\frac{d}{dt} \left[\frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}_2} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta x_2} = 0 . \quad (23)$$

Resolvendo primeiramente com a equação (22), usando as equações (19) e (20), teremos:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left\{ \frac{\partial}{\partial \Delta \dot{x}_1} \left[\frac{1}{2} (m_1 \Delta \dot{x}_1^2 + m_2 \Delta \dot{x}_2^2) \right] \right\} + \frac{\partial}{\partial \Delta x_1} \left[\frac{1}{2} k (\Delta x_2 - \Delta x_1)^2 \right] &= 0 \\ \frac{d}{dt} \{m_1 \Delta \dot{x}_1\} + k[(\Delta x_2 - \Delta x_1)(-1)] &= 0 \\ m_1 \Delta \ddot{x}_1 - k(\Delta x_2 - \Delta x_1) &= 0 . \end{aligned} \quad (24)$$

De maneira semelhante, para a equação (23), teremos:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left\{ \frac{\partial}{\partial \Delta \dot{x}_2} \left[\frac{1}{2} (m_1 \Delta \dot{x}_1^2 + m_2 \Delta \dot{x}_2^2) \right] \right\} + \frac{\partial}{\partial \Delta x_2} \left[\frac{1}{2} k (\Delta x_2 - \Delta x_1)^2 \right] &= 0 \\ \frac{d}{dt} \{m_2 \Delta \dot{x}_2\} + k[(\Delta x_2 - \Delta x_1)] &= 0 \\ m_2 \Delta \ddot{x}_2 + k(\Delta x_2 - \Delta x_1) &= 0 . \end{aligned} \quad (25)$$

Supondo que as equações diferenciais (24) e (25) tenham soluções do tipo:

$$\Delta x_1 = A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi) , \quad (26)$$

e

$$\Delta x_2 = A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi) . \quad (27)$$

onde A_1 e A_2 são constantes. Derivando as soluções (26) e (27) em relação ao tempo, obtemos:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} (\Delta x_1) &= -2\pi\nu A_1 \operatorname{sen}(2\pi\nu t + \phi) \\ \frac{d^2}{dt^2} (\Delta x_1) &= -4\pi^2 \nu^2 A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi) , \end{aligned} \quad (28)$$

e

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} (\Delta x_2) &= -2\pi\nu A_2 \operatorname{sen}(2\pi\nu t + \phi) \\ \frac{d^2}{dt^2} (\Delta x_2) &= -4\pi^2 \nu^2 A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi) , \end{aligned} \quad (29)$$

e então substituindo nas equações diferenciais (24) e (25), teremos

$$\begin{aligned} -4\pi^2 \nu^2 m_1 A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi) - k[A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi) - A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi)] &= 0 \\ -4\pi^2 \nu^2 m_1 A_1 - k(A_2 - A_1) &= 0 , \end{aligned} \quad (30)$$

e

$$\begin{aligned} -4\pi^2\nu^2m_2A_2\cos(2\pi\nu t + \phi) + k[A_2\cos(2\pi\nu t + \phi) - A_1\cos(2\pi\nu t + \phi)] &= 0 \\ -4\pi^2\nu^2m_2A_2 + k(A_2 - A_1) &= 0 . \end{aligned} \quad (31)$$

Portanto, temos o sistema de equações:

$$(-4\pi^2\nu^2m_1 + k)A_1 - kA_2 = 0 , \quad (32)$$

e

$$-kA_1 + (-4\pi^2\nu^2m_2 + k)A_2 = 0 . \quad (33)$$

As equações (32) e (33) são um sistema de equações lineares e homogêneas, as quais admitem pelo menos a solução trivial $A_1 = A_2 = 0$ como resposta. A fim de obtermos uma solução diferente da trivial, devemos resolver, via regra de Cramer, o determinante

$$\begin{vmatrix} -4\pi^2\nu^2m_1 + k & -k \\ -k & -4\pi^2\nu^2m_2 + k \end{vmatrix} = 0 \quad (34)$$

Assim sendo,

$$\begin{aligned} (-4\pi^2\nu^2m_1 + k)(-4\pi^2\nu^2m_2 + k) - k^2 &= 0 \\ 16\pi^4\nu^4m_1m_2 - 4\pi^2\nu^2m_1k - 4\pi^2\nu^2m_2k + k^2 - k^2 &= 0 \\ 4\pi^2\nu^2[4\pi^2\nu^2m_1m_2 - k(m_1 + m_2)] &= 0 \end{aligned} \quad (35)$$

Vemos, então, que as raízes são:

$$\nu = 0 , \quad (36)$$

e

$$\begin{aligned} 4\pi^2\nu^2m_1m_2 &= k(m_1 + m_2) \\ \nu^2 &= \frac{1}{4\pi^2}k \frac{(m_1 + m_2)}{m_1m_2} \\ \nu &= \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \end{aligned} \quad (37)$$

onde μ é a massa reduzida, definida como,

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{(m_1 + m_2)} . \quad (38)$$

Com os valores encontrados, substituiremos estes no sistema de equações (32) e (33), as quais faremos separada e respectivamente.

I. Para $\nu = 0$

$$\begin{aligned} (-4\pi^2 0^2 m_1 + k)A_1 - kA_2 &= 0 , \\ kA_1 - kA_2 &= 0 \\ A_1 &= A_2 . \end{aligned} \quad (39)$$

Esse resultado nos informa que as amplitudes são as mesmas para ambos os núcleos, e ainda, que $\Delta x_1 = \Delta x_2$, implicando para nós num movimento de translação.

II. Para $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$

$$\begin{aligned} -kA_1 + \left[-4\pi^2 \left(\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \right)^2 m_2 + k \right] A_2 &= 0 \\ -kA_1 + \left[-\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2} m_2 + k \right] A_2 &= 0 \\ -A_1 - \left[\frac{(m_1 + m_2)}{m_1} - 1 \right] A_2 &= 0 \\ -A_1 m_1 &= [(m_1 + m_2) - m_1] A_2 \\ A_1 m_1 &= -m_2 A_2 , \end{aligned} \quad (40)$$

correspondendo também à

$$\frac{A_1}{A_2} = -\frac{m_2}{m_1} \Rightarrow \frac{\Delta x_1}{\Delta x_2} = -\frac{m_2}{m_1} . \quad (41)$$

Lembrando que as coordenadas cartesianas de deslocamento representam os deslocamentos em relação à posição de equilíbrio de cada átomo, isto significa que as partículas se deslocam em direções opostas e com amplitudes inversamente proporcionais às suas massas, ou seja, executam movimento vibracional^[1].

2.2.2.2 Modelo quântico

Para a demonstração deste, usaremos a função hamiltoniana (H), sendo $H = T + V$. Escrevendo os referentes termos, temos que a energia cinética de uma partícula é descrita como

$$T = \frac{1}{2m}p^2 \rightarrow \hat{T} = -\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{d^2}{dq^2} , \quad (42)$$

com $\hat{p} = -i\hbar \frac{d}{dx}$, operador proveniente da mecânica quântica, enquanto a energia potencial como sendo

$$\hat{V} = \frac{1}{2}kq^2 , \quad (43)$$

onde usamos a coordenada interna q e a massa reduzida μ .

Aplicando a equação de Schrödinger

$$\hat{H}\Psi = E\Psi , \quad (44)$$

teremos:

$$\begin{aligned} \hat{T}\Psi + \hat{V}\Psi &= E\Psi \\ -\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{d^2\Psi}{dq^2} + \frac{kq^2}{2}\Psi &= E\Psi \\ \frac{d^2\Psi}{dq^2} + \frac{2\mu}{\hbar^2} \left(E - \frac{kq^2}{2} \right) \Psi &= 0 \end{aligned} \quad (45)$$

Considerando a função de onda particular (ver Apêndice A),

$$\Psi(q) = Ae^{-\alpha q^2/2} , \quad (46)$$

verificando se ela satisfaz o proposto em equação (45). Logo,

$$\frac{d\Psi}{dq} = -A\alpha q e^{-\alpha q^2/2}$$

e

$$\frac{d^2\Psi}{dq^2} = -A\alpha e^{-\alpha q^2/2} + A\alpha^2 q^2 e^{-\alpha q^2/2} = -\alpha\Psi + \alpha^2 q^2 \Psi . \quad (47)$$

Trabalhando a equação (45) e igualando com a equação (47), teremos:

$$\begin{aligned}-\alpha\Psi + \alpha^2q^2\Psi &= -\frac{2\mu}{\hbar^2}E\Psi + \frac{\mu k q^2}{\hbar^2}\Psi \\ -\alpha + \alpha^2q^2 &= -\frac{2\mu}{\hbar^2}E + \frac{\mu k q^2}{\hbar^2},\end{aligned}$$

e, igualando os termos em ordem de q , temos:

$$\alpha = \frac{2\mu}{\hbar^2}E, \quad (48)$$

e,

$$\alpha^2 = \frac{\mu k}{\hbar^2} \rightarrow \alpha = \frac{\sqrt{\mu k}}{\hbar}. \quad (49)$$

Por fim, substituindo a relação (49) na (48), temos que

$$E = \frac{\alpha\hbar^2}{2\mu} = \frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{\sqrt{\mu k}}{\hbar} = \frac{\hbar}{2} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}},$$

mas, substituindo pela relação (37), ficamos com

$$E = \frac{1}{2}h\nu. \quad (50)$$

sendo (ν) o valor da frequência para um oscilador harmônico. Portanto, a proposição (46) satisfaz como solução para a equação (45). A relação (50) mostra que o valor da energia para a função de onda escolhida é metade do valor clássico, o qual representa a energia do estado fundamental do oscilador.

2.2.2.3 Espectro Raman

O espectro Raman é originado devido ao espalhamento inelástico de uma radiação eletromagnética monocromática que incide e interage com uma molécula. No efeito Raman, a atividade está ligada à variação do momento de dipolo induzido na molécula pelo campo elétrico da radiação incidente. Da teoria clássica, o vetor momento de dipolo induzido (\vec{P}),

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} , \quad (51)$$

oscila com sobreposição de frequências, onde α é a polarizabilidade da molécula e \vec{E} o vetor campo elétrico da radiação incidente^[1]. Considerando a coordenada interna q (única coordenada normal do sistema em estudo) e o campo elétrico \vec{E} descritos por

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_v t) , \quad (52)$$

e

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) , \quad (53)$$

sendo ν_v a frequência vibracional e ν_0 a frequência da radiação incidente. E ainda, escrevendo a polarizabilidade α como uma série de Taylor em função da coordenada interna q ,

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q + \dots , \quad (54)$$

o momento de dipolo induzido assume a forma, desprezando termos de maior ordem para α devido à pequena variação de q ,

$$\begin{aligned} \vec{P} &= \left[\alpha_0 + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q \right] \vec{E} = \alpha_0 \vec{E} + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q \vec{E} \\ \vec{P} &= \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 q_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \cos(2\pi\nu_v t) , \end{aligned}$$

e, aplicando a propriedade trigonométrica

$$\cos(a) \cos(b) = \frac{1}{2} [\cos(a + b) + \cos(a - b)] , \quad (55)$$

ficamos com

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 \frac{q_0 \vec{E}_0}{2} \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \} . \quad (56)$$

Analizando a equação (56) termo a termo, observa-se que o primeiro termo contém somente a frequência da radiação incidente, que não sofreu variação, caracterizando um espalhamento elástico da luz, ou seja, fôtons foram emitidos com a mesma energia dos

absorvidos, correspondendo ao espalhamento Rayleigh. No segundo termo, temos duas radiações espalhadas, nas quais os fótons foram emitidos com energia diferente dos absorvidos, caracterizando um espalhamento inelástico da luz, uma com frequência $\nu_0 - \nu_v$, ou seja, a frequência espalhada é menor do que a frequência incidente, denominado de espalhamento Raman Stokes, e a outra com $\nu_0 + \nu_v$, ou seja, espalhamento com frequência maior do que a incidente, denominado de espalhamento Raman anti-Stokes. Contudo, devemos observar que, os fenômenos do segundo termo só ocorrem se

$$\left(\frac{d\alpha}{dq}\right)_0 \neq 0 , \quad (57)$$

isto é, deve haver uma variação da polarizabilidade com o pequeno deslocamento da coordenada q em torno da posição de equilíbrio.

No feito Raman, teremos um espectro com os três espalhamentos simetricamente relacionados, em escala de energia em cm^{-1} : a banda do espalhamento Rayleigh no centro, à esquerda a banda do espalhamento anti-Stokes, com frequências mais baixas, e à direita a banda de espalhamento Stokes, com frequências mais altas. Pela teoria clássica, as bandas de espalhamento Stokes e anti-Stokes deveriam ter a mesma intensidade, todavia, experimentalmente verifica-se que isso não ocorre. Assim, devemos considerar o modelo quântico para explicar este comportamento.

Podemos introduzir para a polarizabilidade a expressão

$$\alpha_{mn} = \int \psi_m \alpha \psi_n d\tau , \quad (58)$$

onde α_{mn} são componentes do tensor de polarizabilidade, e ψ_m e ψ_n são, respectivamente, as funções de onda final e inicial.

A relação entre a componentes do momento dipolo elétrico e as componentes do campo elétrico

$$\begin{bmatrix} P_x \\ P_y \\ P_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{zy} & \alpha_{zz} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} . \quad (59)$$

onde, as componentes α_{ij} são simétricas no efeito Raman, isto é, $\alpha_{xy} = \alpha_{yx}$, $\alpha_{xz} = \alpha_{zx}$ e $\alpha_{yz} = \alpha_{zy}$.

Em cada transição entre estados vibracionais m e n , devemos considerar as componentes $(\alpha_{ij})_{mn}$, onde i e j são as coordenadas x , y , ou z . A verificação de atividade no Raman só acontece quando pelo menos uma das 6 integrais abaixo forem diferente de zero

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau . \quad (60)$$

Utilizando a polarizabilidade dada por (54), obtemos

$$(\alpha_{ij})_{mn} = (\alpha_{ij})_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left(\frac{d\alpha_{ij}}{dq} \right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau . \quad (61)$$

No espalhamento Raman, os estados vibracionais m e n devem ser diferentes, caso contrário, não teríamos transição de estados e, consequentemente, não teríamos um dipolo induzido; condição necessária para o efeito Raman. Logo, a primeira integral é sempre igual à zero, pela ortogonalidade entre ψ_m e ψ_n . Para $m = n$, o primeiro termo corresponde ao espalhamento Rayleigh. Temos, então, que o segundo termo deve ser diferente de zero. Para tal, faz-se necessário que se cumpram as condições:

- $\left(\frac{d\alpha_{ij}}{dq} \right)_0 \neq 0$, ou seja, pelo menos um dos componentes da polarizabilidade deve variar devido à pequena vibração em torno da posição de equilíbrio;

- A segunda integral também deve ser diferente de zero. Para isso acontecer, o produto $\psi_m q \psi_n$ deve ser função par. Como q é função ímpar, faz-se necessário que o produto $\psi_m \psi_n$ seja também função ímpar, isto é, as duas funções devem ter paridades diferentes.

Os mecanismos de espalhamento podem ser representados pela Figura 16.

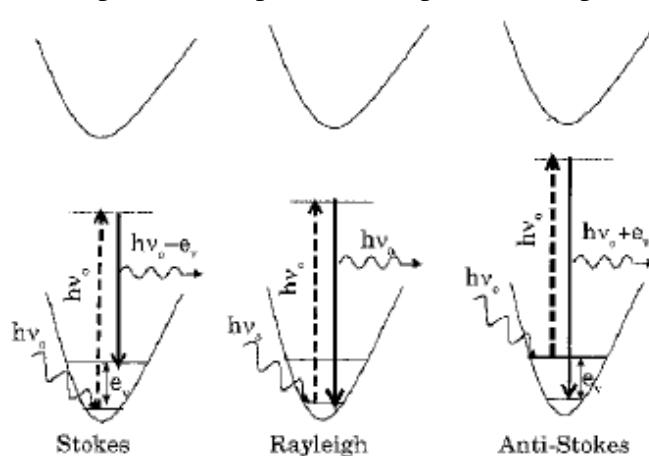


Figura 16 - Esquema dos mecanismos de espalhamento. **Fonte:** SALA, 2008.

Como mostrado acima, no espalhamento Raman Stokes, a molécula no estado fundamental sofre colisão com o fóton de energia $h\nu_0$, passa para um estado intermediário (ou virtual), e decai em seguida para um estado vibracional excitado, de energia e_v , emitindo um fóton com energia $h\nu_0 - e_v$; de energia menor do que o incidente. No espalhamento Rayleigh, após a interação do fóton com a molécula, emite um fóton e decai ao mesmo nível de energia inicial e o fóton é espalhado sem modificação de frequência (espalhamento elástico). No espalhamento Raman anti-Stokes o fóton encontra a molécula já num estado excitado e após a interação, a molécula decai para o estado fundamental. Esta diferença de energia é cedida ao fóton, que é espalhado com energia $h\nu_0 + e_v$ ^[1]. A esquematização da Figura 16 facilita a visualização do espalhamento Raman, mostrando que além do estado inicial e final da molécula também há o estado intermediário.

As bandas Stokes devem ter maior intensidade que as bandas anti-Stokes, pois a população dos estados excitados segue a distribuição de Boltzmann. Isso é verificado experimentalmente e a relação entre as intensidades anti-Stokes (I_A) e Stokes (I_S) é dada por:

$$\frac{I_A}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_v}{\nu_0 - \nu_v} \right)^4 \exp\left(-\frac{e_v}{kT}\right). \quad (62)$$

Para frequências vibracionais muito altas torna-se difícil observar as bandas anti-Stokes, mas para frequências baixas as duas intensidades são comparáveis^[1].

2.2.2.4 Modo normais de vibração

Como já mencionamos, os átomos podem se movimentar de diferentes formas dentro de uma molécula, entretanto formulações matemáticas das vibrações mostram que há um padrão para determinar as mudanças nas coordenadas, de modo que, pode se classificar os movimentos possíveis dos átomos em $3N - 5$ (para moléculas lineares) e $3N - 6$ (para moléculas não lineares). Tais mudanças de coordenadas são chamadas de modos normais de vibração^[43].

Na espectroscopia Raman vibracional, o fóton incidente transfere parte da sua energia nos modos vibracionais da molécula que o atinge, ou absorve energia de uma vibração que já havia sido excitada, ou simplesmente, a interação da radiação com a matéria induz um dipolo eletromagnético na molécula^[44].

O caso mais simples são as moléculas diatômicas (Figura 15), nas quais $N = 2$, o que nos leva a somente um grau de liberdade vibracional. Considerando agora moléculas poliatômicas, ao analisar o caso de moléculas contendo três átomos, ou seja, $N = 3$, resulta em três graus de liberdade. Ademais, pode-se dividir as moléculas triatômicas em dois grupos, as lineares e as não lineares, representadas por CO_2 e H_2O , respectivamente, conforme Figura 17.

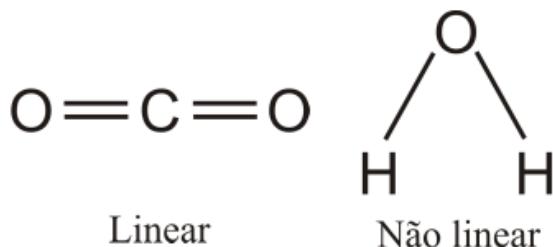


Figura 17 - Ilustração de uma molécula de CO_2 e uma molécula de H_2O , respectivamente, para representar moléculas triatômicas lineares e não lineares. **Fonte:** CHALMERS, 2002.

Observa-se que a molécula triatômica linear possui apenas um modo de vibração, correspondente ao movimento de estiramento, enquanto a molécula não linear possui três modos de vibração, dos quais dois condizem a movimentos de estiramento (um simétrico e outro assimétrico) e o outro ao movimento de flexão, ilustrados na Figura 18.

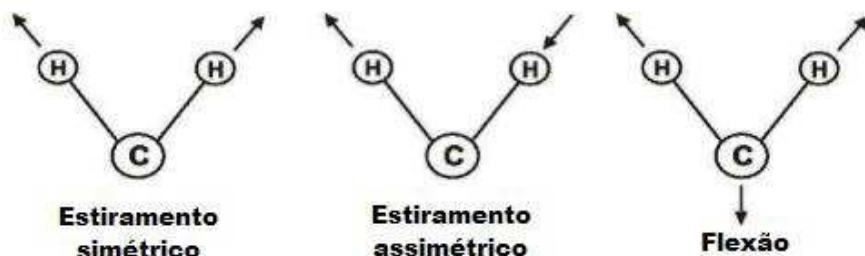


Figura 18 - Modos vibracionais de estiramento simétrico, estiramento assimétrico e flexão. **Fonte:** <https://www.slideshare.net/RaajMathur/department-of-chemistry-institute-of-basic-sciences>.

Além destes modos vibracionais, os grupos funcionais podem ter deformações no plano e para fora do plano, como mostrado na Figura 19.

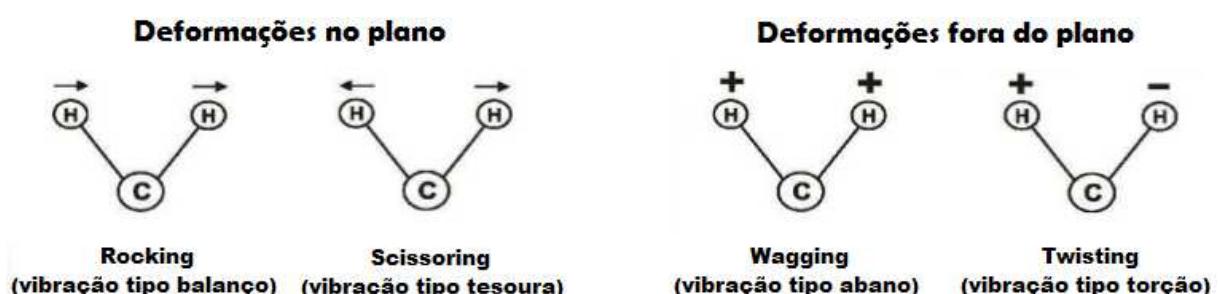


Figura 19 - Modos vibracionais de deformação no plano e fora do plano. **Fonte:** <https://www.slideshare.net/RaajMathur/department-of-chemistry-institute-of-basic-sciences>.

Em moléculas poliatómicas com mais de três átomos não se observa mais a molécula como um todo, mas sim os seus grupos funcionais.

Um espectro Raman é uma "impressão digital" da molécula, pois cada modo vibracional espalha a luz em um comprimento de onda diferente, formando-se grupos de frequências para cada um deles, e por consequência, cada molécula possui um espectro único característico. Assim sendo, a comparação de picos coincidentes entre um espectro sendo analisado com o de uma substância já bem conhecida na literatura nos permite confirmar a presença de tal substância no material que está sendo analisado.

Capítulo 3

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitos

Utilizamos amostras de DNA dos parasitos do gênero *Leishmania*. Essas amostras foram fornecidas pelo Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (DEPAR-ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pelo Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva, o qual colaborou para este trabalho. Das várias espécies que se tem conhecimento, foram utilizadas seis delas no decorrer deste trabalho, sendo elas: *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* e *L. guyanensis*.

3.2 Método de extração do DNA

Nesse item está esquematizado passo a passo, o processo de extração dos DNAs dos parasitos estudados. Os procedimentos foram os mesmos para todas as seis espécies estudadas nesse trabalho. Ressaltamos que estive presente auxiliando em duas das várias extrações realizadas ao decorrer deste trabalho.

1 – Preparação das amostras

Ressuspender até 10^7 parasitos mantidos em cultura em um volume final de 200 μl de tampão T1*. Adicionar 25 μl de solução de proteinase K e 200 μl de tampão B3*. Incubar a amostra a 70 °C por 10 a 15 minutos.

* T1, B3, B5, BW e BE são tampões nomeados no kit usado na extração do DNA, NucleoSpin® Tissue^[46].

2 – Ajuste das condições de ligamento de DNA

Adicionar 210 μ l de etanol (96 a 100 %) a amostra e misturar, usando o vórtex, vigorosamente. Após adição de etanol um precipitado fibroso pode se tornar visível. Isso não afetará a extração do DNA.

3 – Ligamento DNA

Para cada amostra, colocar a coluna em um tubo de coleta. Colocar a amostra na coluna. Centrifugar por 1 minuto a 11700 rpm. Descartar o eluato da coluna e colocar a coluna de volta.

Se a amostra não passar completamente pela matriz (membrana da coluna), repetir a centrifugação a 11700 rpm. Descartar eluato.

4 – Lavagem na membrana de sílica

- 1^a lavagem:

Adicionar 500 μ l de tampão BW*. Centrifugar por 1 minuto a 11700 rpm. Descartar o eluato da coluna e colocar a coluna de volta.

- 2^a lavagem:

Adicionar 600 μ l de tampão B5* na coluna e centrifugar por 1 minuto a 11700 rpm. Descartar o eluato da coluna e colocar a coluna de volta.

5 – Membrana de sílica

Centrifugar a coluna por 1 minuto a 11700 rpm. O etanol residual é removido durante esse passo.

6 – Eluir DNA puro

Colocar a coluna dentro de um *eppendorf* de 1,5 ml e adicionar 100 μ l de tampão BE* pré-aquecido a 70 °C. Incubar em temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifugar por 1 minuto a 11700 rpm.

1 Preparação das amostras	Ressuspender até 10^7 parasitos	
2 Pré-dissolução da célula da amostra		+ 200 µl de tampão T1 + 25 µl de proteinase K
3 Dissolução da célula da amostra		+ 200 µl de tampão B3 70 °C de 10 a 15 min
4 Ajuste das condições de ligamento de DNA		+ 210 µl de etanol (96 a 100 %)
5 Ligamento DNA		Colocar a coluna em um tubo de coleta e depois, colocar a amostra na coluna  Centrifugar a 11.700 rpm por 1 min
6 Lavagem na membrana de sílica		1 ^a lavagem + 500 µl de tampão BW 2 ^a lavagem + 600 µl de tampão B5 1 ^a e 2 ^a  Centrifugar a 11.700 rpm por 1 min
7 Membrana de sílica seca		Centrifugar a 11.700 rpm por 1 min
8 Eluir DNA puro		+ 100 µl de tampão BE (70 °C) Temperatura ambiente por 3 min  Centrifugar a 11.700 rpm por 1 min

Figura 20 - Método de Extração do DNA. **Adaptado da fonte:** MACHEREY-NAGEL, 2014.

3.3 Microscopia de força atômica

Os principais componentes de uma microscopia de força atômica (do inglês, Atomic Force Microscope – AFM) são: o próprio microscópio, controle eletrônicos e um computador. O AFM contém o scanner (o mecanismo para mover a ponta na amostra), suporte da amostra e um sensor de força, para segurar e monitorar a ponta do AFM equipamento. Geralmente também inclui um microscópio óptico integrado para ver a amostra e a ponta. O equipamento

AFM é suportado em uma plataforma de isolamento de vibração, que reduz o ruído e aumenta a resolução obtida. O controle eletrônico toma a forma de uma caixa conectada tanto ao microscópio quanto ao computador. Os eletrônicos são usados para gerar os sinais usados para conduzir o scanner e quaisquer outros componentes motorizados na composição do AFM. Eles também digitalizam os sinais vindos do AFM para que eles possam ser exibidos e gravados pelo computador^[47].

A sonda explora a superfície da amostra (plano XY) utilizando um método pré-programado. O controle de retorno da distância entre a sonda e a superfície da amostra (altura do eixo Z) mantém a interação mútua detectada em um nível constante para rastrear a superfície da amostra. Durante a exploração, é utilizado um computador para ler a quantidade de realimentação do eixo Z (saída de tensão para o scanner) de cada posição XY e depois processa esta informação para gerar uma imagem topográfica (3D) da superfície da amostra^[48]. Um laser de diodo é usado para manter o alinhamento óptico durante o processo de varredura.

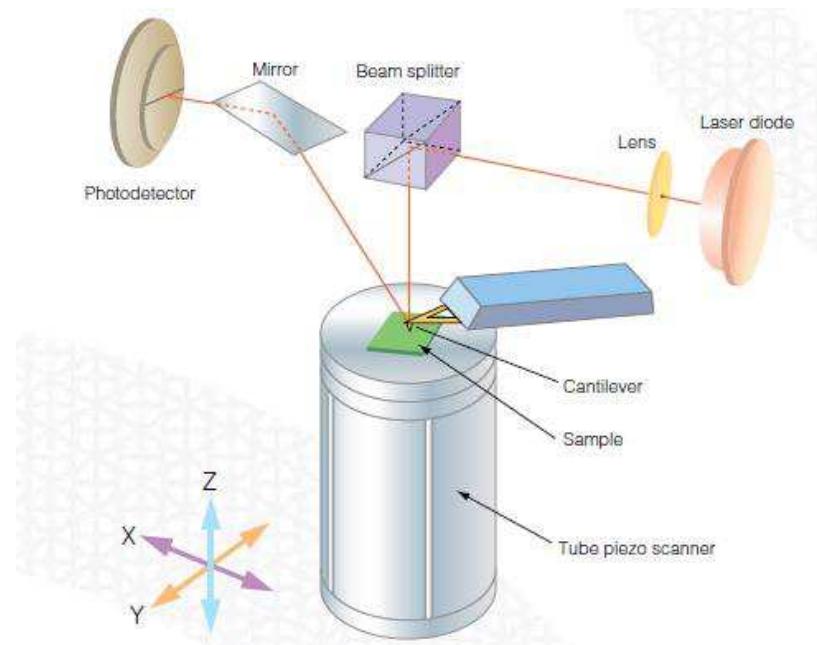


Figura 21 - Sistema operacional do AFM. **Fonte:** SHIMADZU, 2006.

Foram utilizados dois modos de medição do AFM:

- Dinâmico

Quando vibrado perto de sua frequência de ressonância, a amplitude de vibração do cantilever mudará à medida que a ponta se aproxima da superfície da amostra. Enquanto se mantém uma amplitude de vibração constante, este fenômeno é utilizado para mover o cantilever e adquirir informação de deslocamento vertical.

- Fase

O atraso de fase é detectado durante a digitalização no modo dinâmico. Isso é usado para visualizar diferenças nas propriedades de superfície da amostra.

Ressaltamos que estava presente durante a obtenção das imagens via AFM.

3.4 Espectrômetro Raman

Para efetuarmos a microscopia Raman são necessários os seguintes instrumentos: um espectrômetro dispersivo que é equipado com grades de difração cujo “range” vai desde o UV (Ultravioleta), passando pelo Visível até o Infravermelho próximo (do inglês, Near Infra-Red - NIR); detectores, fonte de excitação (lasers) com acessórios ópticos (filtros, lentes, prismas, etc.) e microscópio (micro-Raman).

Um fator importante na utilização do espectrômetro Raman é a eliminação da luz de excitação do laser. Com o uso atualmente dos detectores CCD (Charge Coupled Device) que possuem um largo “range” espectral, têm-se utilizado bons filtros, um duplo monocromador subtrativo, em primeiro estágio para eliminar o sinal do laser; ou seja, o espalhamento Rayleigh. Assim, a maioria dos espectrômetros tem utilizado a configuração de um triplo monocromador, sendo que num estágio temos o duplo monocromador numa configuração subtrativa e em outro estágio um espectrógrafo numa configuração dispersiva. Atualmente, é possível utilizar filtros Edge em lugar do duplo monocromador, barateando o equipamento (vide Figura 22).

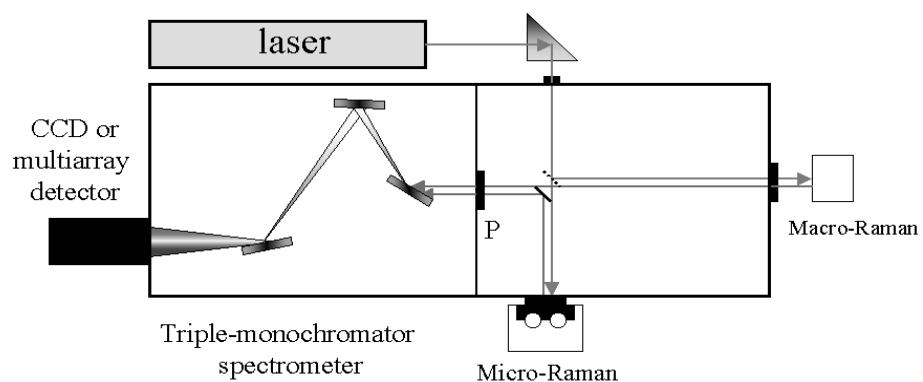


Figura 22 - Diagrama esquemático do espectrômetro Raman. **Fonte:** ARMOND, 1999.

Vale ressaltar que também estive presente na obtenção dos espectros Raman, acompanhado todo o processo, assim como organizando e colocando a montagem do material no aparelho de medição e verificando se estava tudo de acordo com o esperado.

3.5 Descrição da montagem do material

Primeiramente, fizemos aliquotagem do material biológico que recebemos do ICBIM, DNA dos parasitos *Leishmania* foram colocados em vários *eppendorfs*; cada um destes contendo 5 μ l, os quais foram armazenados num congelador.

Essa aliquotagem prévia foi feita, a fim de evitar contaminação da amostra e o seu processo de descongelar e congelar a cada momento, nas diversas medições; reduzindo assim, o risco de degradação e facilitando o seu manuseio.

O preparo das lâminas utilizadas nas medidas ópticas e de imagem, eram, devidamente higienizadas com álcool etílico e acetona e preparadas no dia anterior ao marcado para realizarmos as medidas, a fim de evitar qualquer tipo de interferência em nossos resultados.

- Lâmina de vidro – filme

Utilizamos 3 alíquotas de 5 μ l da espécie *Leishmania infantum* e depositamos sobre a lâmina de vidro, por meio de uma pipeta, da seguinte forma: depositávamos uma alíquota, esperávamos esta secar para depois depositar a próxima, e assim sucessivamente. Por fim, para termos certeza que estava completamente seco e obtido o filme, colocamos a lâmina dentro de uma placa de Petri, a envolvíamos com papel filme e fazíamos alguns furos nele para permitir que, quando colocado no dessecador sob vácuo para armazenamento, não encostasse no filme. Deixávamos no vácuo de um dia para o outro, tirando apenas no horário de medirmos. Repetimos esse procedimento para todas as amostras das seis espécies.

- Lâmina de quartzo – filme

Mesma situação do item anterior.

- Lâmina de ouro pulverizado – filme

Mesma situação do item anterior.

- Lâmina de sílica – filme

Nesta preparação, após o processo já descrito para a higienização, também utilizamos banho de ultrassom para a higienização da lâmina.

- Lâmina de plástico + tubo de microcentrífuga (*eppendorf*) – solução

Recortamos o fundo de um *eppendorf* e furamos a superfície da lâmina de acordo com o diâmetro do recorte e unimos os dois. Pingávamos 3 alíquotas no fundo do *eppendorf* no momento, no momento das medidas, para evitar contaminação. Repetimos esse processo para todas as espécies.

- Lâmina com poços pulverizada em ouro - solução

Utilizamos uma lâmina de vidro mais espessa, com a qual foi possível fazer alguns poços, com a ajuda de uma broca óptica, e depois pulverizando ouro sobre toda ela. Quando das medidas, pingávamos uma alíquota em um dos poços e fazíamos as medições. Caso necessário, colocávamos mais 2 ou 3 μl e depois continuávamos medindo. Repetimos esse processo para todas as espécies.

OBS.: Sempre usamos uma lâmina ou poço diferente para cada medição efetuada.

De maneira sequencial, fizemos o obtenção dos espectros para cada uma das montagens descritas acima, porém ao analisa-las, vimos que apenas ao chegarmos na última montagem é que obtivemos resultados possíveis de serem analisados, por isso, utilizamos apenas ela na construção dos nossos resultados e discussões.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Determinação da relação A_{260 nm}/A_{280 nm}

Através do espectro de absorção óptica caracterizamos qualitativamente os DNAs extraídos por meio da relação de absorção em 260 nm e 280 nm, que, segundo a literatura, o valor ideal é em torno de 1,8^[46]. Também determinamos a concentração de DNA em cada amostra por espectrofotometria, obtidas pelo equipamento NanoDrop 1000 Spectrophotometer^[50]. As amostras foram, então, acondicionadas a -20 °C. Os valores encontrados para as seis espécies estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração e relação “ótima” para as seis espécies de *Leishmania*.

AMOSTRAS DNA		Concentração (ng/μl)	Relação “ótima” (A _{260 nm} /A _{280 nm})
Código / denominação			
Friedlin	<i>L. major</i>	1,6	1,58
B401	<i>L. infantum</i>	2,4	1,48
Ba199	<i>L. amazonensis</i>	1,9	1,10
2903	<i>L. braziliensis</i>	21,1	1,85
4147	<i>L. guyanensis</i>	62	2,12
DD8	<i>L. donovani</i>	34,4	2,09

A amplificação do DNA dos parasitos foi realizada pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A PCR é um método de amplificação, que permite amplificar várias vezes uma região específica do DNA. A Figura 23 mostra o fragmento do DNA amplificado e

resolvido em gel de poliacrilamida 6%, corado pelo nitrato de prata, confirmando que todas as amostras pertencem ao gênero *Leishmania*.

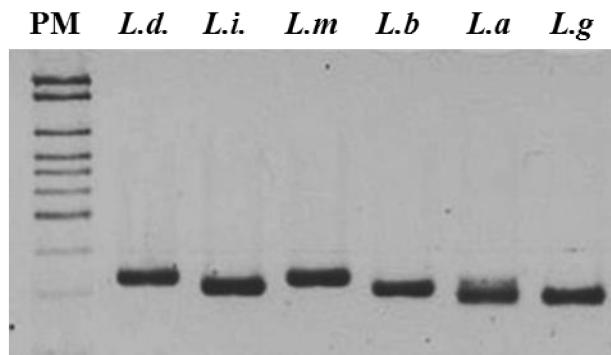


Figura 23 - Gel de poliacrilamida 6% demonstrando o produto da PCR realizada em DNA extraído de cultura axênicas de *L. donovani* (*L.d.*); *L. infantum* (*L.i.*); *L. major* (*L.m.*); *L. braziliensis* (*L.b.*); *L. amazonensis* (*L.a.*) e *L. guyanensis* (*L.g.*). PM – Marcador de peso molecular.

A fim de confirmar a integridade das amostras de DNA das espécies de *Leishmania* em estudo, medimos a absorção das espécies apresentadas na Tabela 1, em nosso laboratório, utilizando outro espectrofotômetro, e retiramos desses a relação “ótima” como parâmetro de controle. Por exemplo, a Figura 24 apresenta o espectro de absorção óptica e tal relação, para a espécie *L. amazonensis*.

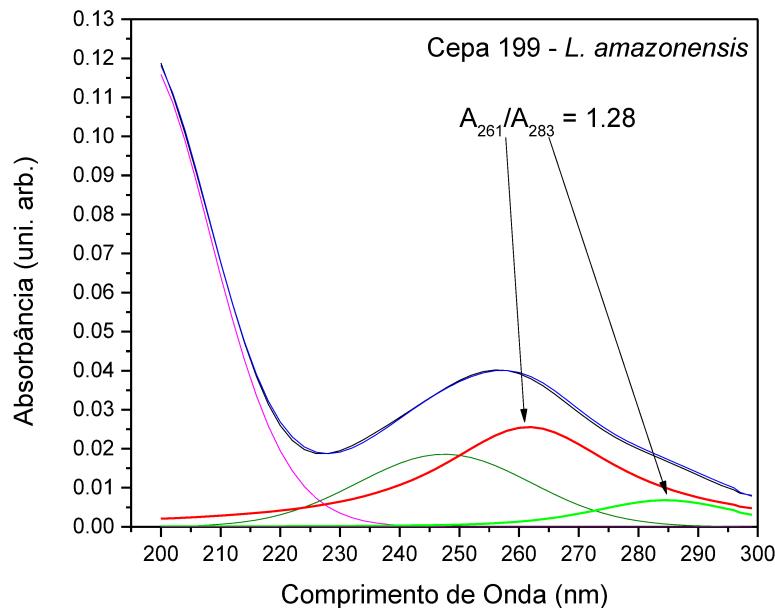


Figura 24 - Espectro de absorção óptica da espécie *L. amazonensis* e sua relação A_{260}/A_{280} .

O espectro de absorção para todos os DNAs das seis espécies de *Leishmania* possuíram a mesma forma de linha e, confirmamos a **relação “ótima”** ($A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$). Para o caso da *L. amazonensis* obtivemos 1.28 das nossas medidas de absorção óptica, que está em acordo com o resultado obtido por espectrofotometria (via NanoDrop) de 1.10. Assim, confirmamos a integridade das amostras.

4.2 Imagem de AFM do parasito *L. infantum*

Como validação das amostras, ou seja, para termos certeza que estávamos medindo o parasito antes de aplicarmos a técnica Raman, obtivemos a imagem AFM do mesmo antes de passar por todo o processo de extração do DNA. Exemplificando, a imagem do parasito *L. infantum* foi obtida no equipamento SPM-9600^[48], com área de 50 $\mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ (área varrida), no modo dinâmico (Figura 25) e com obtenção de imagem de fase (Figura 26).

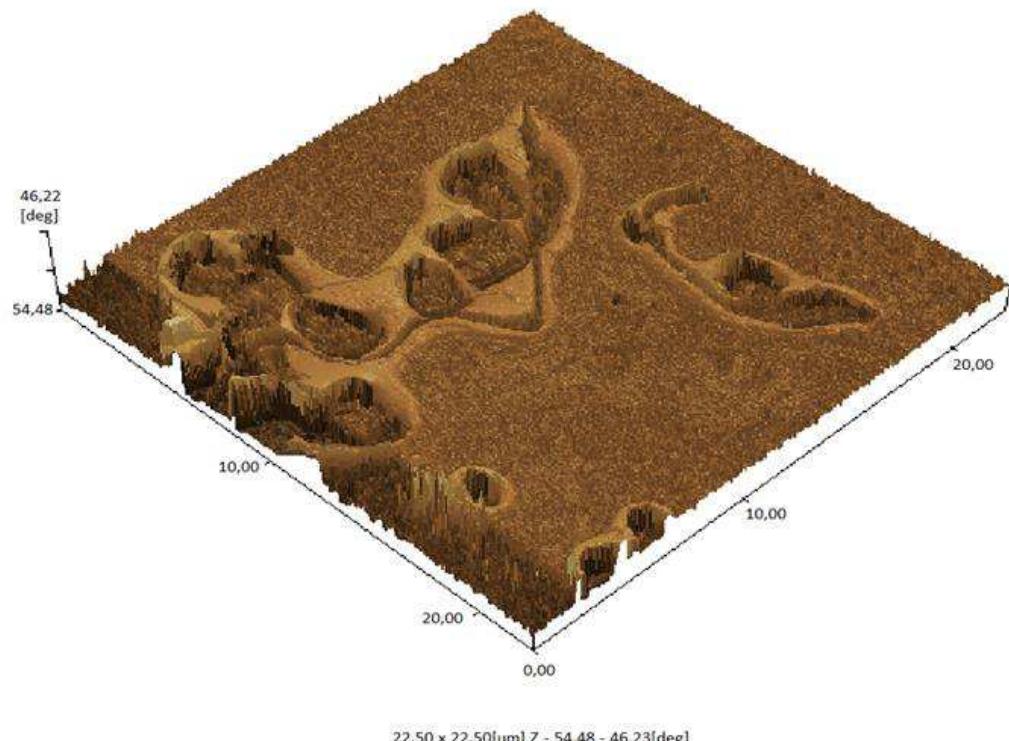


Figura 25 - Imagem topográfica via AFM da espécie *L. infantum*.

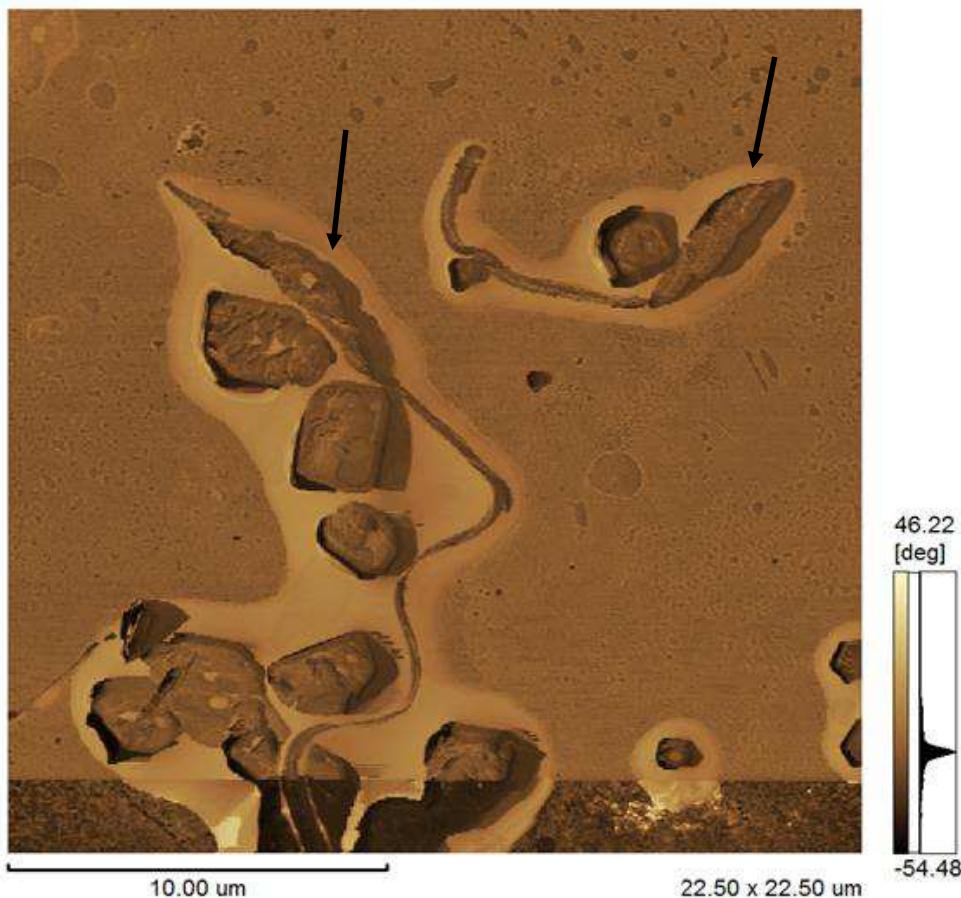


Figura 26 - Imagem de fase via AFM da espécie *L. infantum*.

Observando a Figura 26 podemos aferir que o parasito está em sua forma promastigota e, os dois parasitos indicados pelas setas, possuem tamanho aproximado de 12 e 23 μm , dentro do valor estipulado na literatura.

4.3 Caracterização Raman

Os espectros Raman foram obtidos no equipamento LabRAM HR Evolution – Raman Spectrometer^[51], que possui como detector, uma câmara CCD acoplada. As amostras foram analisadas na configuração micro-Raman, usando como excitação as linhas de laser 325, 532, 633 e 785 nm. A potência média chegando nas amostras foi menor que 10 microwatts. A objetiva usada foi de 10x, grade de 1800 gr/mm para as linhas de laser em 325 e 532 nm e grade de 600 gr/mm para as linhas 633 e 785 nm.

Na Figura 27 podemos observar o espectro normalizado de cada uma das seis amostras de *Leishmania*, para todas as linhas de laser utilizadas, na região de 50 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} .

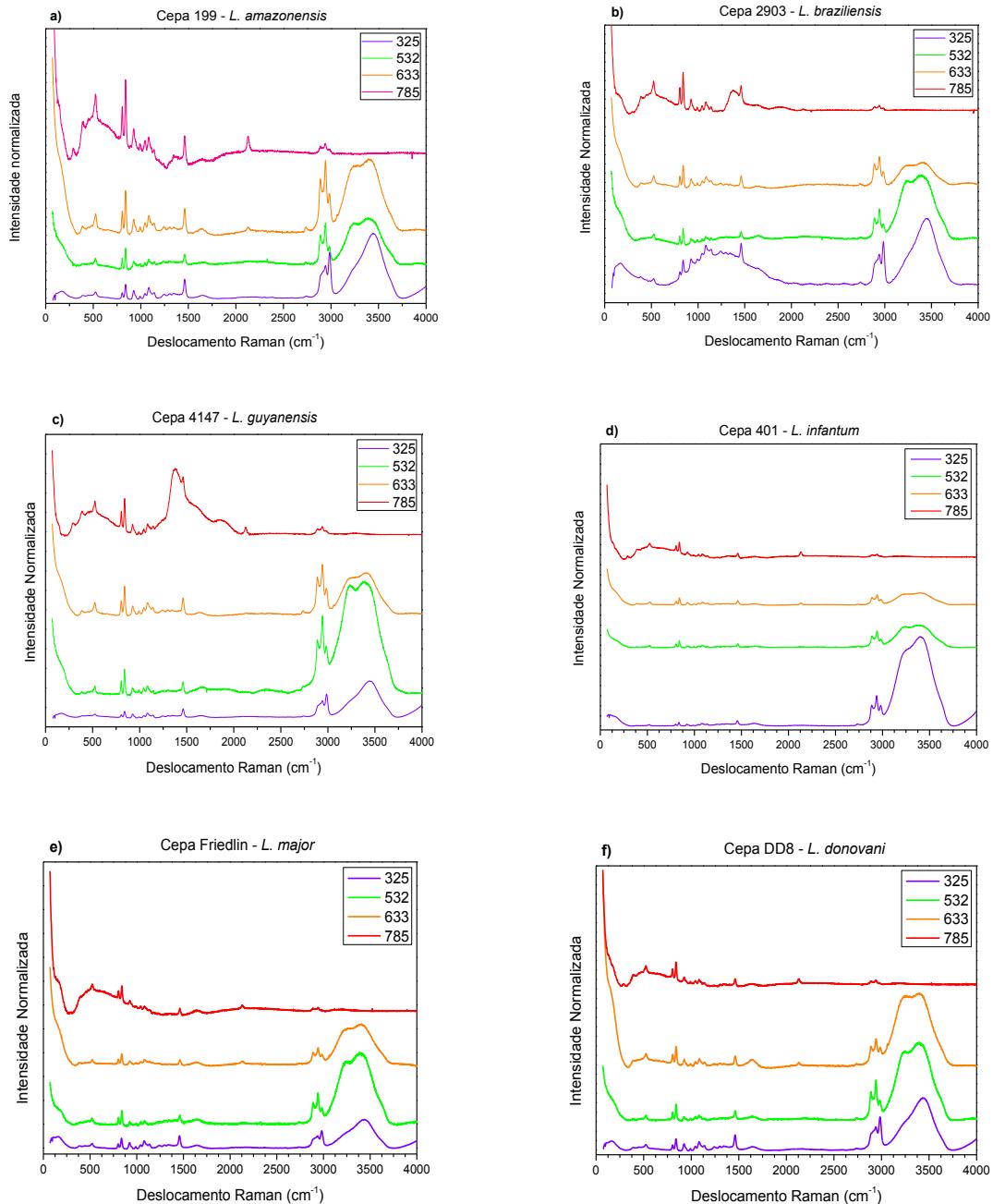


Figura 27 - Espectros Raman para as seis espécies de *Leishmania*. **a)** *L. amazonensis*; **b)** *L. braziliensis*; **c)** *L. guyanensis*; **d)** *L. infantum*; **e)** *L. major*; **f)** *L. donovani*. Região de 50 a 4000 cm^{-1} . Excitação do laser 325 nm, 532 nm, 633 nm e 785 nm.

Consideraremos a análise espectral, na região de 50 a 3050 cm^{-1} , já que o detector usado é uma CCD que não possui boa resolução na região de excitação próxima ao infravermelho; no nosso caso, para a linha de laser em 785 nm. Os espectros foram normalizados, considerando a

vibração em torno de 840 cm^{-1} , que não varia a sua forma de linha em todas as linhas de laser de excitação.

Em todos os espectros observamos bandas abaixo de 2000 cm^{-1} e acima de 2700 cm^{-1} . Biomoléculas naturais não possuem nenhum sinal Raman na região de 1800 cm^{-1} a 2700 cm^{-1} , chamada de “região-Raman silenciosa” da célula, de acordo com a Literatura^[52]. Essa é uma região de ligações triplas entre grupamentos químicos contendo carbonos.

Entre 2000 e 2700 cm^{-1} temos a presença das vibrações de estiramento dos grupamentos, CH , CH_2 , CH_3 , NH , NH_2 e OH , presentes nas amostras de DNA das espécies de *Leishmania*.

Em todos os espectros vibracionais observamos claramente quatro regiões bem definidas: a região de maior energia compreendida entre 3600 e 2700 cm^{-1} , na qual encontramos os estiramentos – CH , – NH e outros estiramentos. Na região entre 2000 a 600 cm^{-1} encontramos a descrição de variações angulares pertencentes aos agrupamentos – NH_2 , – CH_2 . Já na região de baixa energia compreendida entre 600 a 100 cm^{-1} podemos descrever as vibrações correspondentes aos anéis das pentoses e o grupamento fosfato. Os modos de torção da cadeia podem ser encontrados também abaixo de 100 cm^{-1} .

Considerando que não existe variação nas formas de linha das espécies em função da linha de laser na região do visível, escolhemos os espectros da linha de excitação em 633 nm , para tentarmos identificar os modos normais de vibração presentes no DNA das seis espécies selecionadas nesse trabalho. Assim, dividimos a nossa análise em quatro regiões, a saber: **Região I** – 50 a 890 cm^{-1} ; **Região II** – 890 a 1190 cm^{-1} ; **Região III** – 1190 a 1890 cm^{-1} e **Região IV** – 1890 a 4000 cm^{-1} .

Em primeiro lugar, fizemos ajustes das regiões espectrais selecionadas, utilizando o programa PeakFit Version 4.12, com funções lorentzianas, que descrevem a amplitude das oscilações em função da energia, tendo o oscilador harmônico como modelo físico.

A equação matemática para uma função lorentziana (amplitude) é

$$y = \frac{a_0}{1 + \left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2}, \quad (63)$$

onde: a_0 = amplitude; a_1 = centro e a_2 = largura do pico.

4.3.1 Região I – 50 a 890 cm⁻¹

Essa região corresponde aos modos de deformação de vários grupamentos químicos dos DNAs, bem como modos vibracionais da cadeia como um todo. Podemos ver nos nossos ajustes que nessa região temos a presenças de sete lorentzianas, mostradas na Figura 28.

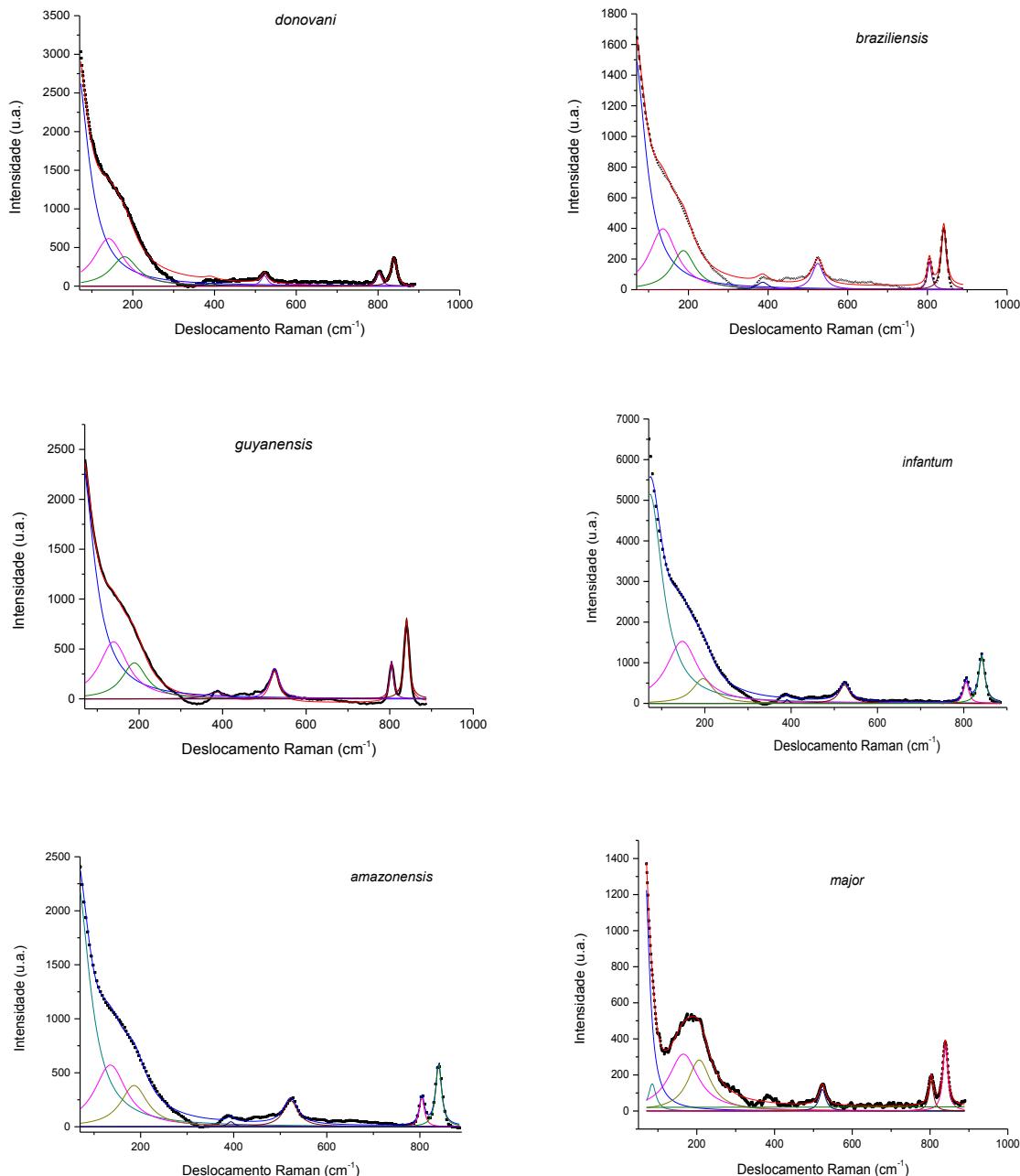


Figura 28 - Ajustes com lorentzianas para a região entre 50 e 890 cm⁻¹ para as seis espécies de *Leishmania*.

4.3.2 Região II – 890 a 1190 cm⁻¹

Essa região corresponde aos modos vibracionais do anel da pentose e do grupamento fosfato, presentes na estrutura dos DNAs, esquematizados na Figura 29.

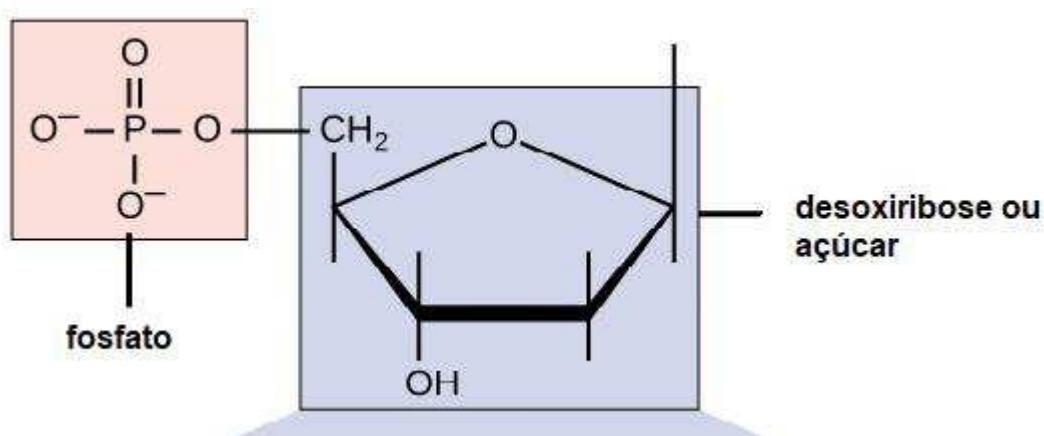
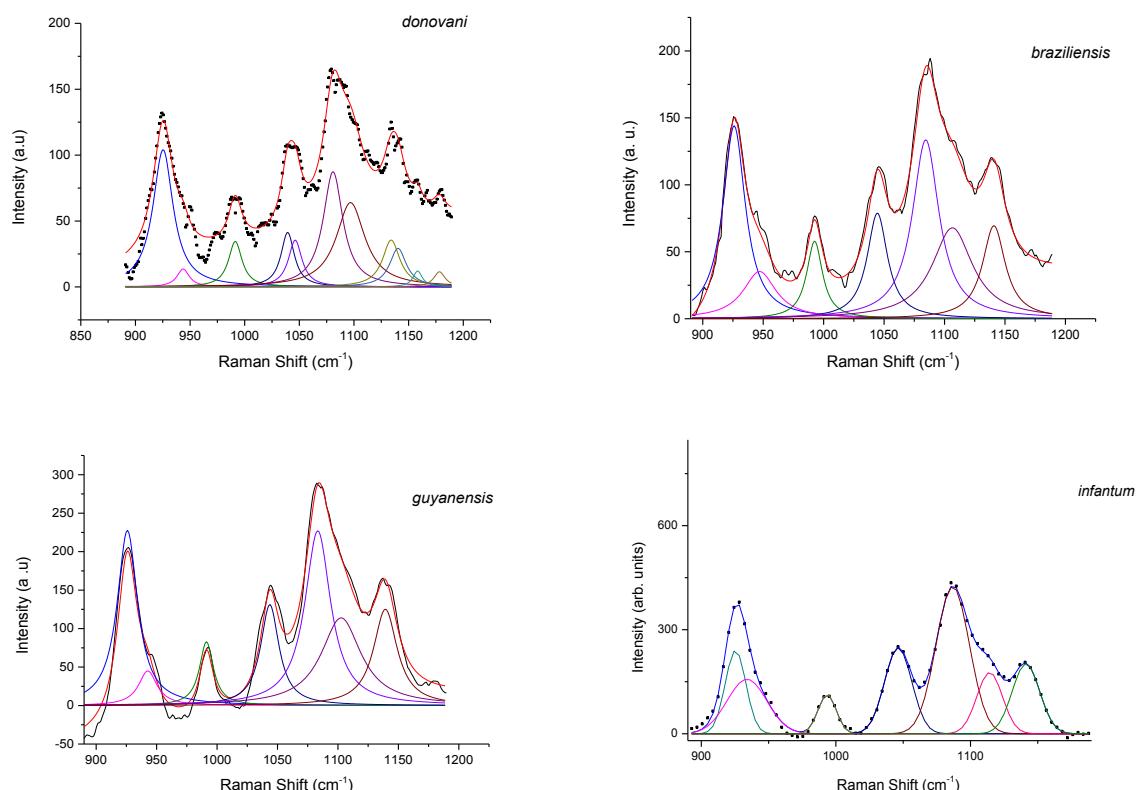


Figura 29 - Partes do DNA com os principais modos vibracionais na região 890 a 1190 cm⁻¹. Adaptado de http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg.

Novamente, foram necessários sete lorentzianas para o ajuste dessa região. Podemos observar nos espectros da Figura 30 um modo vibracional intenso, correspondente ao estiramento do ânion PO_2^- em torno de 1080 cm⁻¹.



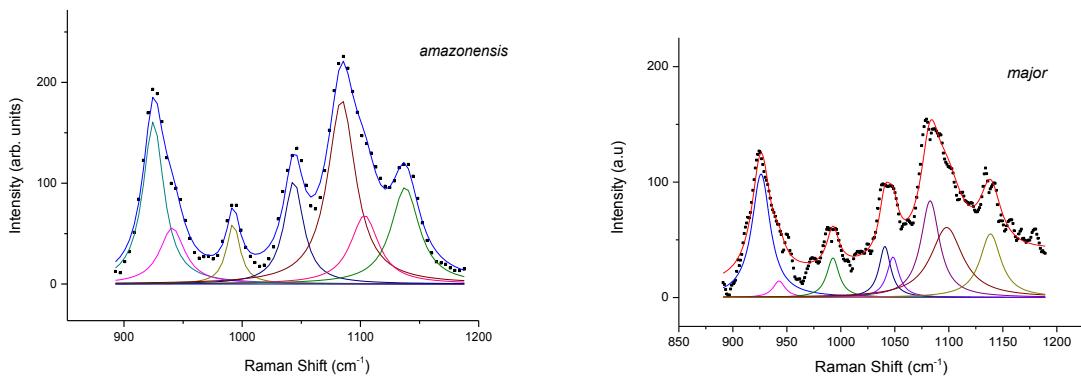


Figura 30 - Ajustes com lorentzianas para a região entre 890 e 1190 cm^{-1} para as seis espécies de *Leishmania*.

4.3.3 Região III – 1190 a 1890 cm^{-1}

Essa região corresponde aos modos vibracionais do anel da pentose e das bases, presentes na estrutura dos DNAs, vistos na Figura 31. Os modos vibracionais são superpostos para essa região.

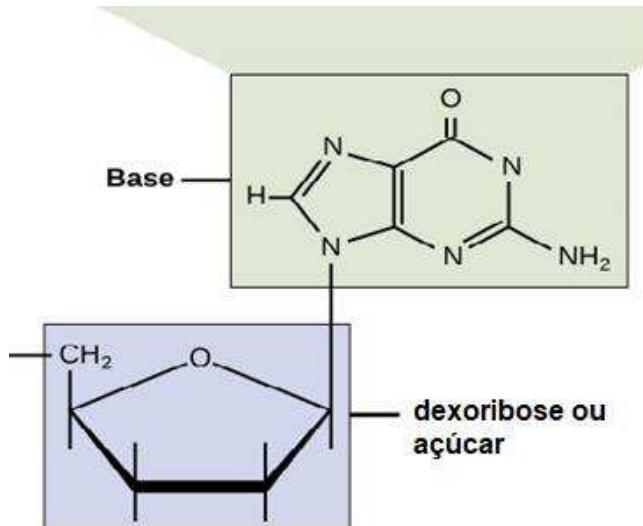


Figura 31 - Partes do DNA com os principais modos vibracionais na região 890 a 1190 cm^{-1} . Adaptado de http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg.

Nessa região podemos observar os modos vibracionais de estiramento correspondentes as ligações C = C, C = O e C = N, acoplados com os modos de deformação angular (δ) dos grupos H – N – H e H – C – H. Foram necessárias, novamente, sete lorentzianas para o ajuste dessa região, conforme Figura 32.

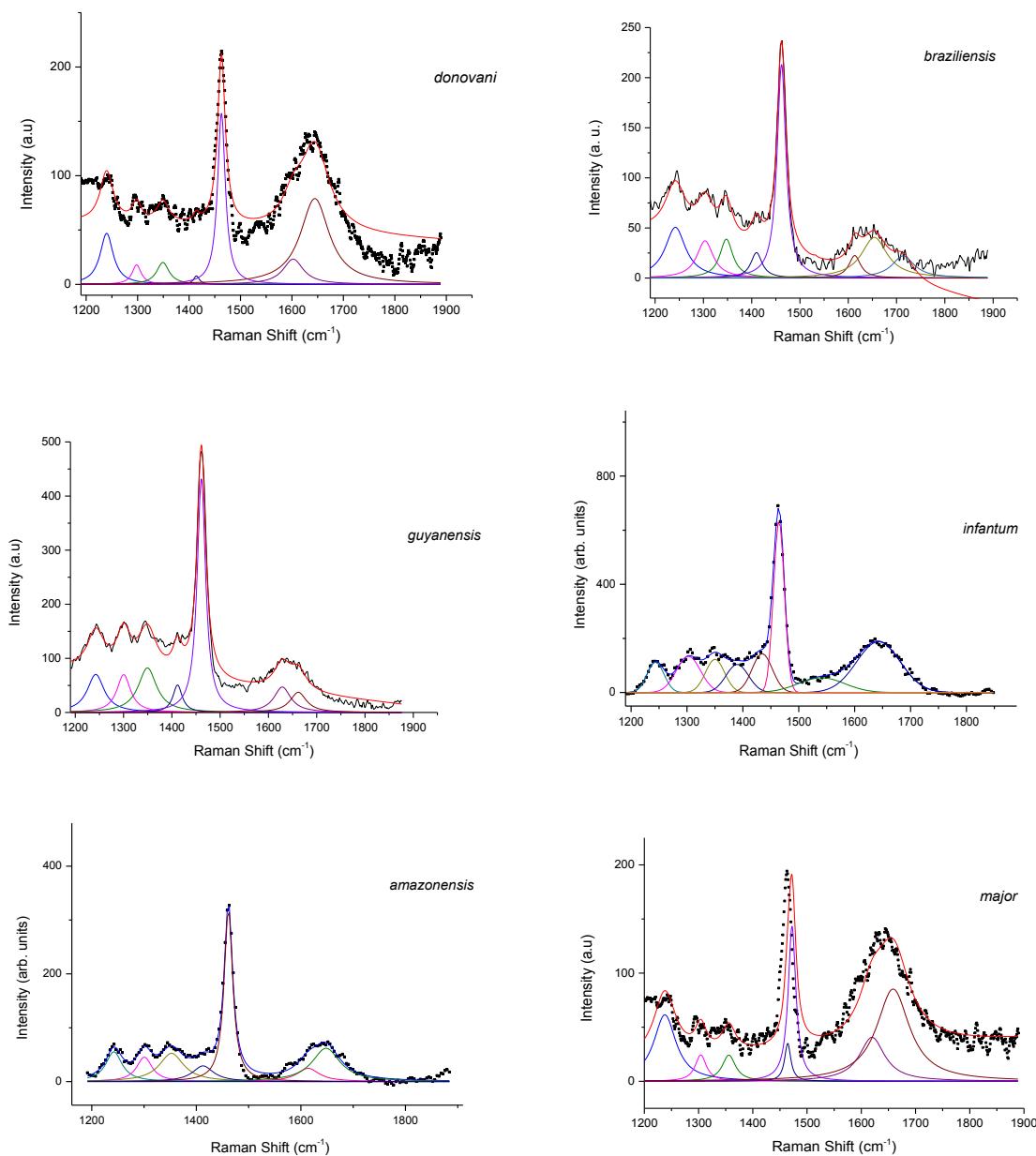


Figura 32 - Ajustes com lorentzianas para a região entre 1190 e 1890 cm⁻¹ para as seis espécies de *Leishmania*.

4.3.4 Região IV – 1890 a 4000 cm⁻¹

Essa região corresponde aos modos vibracionais de estiramento dos grupos OH, NH e CH, presentes na estrutura dos DNAs, conforme Figura 33.

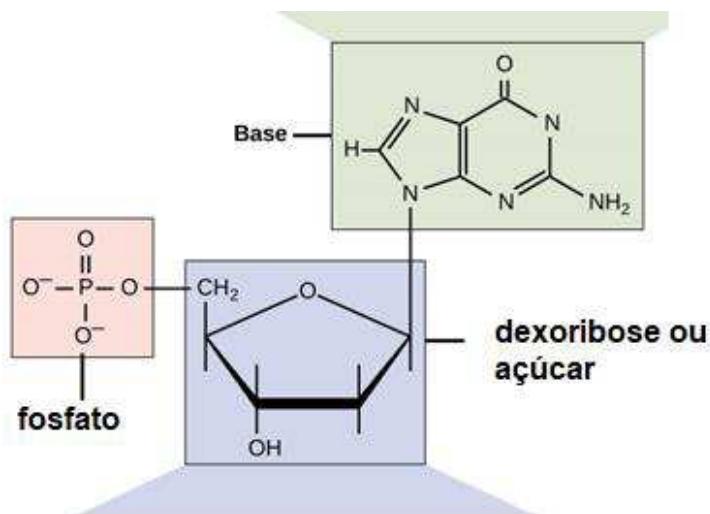
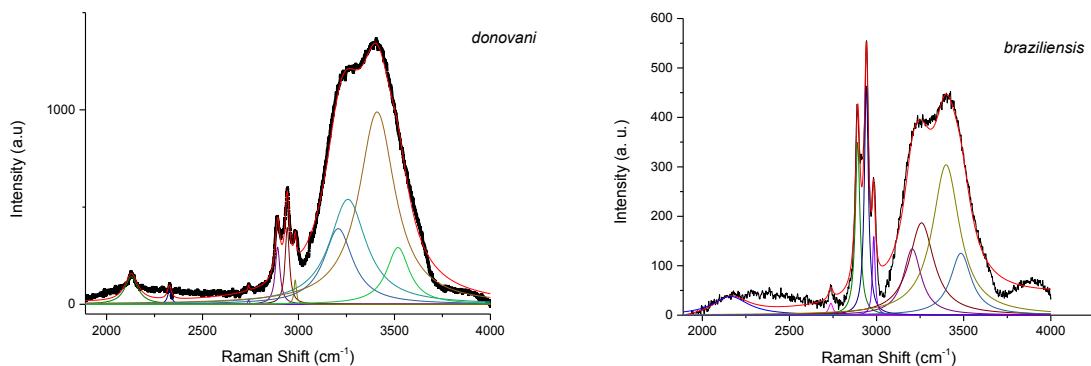


Figura 33 - Partes do DNA com os principais modos vibracionais na região 890 a 1190 cm⁻¹. **Adaptado** de http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg.

Os modos normais de vibração, correspondentes ao estiramento O – H, foram encontrados na região de 3200 cm⁻¹ a 3400 cm⁻¹. Já o modo vibracional em torno de 3550 cm⁻¹ corresponde ao modo de estiramento O – H da água de hidratação presente na solução.

Referente aos modos normais de vibração de estiramento de N – H, foram observados na região de 3100 cm⁻¹ a 3200 cm⁻¹; correspondentes aos estiramentos simétricos e assimétricos, respectivamente.

Os modos de estiramento C – H foram observados na região de 2880 cm⁻¹ a 3000 cm⁻¹. Para o ajuste dessa região foram necessárias entre dez e doze lorentzianas, como vemos na Figura 34.



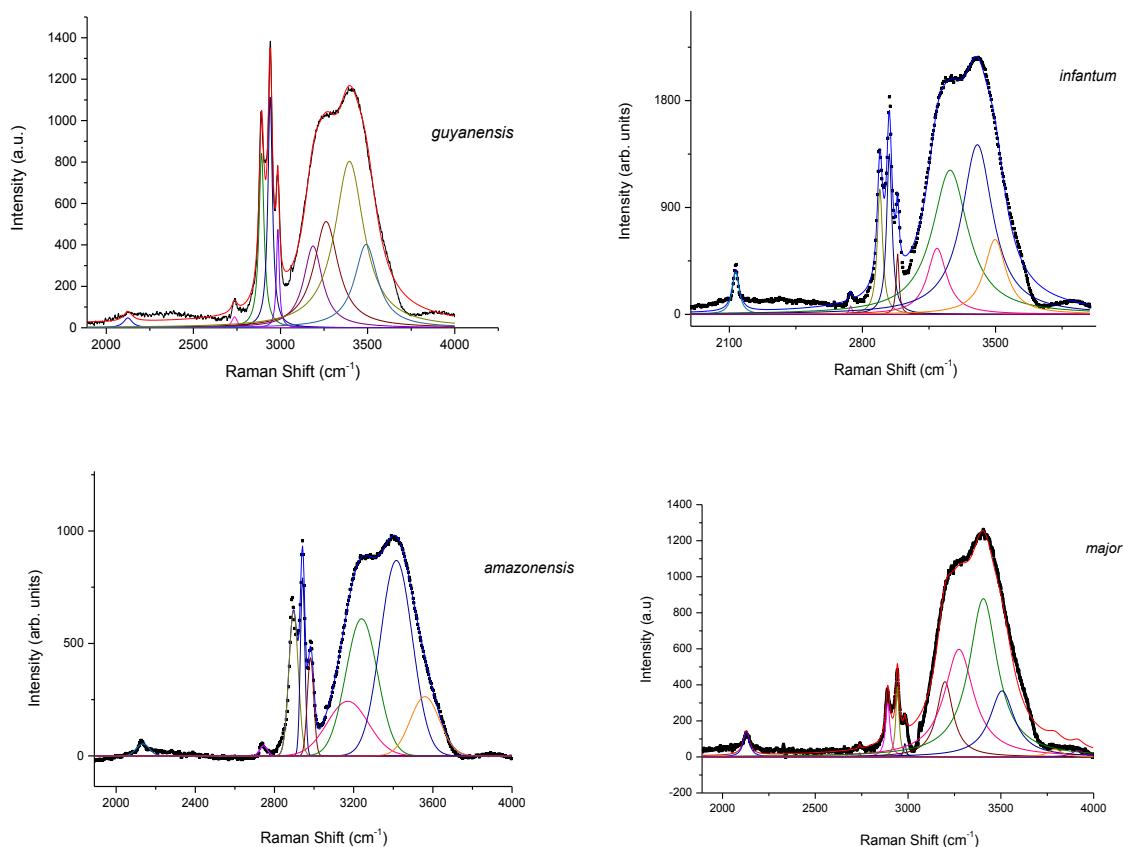


Figura 34 - Ajustes com lorentzianas para a região entre 1890 e 4000 cm^{-1} para as seis espécies de *Leishmania*.

A tentativa de atribuição dos modos normais de ligação, bem como a localização de cada base, está apresentada na Tabela 2. Nessa tabela, foi colocado o valor de cada lorentziana encontrada para cada espécie de *Leishmania* e comparadas com os valores encontrados na literatura. Em seguida, fizemos a atribuição dos modos e especificação das bases. As letras gregas representam: vs = estiramento simétrico; vas = estiramento assimétrico; δ = deformação; ρ = modos angulares. Considerando o erro experimental no deslocamento Raman de 2 cm^{-1} , podemos observar que em todas as espécies de *Leishmania*, temos a presença dos mesmos modos normais de vibração.

Tabela 2 - Deslocamento Raman para as espécies de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. donovani* e *L. major* e a tentativa de atribuição dos modos de vibração, comparados com a literatura.

Raman Shift (cm ⁻¹)	Modo vibracional
70	Torção da cadeia ^[57]
149	Torção do grupo COOH ^[54, 55, 56] , Guanina ^[60]
196	C-N vibração de torção ^[54, 55, 56] , Citosina ^[60]
389	$\rho(\text{OH})\text{OH}$ ^[60] , Guanina ^[57]
523	$\delta(\text{CCN/CCC/OCC})$ ^[60] ; Adenina ^[57] , Citosina ^[14] , Guanina ^[14]
806	$\text{vs}(\text{CN})$ ^[60] ; Citosina ^[57] , Timina ^[57] , Guanina ^[14] , estiramento fosfodiéster (C-O-P-O-C) ^[61]
841	δ ^[60] (NH_2) wagging ^[57] , Guanina ^[14]
924	$\text{vs}(\text{CC})$ ^[60] ; Adenina ^[57]
940	$\text{vs}(\text{CN})$ ^[60] ; C-C estiramento (α -hélix) ^[57] , Adenina ^[14] , Citosina ^[60]
991	$\text{vs}(\text{OH})$ ^[57] ; Timina ^[14] , Citosina ^[14]
1042	δ (HNH) wagging + $\rho(\text{CH}_2)$ ^[60] ; CH deformação no plano ^[57] , Citosina ^[14] , Guanina ^[14]
1085	$P\text{O}_2^-$ estiramento ^[54, 55, 56]
1105	δ (HOC) + $\text{vs}(\text{CN+CC})$ ^[60] ; Deformação HCH ^[57] , Guanina ^[14]
1117	δ (NH) ^[60] ; CN estiramento ^[57] , Citosina ^[14] , Adenina ^[14]
1136	$\text{vs}(\text{CN})\text{s}$ + δ (NH2)twist ^[60] ; CN estiramento ^[57] , Citosina ^[57]
1140	$\nu(\text{CN})$ ^[60] ; C-C estiramento ^[54, 55, 56] ; Adenina ^[57] , Timina ^[57]
1242	δ (HCH) + δ (COH) ^[60] ; Citosina ^[57] , Guanina ^[57] , Adenina ^[57]
1301	δ (HCH)twist ^[60] ; α -hélix ^[58] , Adenina ^[57] , Guanina ^[57]
1352	δ (HCH) + δ (COH) ^[60] ; Timina ^[57] , Adenina ^[57] , Guanina ^[57] , Citosina ^[14]
1388	δ (COH) ^[60] ; Estiramento simétrico CH_2^- ^[54, 55, 56] , Timina ^[14] , Adenina ^[14] , Guanina ^[14]
1411	δ (HNH) ^[60] ; Estiramento simétrico CH_2^- ^[54, 55, 56] , Timina ^[14] , Adenina ^[14] , Guanina ^[14] , Citosina ^[14]

1435	δ (HNH) ^[60] ; C–H vibração de deformação ^[54, 55, 56] , Adenina ^[57] , Guanina ^[57] , Timina ^[14] , Citosina ^[14]
1465	δ (HCH) ^[60] ; C–H ₂ deformação de modos ^[54, 55, 56] , Adenina ^[57] , Guanina ^[57]
1529	δ (HCH) ^[60] ; Adenina ^[57] , Guanina ^[14] , Citosina ^[14]
1616	δ (HNH) ^[60] ; vs(C=O) ^[60] ; C=C estiramento ^[57] , Timina ^[57] , Guanina ^[57] , Citosina ^[57] , Adenina ^[14]
1644	vs(C=O ^[60] - α -helix) ^[57] , Timina ^[14] , Guanina ^[14] , Citosina ^[14]
1647	vs(C=C) ^[57] ; H ₂ O ^[57] , Citosina ^[57] , Timina ^[57] , Guanina ^[57]
2131	vs ^[60] CH – CH ₃) ^[54, 55, 56]
2741	vs ^[60] CH) ^[54, 55, 56]
2894	vs(CH) ^[60] ; CH ₂ estiramento simétrico ^[57]
2941	vs(CH) ^[60] ; CH ₂ estiramento assimétrico ^[57]
2981	vas(CH) ^[60] ; CH ₃ ^[54, 55, 56] estiramento assimétrico ^[57]
3166	vs(NH) ^[60] ; NH ₃ estiramento simétrico ^[57]
3193	vs(NH) ^[60] ; NH ₂ estiramento simétrico ^[57]
3260	vs(OH) ^[60] ; OH estiramento simétrico ^[57]
3402	vas(OH) ^[60] ; OH estiramento assimétrico ^[57]
3413	vs(NH) ^[60] ; NH estiramento simétrico ^[57]
3496	vas(NH) ^[60] ; NH estiramento assimétrico ^[57]
3559	OH estiramento simétrico (água de hidratação) ^[59]

Ainda no intuito de identificar as seis espécies de *Leishmania* foi analisado a intensidade relativa das bandas em torno de 1650 cm⁻¹, que corresponde aos modos das ligações duplas de carbono dos anéis das bases e do ânion fosfato em ~1090 cm⁻¹. Esses dados foram colocados na Figura 35.

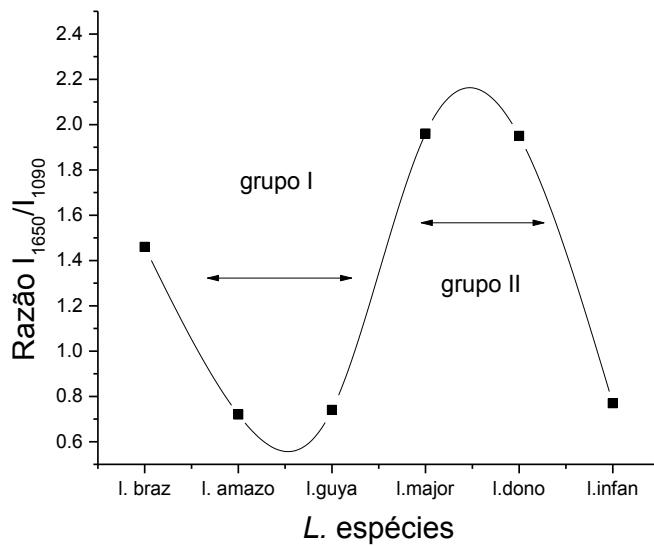


Figura 35 - Razão I_{1650}/I_{1090} para as seis espécies de *Leishmania*.

Podemos observar no gráfico da Figura 35 que podemos agrupar as seis espécies de *Leishmania* em dois grupos: **Grupo I**, composto por *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e **Grupo II**, composto por *L. major*, *L. donovani* e *L. infantum*.

- Os parasitos *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* são causadores de lesões na pele, a chamada LEISHMANIOSE CUTÂNEA → estão no **Grupo I**.

- Os parasitos *L. donovani* e *L. infantum* são causadores da LEISHMANIOSE VISCERAL que ataca outros órgãos (fígado, rins, etc) → estão no **Grupo II**.

Já a *L. major*, que normalmente causa a LEISHMANIOSE CUTÂNEA, também está no **Grupo II**. Isso acontece porque há relatos na literatura de *L. major* causando LV em humanos, sugerindo um parasito híbrido *L. major/L. infantum*; assim, faz sentido a sua colocação nesse grupo^[62].

Agora, pensando em relação à origem das espécies:

- As que deram a **menor** proporção relativa em intensidade I_{1650}/I_{1090} são originadas do NOVO MUNDO (Américas) → *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. infantum*;

- As que deram a **maior** proporção relativa em intensidade I_{1650}/I_{1090} são originadas do VELHO MUNDO (Europa e Ásia) → *L. donovani* e *L. major*^[63].

Para confirmar a separação em grupo das espécies de *Leishmania*, fizemos novas análises na região de vibração das ligações duplas de carbono, com os átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio, presentes nos grupamentos que compõem a estrutura dos DNAs.

4.3.5 Região de ligações duplas entre carbono e carbono; oxigênio; nitrogênio C=(C, O, N)

Os espectros apresentados na Figura 36, no intervalo entre 1500 a 1800 cm^{-1} , para as seis espécies de *Leishmania* aqui analisadas, apresentam uma banda larga em toda a região. Abaixo de 1600 cm^{-1} observamos uma banda para as espécies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. major* e *L. amazonensis*, identificada como sendo a região de vibração dos anéis presentes no DNA. Já no intervalo entre 1600 e 1700 cm^{-1} , de acordo com os nossos ajustes, essa banda pode ser decomposta em três lorentzianas e foram assim identificadas:

Lorentziana 1 – $1630 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$: ligação dupla C=C

Lorentziana 2 – $1654 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$: ligação dupla C=N

Lorentziana 3 – $1686 \pm 3 \text{ cm}^{-1}$: ligação dupla C=O

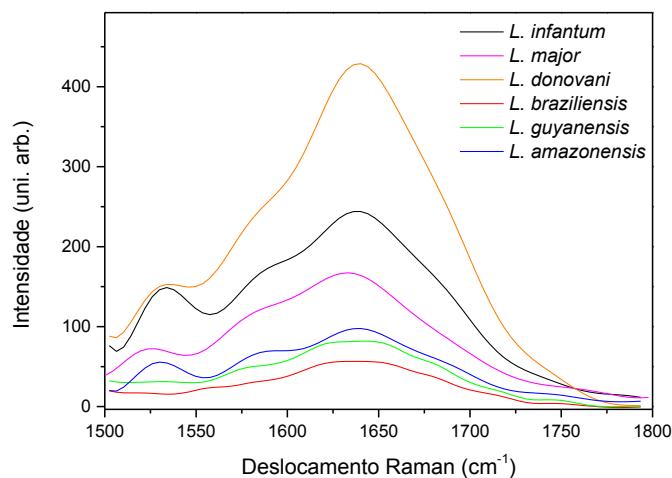


Figura 36 - Região de ligações duplas do carbono: C=C, C=N e C=O para as seis espécies de *Leishmania*.

A Figura 37 apresenta o deslocamento Raman e o erro, para cada espécie de *Leishmania* em estudo.

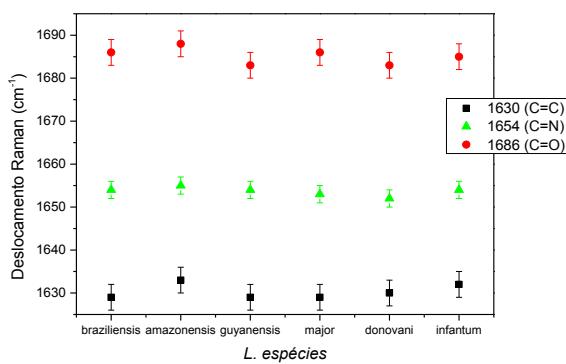


Figura 37 - Variação do deslocamento Raman para cada espécie de *Leishmania*.

Podemos observar uma variação aproximadamente constante, no deslocamento Raman, das vibrações correspondentes às ligações duplas do carbono, presentes na estrutura dos DNAs, para todas as espécies de *Leishmania* em estudo.

Nessa região de ligações duplas entre o carbono e os átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio, fizemos gráficos da intensidade (a), da variação de deslocamento Raman (b) e da relação de áreas das lorentzianas (c) para cada espécie.

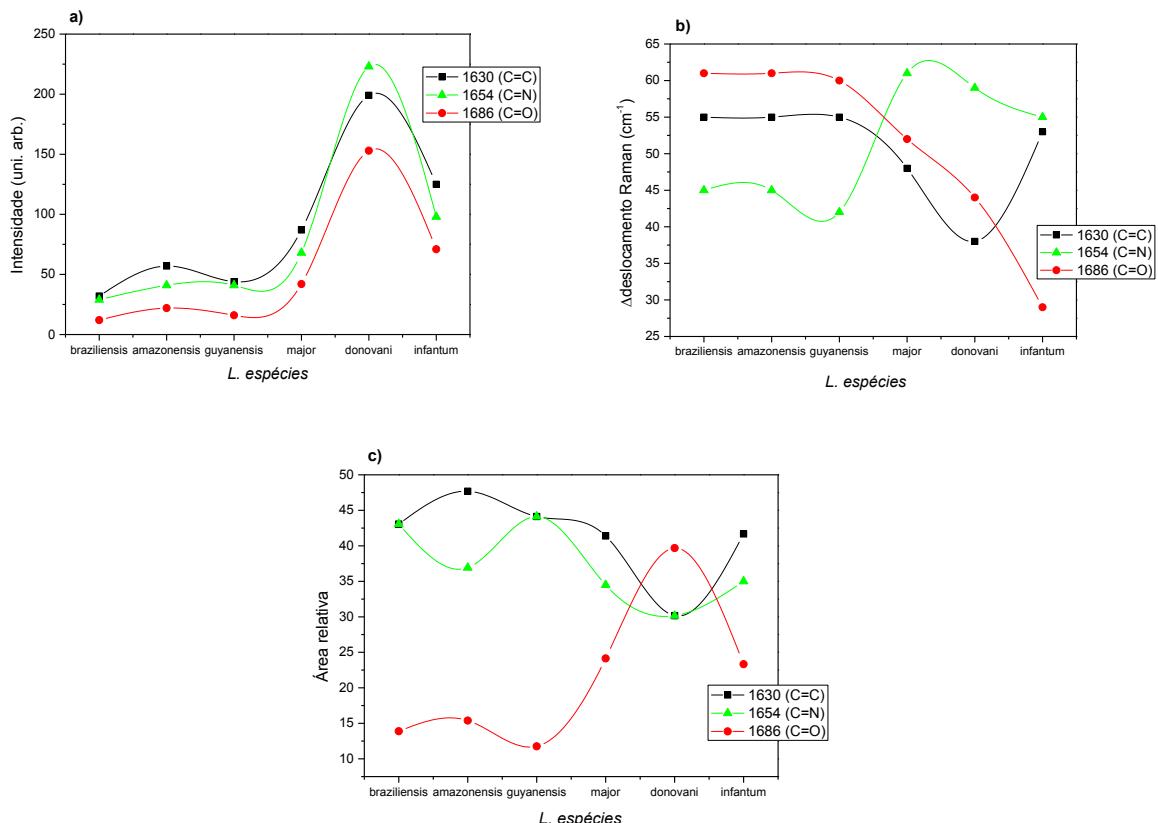


Figura 38 - Intensidade (a), variação de deslocamento Raman (b) e relação de áreas (c) das lorentzianas em 1630 cm^{-1} , 1654 cm^{-1} e 1686 cm^{-1} , para cada espécie de *Leishmania*.

Na Figura 38 podemos observar que existe um mesmo comportamento em dois grupos diferentes. As espécies de *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* – **Grupo I** – e as espécies de *Leishmania major*, *L. donovani* e *L. infantum* – **Grupo II**.

Na Figura 38a) podemos observar que as espécies definidas como Grupo I, possuem maior número de vibrações C=C. Para os Grupos I e II, observamos que o número de ligações C=O é menor do que o número de ligações C=C e C=N.

A espécie *L. donovani* possui um maior número de ligações C=N (Figura 38a)) que as demais espécies indicando um menor número de conformações, dada pelo mínimo na Figura 38c) – área relativa. Já o número de ligações duplas C=O para essa espécie, está em maior número indicando diversas conformações desse grupamento, dada pelo máximo na Figura 38c).

A espécie *L. amazonensis* possui um número equivalente de ligações C=C, C=N e C=O; porém, as ligações C=N apresentam uma menor variação na sua conformação, como mostrado Figura 38c).

A espécie *L. infantum*, possui uma predominância de ligações C=C e C=N na estrutura do seu DNA e um número menor de ligações C=O, porém com menor variação de conformação.

As ligações duplas C=C e C=N por estarem separadas de ~ 24 cm^{-1} , possuem maior variação nas curvas apresentadas Figura 38a), b) e c).

Observamos ainda que, confirmando nossa afirmação anterior, cada grupo representa um tipo diferente de infecção, isto é, um grupo é responsável pela leishmaniose cutânea enquanto o outro grupo pela leishmaniose visceral, conforme Figura 39.

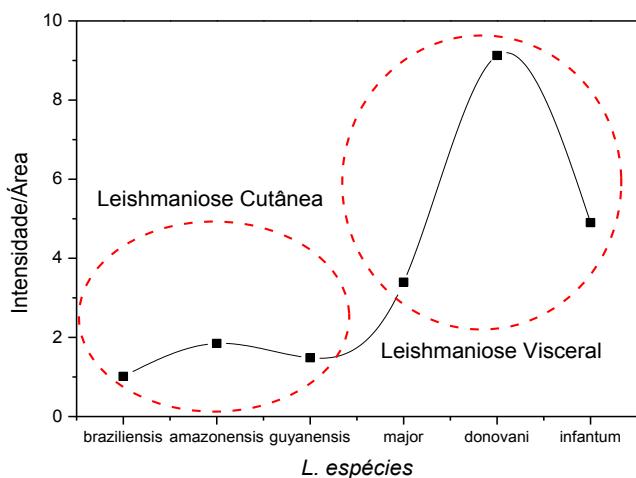


Figura 39 - Separação entre os tipos infecciosos de *Leishmania*.

A figura a seguir apresenta um esquema das bases, com destaque para as ligações dos átomos de carbonos.

Base	Adenina (A)	Guanina (G)	Timimina (T)	Citosina (C)
Purina/ Pirimidina	Purina	Purina	Pirimidina	Pirimidina
Estrutura Química				
Representação Simplificada				

Figura 40 - Representação das bases constituintes do DNA. **Fonte:** <http://3.bp.blogspot.com/-3v-9gwj0bPA/TWRdM8IIIQI/AAAAAAAAlw/MmFZuQzPkzg/s1600/bases+nitrogenadas.jpg>.

Podemos observar que nas bases purinas (adenina e guanina) as ligações C=N estão em maior número. Já nas bases chamadas pirimidinas (citosina e timina) não existe a ligação C=N e que as ligações C=O estão em maior número. Em todas as bases temos a ligação C=C em menor número que as ligações C=N e C=O.

Na tentativa de entender melhor a conformação das bases constituintes do DNA, apresentamos um gráfico de Intensidade Normalizada em função da Área Normalizada, correspondentes as ligações C=C, C=N e C=O, retiradas dos ajustes PeakFit. A Figura 41 mostra as nossas observações com respeito ao número de ligações duplas de carbono nas amostras de DNAs dos parasitos.

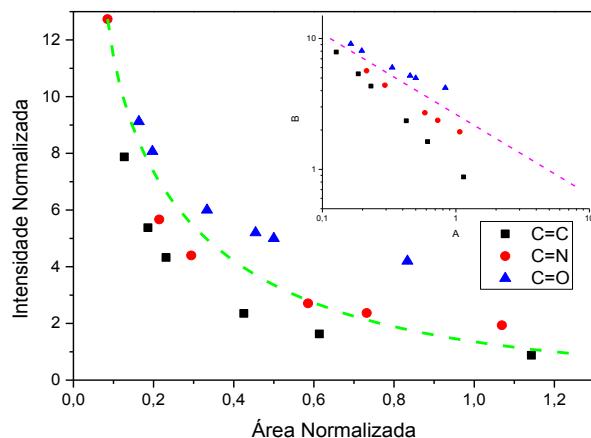


Figura 41 - Comportamento das ligações duplas presentes nos DNAs das espécies de *Leishmania*.

Podemos observar que o número de ligações duplas de carbono, tem um comportamento exponencial, para os três tipos de átomos C, N e O.

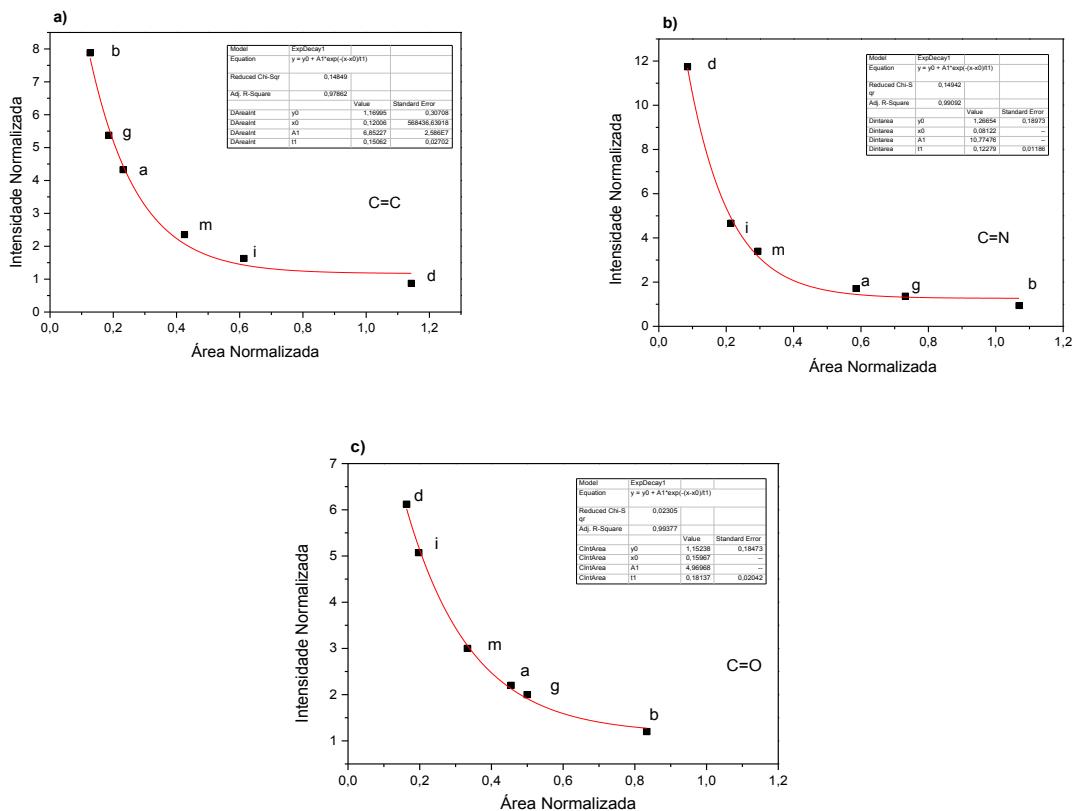


Figura 42 - Comportamento exponencial das ligações duplas presentes nos DNAs das espécies de *Leishmania*. **a)** C=C; **b)** C=N e **c)** C=O.

Observa-se que, na Figura 42, para a ligação dupla C=C temos uma inversão na posição das espécies quando comparado com a posição das mesmas para as ligações duplas de C=O e C=N.

A razão entre a intensidade dos modos vibracionais de estiramento do grupamento fosfato, dado pelo fosfodiéster (C-O-P-O-C) e o fosfodioxi (PO_2^-), nos indica a quantidade de estrutura secundária ou o número de dupla hélice existente em DNA, proteína, etc^[61].

Nos espectros das seis espécies de *Leishmania*, observamos que esses modos estão em torno de 806 cm^{-1} e 1085 cm^{-1} para o fosfodiéster e o fosfodioxi, respectivamente. Na Figura 43 temos um gráfico da razão da intensidade da banda em 806 cm^{-1} e 1085 cm^{-1} , para todas as espécies estudadas nesse trabalho.

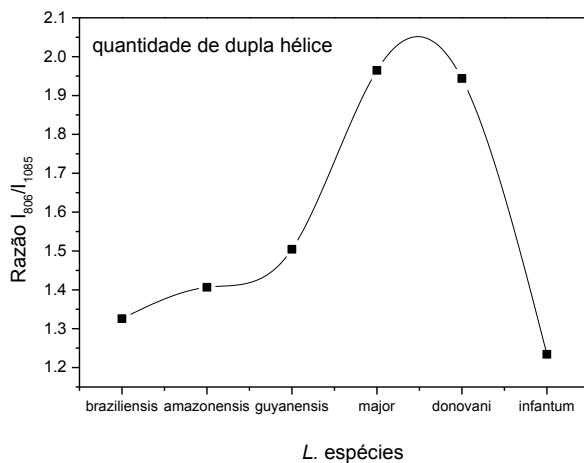


Figura 43 - Razão I_{806}/I_{1085} para as seis espécies de *Leishmania*.

Podemos separar em dois grupos as seis espécies, em relação a quantidade de dupla hélice na estrutura dos seus DNAs. O **Grupo I** – *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. infantum* – possuem em média 1.4 hélices duplas, enquanto o **Grupo II** – *L. major* e *L. donovani* – possuem uma média de 1.9 hélices duplas. Esses dados confirmam a nossa classificação anterior, em relação a origem das espécies: **Grupo I** – Américas e **Grupo II** – Europa e Ásia.

Numa tentativa de estabelecer o aumento ou o decréscimo da interação entre as bases, foi estabelecida a razão de intensidade entre as bandas em torno de 1300 cm^{-1} e 1350 cm^{-1} . Essas bandas estão na região de vibração das bases acopladas as vibrações da cadeia, sendo tais vibrações sensíveis a estrutura eletrônica dos anéis constituintes das bases. Na Figura 44 temos a representação de tais emparelhamentos.

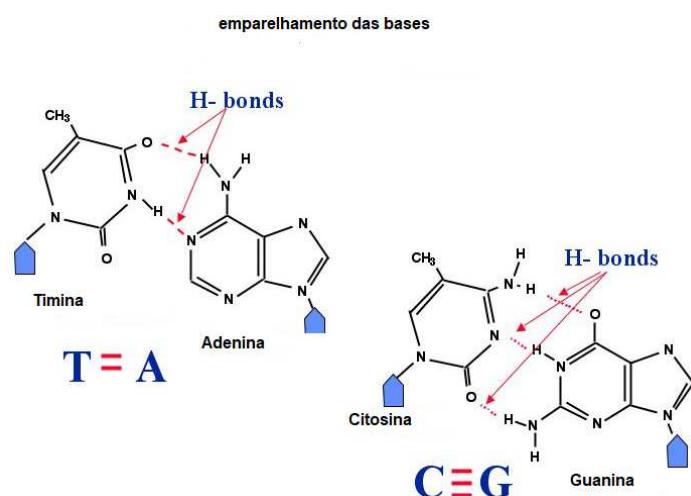


Figura 44 - Representação do emparelhamento das bases T, A, C e G.

A interação existente entre as bases constituintes do DNA, é do tipo empilhamento pi (π -stacking) entre os anéis conjugados, que contêm ligações simples e duplas alternadas. A partir do ajuste dos espectros das seis espécies de *Leishmania*, construímos um gráfico da razão I_{1300}/I_{1350} em função das espécies, apresentado na Figura 45.

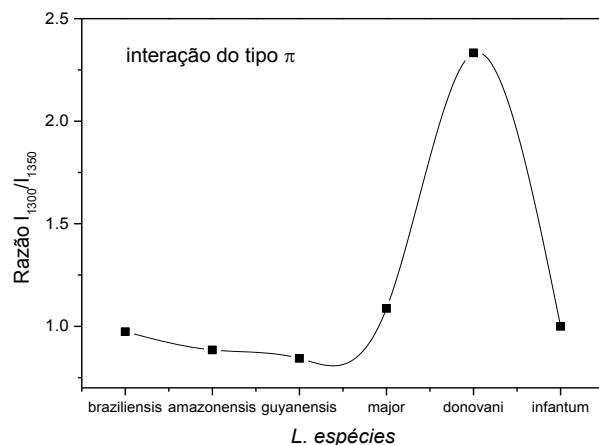


Figura 45 - Razão I_{1300}/I_{1350} para as seis espécies de *Leishmania*.

Quando a razão I_{1300}/I_{1350} diminui, representa um aumento na interação do tipo pi, ou seja, os empilhamentos dos anéis apresentam uma maior interação entre as bases, consequentemente, uma hélice de “passo” mais curto ou uma estrutura mais compacta. O inverso acontece quando essa razão aumenta. Acreditamos que essa estrutura mais compacta está relacionada a quantidade de hélice presente nos DNAs das nossas espécies em estudo. Comparando as Figura 43 e Figura 45, podemos observar que as espécies citadas como pertencentes ao **Grupo I** possuem uma maior interação entre as suas bases e uma média de 1.4 hélices duplas. Já as espécies associadas ao **Grupo II** possuem uma menor interação entre as suas bases empilhadas e uma média de 1.9 hélices duplas. Além disso, podemos inferir que a conformação da espécie *L. donovani* é bem diferente das outras espécies.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram apresentados os dados e as análises à cerca da caracterização por espectroscopia Raman de seis espécies do parasito *Leishmania*, causadores da doença de leishmaniose, as quais, a partir do método da relação “ótima”, pudemos verificar a integridade dos nossos materiais com relação a valores já estipulado pela literatura.

Através da técnica de AFM, conseguimos verificar os componentes do parasito em sua forma metacíclica para a *L. infantum*, forma esta que é a responsável por causar a infecção no hospedeiro. Para as demais espécies a representação é a mesma, portanto utilizamos apenas uma como referência.

A partir da técnica de espectroscopia Raman ajustadas para a configuração micro-Raman, conseguimos obter os espectros de todas as seis espécies utilizadas nesse trabalho em quatro linhas de excitação, sendo elas: 325, 532, 633 e 735 nm. Por meio destes, vimos que não há variação na forma de linha na região do visível, escolhemos, portanto, trabalhar com a linha de excitação 633 nm, e além disso, passamos a trabalhar com quatro regiões de análise para cada uma das seis espécies do parasito: Região I – 50 a 890 cm^{-1} ; Região II – 890 a 1190 cm^{-1} ; Região III – 1190 a 1890 cm^{-1} ; e Região IV – 1890 a 4000 cm^{-1} .

Obtivemos então, para a estrutura do DNA, que: Na região I encontramos modos de deformação de vários agrupamentos químicos e também modos vibracionais da cadeia como um todo; a região II corresponde aos modos vibracionais do anel da pentose e do grupamento fosfato, esse último sendo mais intenso que os demais; a região III corresponde aos modos vibracionais do anel da pentose e das bases nitrogenadas e; a região IV corresponde aos modos vibracionais de estiramento dos grupos OH (proveniente da água na solução), NH e CH. Logo, podemos dizer que as bandas encontradas nos espectros obtidos a partir de nossas amostras estão condizentes com o já conhecido pela literatura.

Verificamos também que, a partir da razão entre as intensidades de 1650 cm^{-1} e 1090 cm^{-1} pudemos separar as seis espécies de *Leishmania* em dois grupos, Grupo I e Grupo II. O Grupo I é composto por *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, as quais são responsáveis pela leishmaniose cutânea, enquanto o Grupo II é composto por *L. major*, *L. donovani* e *L. infantum*, responsáveis pela leishmaniose visceral, ou seja, conseguimos separá-las pelo tipo de infecção que elas causam no hospedeiro.

Considerando ainda essa mesma relação entre as intensidades, conseguimos ainda ver que as que possuem menor proporção entre elas são originárias do Novo Mundo, sendo elas a *L. brasiliensis*, a *L. amazonensis*, a *L. guyanensis* e a *L. infantum*, enquanto que as de maior proporção, a *L. major* e a *L. donovani*, são originárias do Velho Mundo.

Continuando, observamos que as espécies do Grupo I possuem maior número de vibração das ligações C=C do que o Grupo II e que, em ambos grupos, tem-se mais ligações C=C e C=N do que C=O.

Observamos que a espécie *L. donovani* possui um maior número de ligações C=N que as demais espécies, o que nos dá o indício de um menor número de conformações. Porém, o número de ligações C=O, está em maior número, indicando diversas conformações desse agrupamento. Já a espécie *L. amazonensis* possui um número equivalente de ligações C=C, C=N e C=O, contudo, as ligações C=N apresentam uma menor variação na sua conformação. A espécie *L. infantum* possui uma predominância de ligações C=C e C=N na estrutura do seu DNA e um número menor de ligações C=O, porém com menor variação de conformação.

Visualizamos também que as ligações C=C, C=N e C=O tem um comportamento exponencial, mas que, para a ligação C=C, as posições das espécies se invertem, o que pode indicar uma maneira de detecção na própria cadeia de DNA.

Ao determinarmos a quantidade de dupla hélice através da razão entre os modos vibracionais do fosfodiéster e do fosfodioxi, observamos novamente que as espécies se separam em Novo e Velho Mundo, confirmando o que já dissemos anteriormente.

Por fim, ao fazermos a razão entre as intensidades das bandas próximo de 1300 cm^{-1} e 1350 cm^{-1} , que correspondem as vibrações das bases acopladas às vibrações das cadeias, notamos que quando essa razão diminui é porque houve um aumento na interação entre as bases, ou seja, a estrutura do DNA fica mais compacta. Quando a razão aumenta, acontece a situação inversa. Com isso, concluímos que as espécies que separamos como sendo do Grupo I possuem maior interação entre suas bases e, portanto, mais compactas, enquanto as do Grupo II são menos interagentes, logo menos compactas.

Para passos futuros com relação a esse estudo, esperamos fazer a total diferenciação das espécies dos respectivos grupos, estabelecendo assim um padrão de resultados específicos para cada tipo de parasito; estudar as demais espécies de *Leishmania* presentes no país, refazendo todo o processo descrito também para elas e; buscar auxiliar e/ou agilizar o diagnóstico e pré-tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

[1] SALA, O.; **Fundamentos da Espectroscopia no Raman e no Infravermelho**, 2^a Edição. Editora Unesp, 2008.

[2] LARKIN, P.; **Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation**. Elsevier, 2011.

[3] VIRKLER, K.; LEDNEV, I. K.; **Raman spectroscopy offers great potential for the nondestructive confirmatory identification of body fluids**. *Forensic Science International*, v. 181, n. 1, p. e1-e5, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.08.004>

[4] ZHU, G.; et al.; **Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions**. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 78, n. 3, p. 1187-1195, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.12.079>

[5] DE GELDER, J.; et al.; **Reference database of Raman spectra of biological molecules**. *Journal of Raman Spectroscopy*, v. 38, n. 9, p. 1133-1147, 2007.
<https://doi.org/10.1002/jrs.1734>

[6] KOLESOV, B. A.; **Raman spectra of crystalline secondary amides**. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 179, p. 216-220, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.02.046>

[7] NAWROCKA, A.; et al.; **Effect of dietary fibre polysaccharides on structure and thermal properties of gluten proteins—A study on gluten dough with application of FT-Raman spectroscopy, TGA and DSC**. *Food Hydrocolloids*, v. 69, p. 410-421, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.03.012>

[8] MANDRILE, L.; et al.; **Species-specific detection of processed animal proteins in feed by Raman spectroscopy**. *Food Chemistry*, v. 229, p. 268-275, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.089>

[9] MARINI, M.; et al.; **Raman on suspended DNA: Novel super-hydrophobic approach for structural studies**. *Microelectronic Engineering*, 2016.

[10] BARHOUMI, A.; et al.; **Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA**. *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. 16, p. 5523-5529, 2008.
<https://doi.org/10.1021/ja800023j>

[11] SÁNCHEZ-CORTÉS, S.; et al.; **Specific interactions of antiretroviraly active drug hypericin with DNA as studied by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy.** The Journal of Physical Chemistry, v. 100, n. 5, p. 1938-1944, 1996. <https://doi.org/10.1021/jp951980q>

[12] FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J.; **Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode.** Chemical Physics Letters, v. 26, n. 2, p. 163-166, 1974. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1)

[13] PUPPELS, G.J.; et al.; **Laser irradiation and Raman spectroscopy of single living cells and chromosomes: sample degradation occurs with 514.5 nm but not with 660 nm laser light.** Experimental cell research, v. 195, n. 2, p. 361-367, 1991.

[14] OTTO, C. et al.; **Surface enhanced Raman spectroscopy of DNA bases.** Journal of Raman Spectroscopy, v. 17, n. 3, p. 289-298, 1986. <https://doi.org/10.1002/jrs.1250170311>

[15] LEE, C.; BAIN, C. D.; **Raman spectra of planar supported lipid bilayers.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, v. 1711, n. 1, p. 59-71, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.02.006>

[16] CAMERLINGO, C.; et al.; **Micro-Raman spectroscopy and univariate analysis for monitoring disease follow-up.** Sensors, v. 11, n. 9, p. 8309-8322, 2011. <https://doi.org/10.3390/s110908309>

[17] HALL, E. J.; GIACCIA, A. J.; **Radiobiology for the Radiologist.** Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

[18] YANG, N.; JIANG, X.; **Nanocarbons for DNA Sequencing: A Review.** Carbon, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2017.01.012>

[19] GOUD, E. V.; et al.; **Synthesis, structure and DNA interaction studies of bisphosphoramides: Theoretical and experimental insights.** InorganicaChimicaActa, v. 461, p. 84-91, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.02.017>

[20] AHMAD, M.; JUNG, L. T.; BHUIYAN, Al-A.; **From DNA to protein: Why genetic code context of nucleotides for DNA signal processing? A review.** Biomedical Signal Processing and Control, v. 34, p. 44-63, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2017.01.004>

[21] MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; et al.; **Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges.** Cadernos de Saúde Pública, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200024>

[22] COSTA, J. M. L.; et al.; **Epidemiologia das leishmanioses no Brasil**. 2005.

[23] Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. 1^a Edição, Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

[24] Disponível em: <http://portalsms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>. Acessado em 2017.

[25] GRIFFITHS, A. J. F., et al.; **Introdução à genética**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

[26] MIR, L., et al.; **Genômica**. Atheneu, 2004.

[27] DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J.; **Bases da Biologia Celular e Molecular**, 4^a. Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

[28] RATH, S.; et. al.; **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte**, Química Nova, Vol. 26, n.4, 550-555, 2003.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400018>

[29] AGUIAR, J. C.; **Caracterização das espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier**, Tese de Doutorado, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2016.

[30] CUNHA, A. M.; CHAGAS, E.; **Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp**, Nota Prévia. Hospital (Rio de Janeiro) 11: 3-9, 1937.

[31] LAINSON, R.; **Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon region of Brazil**, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 18(1), 47-56, 1985. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821985000100011>

[32] NEVES, D. P.; **Parasitologia Humana**, 11^a Edição, São Paulo, Atheneu.

[33] Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acessado em 04 de novembro de 2016.

[34] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acessado em 2017.

[35] World Health Organization (WHO), **Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide**, 2017. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1.

[36] World Health Organization (WHO), **Status of endemicity of cutaneos leishmaniasis worldwide**, 2017. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1.

[37] Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO); **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**, Washington, Organização Pan-Americana da Saúde, 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754.

[38] Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf>.

[39] HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; **Princípios de Análise Instrumental**. 6^a Edição, Bookman, 2009.

[40] FERRARO, J. R.; NAKAMOTO, K.; BROWN, C. W.; **Introductory Raman Spectroscopy**, Second Edition, Elsevier, 2003.

[41] SANTOS, R. B. L.; **Introdução à Espectroscopia Vibracional Raman**. Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

[42] Disponível em: <http://www.novafisica.net/projetos/microondas/conteudo.html>.

[43] LEWIS, I. R.; EDWARDS, H.; **Handbook of Raman Spectroscopy: From the Research Laboratory to the Process Line**. First Edition; CRC Press, New York, p. 1072, 2001.

[44] CHALMERS, J. M.; GRIFFITHS, P. R.; **Handbook of Vibrational Spectroscopy**. John Wiley & Sons, Inc.; p. 3862, 2002.

[45] Disponível em: <https://www.slideshare.net/RaajMathur/department-of-chemistry-institute-of-basic-sciences>.

[46] MACHEREY-NAGEL; **NucleoSpin® Tissue – Genomic DNA from Tissue**. User manual, Cap. 5, 2014.

[47] EATON, P.; WEST, P.; **Atomic Force Microscopy**. Oxford, 2010.

[48] SHIMADZU; **SPM-9600**. Shimadzu Scanning Probe Microscope.

[49] ARMOND, R. A. S. Z.; **Estudo de Eletrólitos Poliméricos a base de Poliéster por Espectroscopia Raman, Análise Térmica e Condutividade Iônica**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

[50] THERMO SCIENTIFIC; **NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer**. V 3.8 User's Manual, EUA, 2010.

[51] HORIBA; **LabRAM HR Evolution**, User Manual, 2013.

[52] LI, Y.; WANG, Z.; MU, X.; MA, A.; GUO, S.; **Biotechnology Advances** 35, 168–177, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.004>

[53] Disponível em: http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg.

[54] SOCRATES, G.; **Infrared and Raman characteristic group frequencies: table and charts**. Third Edition, Wiley, 2001.

[55] MAQUELIN, K.; et al.; **Identification of Medically Relevant Microorganisms by Vibrational Spectroscopy**. J. Microbiol. Methods, 51, 255-271, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00127-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00127-6)

[56] PRESCOTT, B.; STEINMETZ, W.; THOMAS, G. J.; **Characterization of DNA Structures by Laser Raman Spectroscopy**, Biopolymers, 23, 235–256, 1984. <https://doi.org/10.1002/bip.360230206>

[57] FREIRE, P. T. C.; et al.; **Raman Spectroscopy of Amino Acid Crystals**. In: Raman Spectroscopy and Applications, InTech, 2017. <https://doi.org/10.5772/65480>

[58] Disponível em: http://www1.univap.br/~levb/PKdeOliveira_MSC_thesis_2011.pdf.

[59] SARTORI, L.; **Complexos de platina(II) da pirazinamida: potenciais agentes antimicrobianos e antineoplásicos**. Relatório Anual, PUC-Rio, 2010.

[60] BRAUER, B.; et al.; **Vibrational Spectroscopy of the G○○○ C Base Pair: Experiment, Harmonic and Anharmonic Calculations, and the Nature of the Anharmonic Couplings**. The Journal of Physical Chemistry A, v. 109, n. 31, p. 6974-6984, 2005. <https://doi.org/10.1021/jp051767m>

[61] HUI-BON-HOA, G.; et al.; **Raman characterization of Avocado Sunblotch viroid and its response to external perturbations and self-cleavage**. BMC Biophysics, vol.7, issue.1, p.1-15, 2014. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-7-2>

[62] VOLF, P.; et. al.; **Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids**. Int J Parasitol, May, 37(6), 589–593, 2007.

[63] READY, P. D.; **Leishmaniasis emergence in Europe**. Eurosurveillance, V. 15, Issue 10, 2010.

[64] Disponível em: <http://3.bp.blogspot.com/-3v-9gwj0bPA/TWRdM8IIQI/AAAAAAAALw/MmFZuQzPkzg/s1600/bases+nitrogenadas.jpg>.

Apêndice A

SOLUÇÃO DA EQUAÇÃO (45)

Na seção 2.2.2.2, temos a equação (45), reescrita abaixo

$$\frac{d^2\Psi}{dq^2} + \frac{2\mu}{\hbar^2} \left(E - \frac{kq^2}{2} \right) \Psi = 0 .$$

Tal expressão acima pode ser escrita como

$$\frac{d^2\Psi}{dq^2} + (\beta - \alpha^2 q^2) \Psi = 0 , \quad (64)$$

com $\beta = \frac{2\mu E}{\hbar^2}$ e $\alpha = \sqrt{\frac{\mu k}{\hbar^2}}$. Fazendo uma mudança de coordenada $x = \sqrt{\alpha}q$ e, por consequência, $dx = \sqrt{\alpha}dq$. Logo, teremos,

$$\frac{d\Psi}{dq} = \frac{d\Psi}{dx} \frac{dx}{dq} = \frac{d\Psi}{dx} \sqrt{\alpha}$$

e

$$\frac{d^2\Psi}{dq^2} = \frac{d}{dq} \left(\frac{d\Psi}{dq} \right) = \frac{d}{dq} \left(\frac{d\Psi}{dx} \sqrt{\alpha} \right) = \sqrt{\alpha} \frac{d}{dx} \frac{dx}{dq} \left(\frac{d\Psi}{dx} \right) = \alpha \frac{d}{dx} \left(\frac{d\Psi}{dx} \right) = \alpha \frac{d^2\Psi}{dx^2} .$$

Logo, a equação (64) assume a forma

$$\begin{aligned} \alpha \frac{d^2\Psi}{dx^2} + (\beta - \alpha^2 q^2) \Psi &= 0 \\ \frac{d^2\Psi}{dx^2} + \left(\frac{\beta}{\alpha} - \alpha q^2 \right) \Psi &= 0 , \end{aligned}$$

mas sabemos que $\alpha q^2 = x^2$, e então,

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} + \left(\frac{\beta}{\alpha} - x^2\right)\Psi = 0 . \quad (65)$$

Considerando que $\frac{d^2\Psi}{dx^2} = x^2\Psi$ terá solução aproximada do tipo $\Psi = c e^{-x^2/2}$, obtendo

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = c (x^2 - 1)e^{-x^2/2} = (x^2 - 1)\Psi ,$$

que, para valores altos de x , podemos desprezar o termo -1 . Assim sendo, a equação considerada tem a forma da equação (65), e então, podemos considerar como solução da mesma

$$\Psi = u(x)e^{-x^2/2} . \quad (66)$$

Derivando-a em relação à x , temos:

$$\frac{d\Psi}{dx} = \frac{du}{dx} e^{-x^2/2} - ux e^{-x^2/2}$$

e

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = \frac{d^2u}{dx^2} e^{-x^2/2} - xe^{-x^2/2} \frac{du}{dx} - \frac{du}{dx} xe^{-x^2/2} - ue^{-x^2/2} + ux^2 e^{-x^2/2}$$

$$\frac{d^2\Psi}{dx^2} = \left(\frac{d^2u}{dx^2} - 2x \frac{du}{dx} - u + ux^2 \right) e^{-x^2/2} .$$

Substituindo na equação (65), temos

$$\begin{aligned} & \left(\frac{d^2u}{dx^2} - 2x \frac{du}{dx} - u + ux^2 \right) e^{-x^2/2} + \left(\frac{\beta}{\alpha} - x^2 \right) ue^{-x^2/2} = 0 \\ & \left(\frac{d^2u}{dx^2} - 2x \frac{du}{dx} - u + \frac{\beta}{\alpha} u \right) e^{-x^2/2} = 0 \\ & \frac{d^2u}{dx^2} - 2x \frac{du}{dx} + \left(\frac{\beta}{\alpha} - 1 \right) u = 0 . \end{aligned} \quad (67)$$

Portanto, para a relação (66) ser solução da equação (65), $u(x)$ deve satisfazer a equação acima. Esta equação é conhecida como equação de Hermite, podendo ser escrita como

$$\frac{d^2u}{dx^2} - 2x \frac{du}{dx} + 2vu = 0 , \quad (68)$$

onde $v = \frac{1}{2} \left(\frac{\beta}{\alpha} - 1 \right)$, e pertencente aos números inteiros.

Escrevendo agora β em termos de v e lembrando que $E = \frac{\hbar^2 \beta}{2\mu}$, resulta assim na

quantização da energia do oscilador harmônico, sendo a expressão para os autovalores:

$$E = \frac{\hbar^2}{2\mu} \alpha(2v + 1) = \frac{\hbar^2}{2\mu} \sqrt{\frac{\mu k}{\hbar^2}} (2v + 1) = \frac{\hbar}{2} \sqrt{\frac{k}{\mu}} (2v + 1) = \frac{\hbar}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} (2v + 1)$$

$$E = \frac{\hbar}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \left(v + \frac{1}{2} \right) , \quad (69)$$

onde v corresponde ao número quântico vibracional.

A equação de Hermite é resolvida pelo método da série de potências, com solução geral

$$u(x) = a_0 u_1(x) + a_1 u_2(x) , \quad (70)$$

onde $u_1(x)$ e $u_2(x)$ são polinômios contendo somente termos pares ou termos ímpares, respectivamente. Estes polinômios, conhecidos como polinômios de Hermite, $H_n(x)$, têm-se expressão geral

$$H_n(x) = (-1)^v e^{x^2} \frac{d^v}{dx^v} (-e^{x^2})$$

$$H_n(x) = (2x)^v - \frac{v(v-1)}{1!} (2x)^{v-2} + \frac{v(v-1)(v-2)(v-3)}{2!} (2x)^{v-4} + \dots \quad (71)$$

com $H_0(x) = 1$, $H_1(x) = 2x$, $H_2(x) = 4x^2 - 2$, etc.

Conhecidos $H_0(x)$ e $H_1(x)$, pode-se obter então os demais valores, através da relação

$$H_{v+1}(x) = 2xH_v(x) - 2vH_{v-1}(x) . \quad (72)$$

Em suma, a equação de Schrödinger foi modificada, por transformação de coordenadas, de modo que tivesse forma idêntica à equação de Hermite (68), sendo $u(x)$ igual a $H_v(x)$. A função de onda (66) (sem fator de normalização N_v), fica então sendo

$$\Psi(x) = H_v(x) e^{-x^2/2} . \quad (73)$$

As expressões $H_0(x)e^{-x^2/2}$, $H_1(x)e^{-x^2/2}$, $H_2(x)e^{-x^2/2}$, etc, multiplicadas pelos respectivos fatores de normalização dão as formas das funções de onda representadas na figura abaixo^[1].

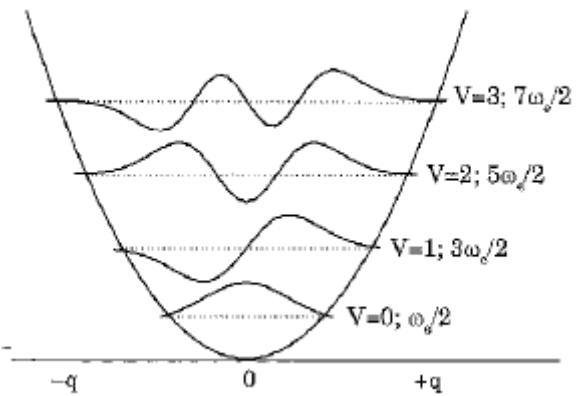


Figura 46 - Funções de onda do oscilador harmônico. **Fonte:** SALA, 2008.