

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE FÍSICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FÍSICA MÉDICA

DIEGO MENDES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO ÁCIDO
DESOXIRRIBONUCLEÍCO (DNA) DE PARASITOS DO GÊNERO *LEISHMANIA*
IRRADIADOS E NÃO IRRADIADOS COM RADIAÇÃO IONIZANTE**

UBERLÂNDIA – MG

2017

DIEGO MENDES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO ÁCIDO
DESOXIRRIBONUCLEÍCO (DNA) DE PARASITOS DO GÊNERO *LEISHMANIA*
IRRADIADOS E NÃO IRRADIADOS COM RADIAÇÃO IONIZANTE**

Trabalho de conclusão de curso submetido à
Universidade Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos necessários para a obtenção do
Grau de Bacharel em Física Médica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raigna A. Silva

UBERLÂNDIA – MG

2017

DIEGO MENDES DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA RAMAN DO ÁCIDO
DESOXIRRIBONUCLEÍCO (DNA) DE PARASITOS DO GÊNERO *LEISHMANIA*
IRRADIADOS E NÃO IRRADIADOS COM RADIAÇÃO IONIZANTE**

Trabalho de conclusão de curso submetido à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Física Médica.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raigna A. Silva
(Orientadora – INFIS/UFU)

Prof. Dr. Alexandre Marletta - Presidente
(INFIS/UFU)

Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva
(ICBIM/UFU)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 Radiação eletromagnética	17
2.2 Espectroscopia Raman	18
2.2.1 Efeito Raman	18
2.2.2 Espectro Raman	22
2.2.3 Modelo Clássico para a Vibração Molecular	24
2.2.4 Descrição Quântica para a Vibração Molecular	29
2.3 Leishmanioses	31
2.3.1 Ciclo de Vida e Morfologia	35
2.4 Efeito da Radiação no DNA	36
2.4.1 A Molécula de DNA	36
2.4.2 Ações Direta e Indireta da Radiação	39
2.5 Grandezas Físicas	40
2.5.1 Exposição	41
2.5.1.1 Relação entre a Exposição X e a Atividade $\mathcal{A}$ de uma Fonte Emissora de Raios gama	41
2.5.2 Dose Absorvida	42
2.5.2.1 Relação entre a Dose Absorvida no Ar e Exposição a Raios X e gama	43
2.5.2.2 Dose Absorvida num Meio	45
3 METODOLOGIA	46
3.1 Parasitos	46
3.2 Preparação das Amostras	47
3.3 Procedimento de Irradiação	47
3.4 Obtenção dos Espectros Raman	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	78
APÊNDICE I – Trabalhos realizados durante a pesquisa que culminou no TCC	83

Resumo

A espectroscopia Raman é uma ferramenta muito poderosa para determinar “impressões digitais moleculares” específicas em aplicações médicas. 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. Assim, esse trabalho apresentará a caracterização do material genético de dois parasitas do gênero *Leishmania*, a saber, o *L. infantum* – causador da leishmaniose viscerosa (LV) e o *L. major* causador da leishmaniose cutânea (LC). Além disso, foram caracterizadas também as principais bases nitrogenadas que compõem o DNA: adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T), separadamente. Essa caracterização foi feita em duas fases: primeira – antes da irradiação das amostras e segunda – após a irradiação com radiação gama. Foi possível atribuir a maioria das bandas presentes nos espectros, às ligações e grupos químicos que compõem os materiais nucleicos. As alterações causadas nos espectros após a irradiação foram associadas à dose de radiação gama aplicada.

Palavras-chave: Espectroscopia Raman, *Leishmania*, DNA, Radiação gama, Bases nitrogenadas.

Abstract

Raman spectroscopy is a very powerful tool for determining specific “molecular fingerprints” in medical applications. Its success has been strongly driven by the development of specific data analysis methods that allow us to obtain important information from the Raman spectra of complex samples such as human tissues, fluids, and tumors. Thus, this work will present the characterization of the genetic material of two parasites of the *Leishmania* genus, namely *L. infantum* - responsible of visceral leishmaniosis (VL) and *L. major* related of cutaneous leishmaniosis (CL). In addition, the main nitrogenous bases were characterized that make up the DNA: adenine (A), cytosine (C), guanine (G) and thymine (T), separately. This characterization was done in two phases, as before and after gamma irradiation of the samples. It was possible to attribute most of the bands present in the spectra to the bonds and chemical groups that make up the nucleic materials. The changes in the spectra after irradiation were associated with the applied gamma radiation dose.

Keywords: Raman spectroscopy, *Leishmania*, DNA, Gamma radiation, Nitrogenous bases.

Lista de Figuras.

Figura 1. Onda eletromagnética plano-polarizada ^[25]	17
Figura 2. Esquema da região do espectro eletromagnético correspondente a radiação não ionizante e ionizante. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Espectro_EM_pt.svg - adaptado.	19
Figura 3. Ilustração esquemática dos espalhamentos Raman e Rayleigh. Em (a) Espalhamento Stokes; em (b) espalhamento Rayleigh; em (c) espalhamento anti-Stokes ^[24]	21
Figura 4. Esquema de uma molécula diatômica, constituídas por massas m_1 e m_2 , ligadas por uma mola com constante de mola k ^[27]	24
Figura 5. Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose visceral no mundo, em 2015. Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/	33
Figura 6. Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose cutânea no mundo, em 2013. Fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/	33
Figura 7. Casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras, 2006 a 2015. Fonte: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf	34
Figura 8. Casos de leishmaniose visceral por UF de infecção, Brasil, 2015. Fonte: http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf	34
Figura 9. Formas evolutivas de Leishmania sp [41].	36
Figura 10. a: Estrutura dupla-hélice da molécula de DNA composta por quatro bases: adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C). b: Configuração de uma molécula de DNA: fitas são formadas por moléculas de açúcar ligadas por grupos fosfatos. Os degraus da estrutura tipo escada são formados por bases conectadas umas às outras por bandas de hidrogênio (linha tracejada) e às moléculas de açúcar nas fitas de ambos os lados ^[23]	37
Figura 11. Ilustração dos efeitos da radiação nas moléculas de DNA: a Molécula de DNA normal; b ligação de hidrogênio é quebrada sem a perda da base; c ligação de hidrogênio é quebrada com a perda da base T; d quebra de fita única que pode ser reparada; e quebras de fita dupla que são bem separados e podem ser reparada; f quebras de fita dupla que são muito próximas para serem reparadas ^[23]	38
Figura 12. Ilustração da ação direta e indireta na molécula de DNA. Na ação direta, a radiação colide com a estrutura do DNA diretamente, ao passo que na ação indireta, a radiação produz radicais livres no citoplasma, os quais reagem adversamente com a molécula de DNA para causar dano estrutural ^[23]	40
Figura 13. Esquema do espectrômetro Raman. Fonte: https://www.researchgate.net/profile/Haishan_Zeng/publication/261609194/figure/fig1/AS:296929436160003@1447804902253/Fig-1-Schematic-of-the-LabRam-system-used-for-recording-Raman-micro-spectra-Not-shown.png	48
Figura 14. Lâmina com poços e metalizada com ouro.	49
Figura 15. Espectros Raman das bases nitrogenadas que compõem o DNA: adenina A (linha preta), guanina G (linha vermelha), citosina C (linha azul) e timina T (linha rosa). Região 70 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} . Excitação do laser 325 nm.	50
Figura 16. Ajustes com lorentzianas dos espectros Raman para a região 70-560 cm^{-1} . Em a) guanina, b) citosina, c) adenina e d) timina.	52
Figura 17. Ajustes com lorentzianas dos espectros Raman para a região 560-1140 cm^{-1} . Em a) guanina, b) citosina, c) adenina e d) timina.	53

Figura 18. Ajustes com lorentzianas dos espectros Raman para a região 1140-1450 cm^{-1} . Em a) guanina, b) citosina, c) adenina e d) timina.	53
Figura 19. Ajustes com lorentzianas dos espectros Raman para a região 1450-2000 cm^{-1} . Em a) guanina, b) citosina, c) adenina e d) timina.	54
Figura 20. Estrutura química das bases A, G, T e C. Adaptado da referência [51].	55
Figura 21. Espectros Raman para os parasitos <i>L. infantum</i> (linha preta) e <i>L. major</i> (linha vermelha). Região 70 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} . Excitação do laser 325 nm.	64
Figure 22. Ajustes com Lorentzianas da Região entre 50 e 890 cm^{-1} . Em a) <i>L. infantum</i> e b) <i>L. major</i>	65
Figura 23. Partes do DNA com principais modos vibracionais na região 890 – 1190 cm^{-1} . Adaptado de http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg	65
Figura 24. Ajustes com Lorentzianas para a Região entre 890 e 1190 cm^{-1} . Em a) <i>L. infantum</i> e b) <i>L. major</i>	66
Figura 25. Partes do DNA com principais modos vibracionais na região 1190 – 2000 cm^{-1} . Adaptado de http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg	66
Figure 26. Ajustes com Lorentzianas para a Região entre 1190 e 1890 cm^{-1} . Em a) <i>L. infantum</i> e b) <i>L. major</i>	67
Figura 27. Comparação dos espectros Raman do DNA dos parasitos <i>L. infantum</i> (linha azul clara) e <i>L. major</i> (linha rosa) com os espectros das bases nitrogenadas G (linha vermelha), T (linha azul escura), A (linha preta) e C (linha verde).	70
Figure 28. Comparação entre quatro doses diferentes dos espectros das bases de DNA separadas: linha preta – 0 Gy; linha vermelha – 1.8 Gy; linha azul – 5 Gy e linha rosa – 15 Gy. Em a) adenina, b) citosina, c) guanina e d) timina.	71
Figura 29. Irradiação com radiação gama do DNA dos parasitos <i>L. infantum</i> (em a)) e <i>L. major</i> (em b)). Linha vermelha 0 Gy e linha preta 15 Gy.	72
Figura 30. Interação do radical livre OH • na estrutura do DNA. Adaptado da referência [58].	74
Figura 31. Tipos de reações que podem ocorrer na base guanina devido à ionização do DNA (ou solvente). Fonte: referência [61].	75
Figura 32. <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> não irradiada (a) e (c) e irradiada (b) e (d), respectivamente, na região de 1400 a 1800 cm^{-1}	77

Lista de Tabelas

Tabela 1- Alguns meios com seus respectivos fatores f e energia.....	46
Tabela 2. Doses de saída e absorvida da fonte de Co-60 nas amostras, além do tempo utilizado na irradiação de cada dose.	47
Tabela 3. Deslocamentos Raman ν (cm^{-1}) para a base adenina A e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.....	55
Tabela 4. Deslocamentos Raman ν (cm^{-1}) para a base citossina C e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.....	57
Tabela 5. Deslocamentos Raman ν (cm^{-1}) para a base guanina G e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.....	59
Tabela 6. Deslocamentos Raman ν (cm^{-1}) para a base timina T e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.	61
Tabela 7. Deslocamentos Raman para os parasitos L. infantum e L. major e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.	67
Tabela 8. Deslocamento Raman para o parasito L. infantum após irradiação com radiação gama.....	72

Lista de Abreviações e Símbolos

TCC – Trabalho de Conclusão de Curso.

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês “Deoxyribonucleic acid”).

SERS – Espectroscopia Raman intensificada pela superfície (do inglês “Surface enhancement Raman spectroscopy”).

OMS – Organização Mundial de Saúde.

SSB – Quebra de fita simples (do inglês “Single Strand Break”).

DSB – Quebra de fita dupla (do inglês “Double Strand Break”).

$\vec{E}$ – Vetor campo elétrico (no texto aparece em negrito – **E**).

t – tempo.

λ – Comprimento de onda.

ν – Frequência.

nm – Nanômetro.

m μ – Micrômetro.

cm – Centímetro.

Hz – Hertz.

$\tilde{\nu}$ – Número de onda.

s – Segundo.

c – Velocidade da luz.

h ν – Energia de um fóton.

h – Constante de Planck.

ΔE – Diferença de energia.

E – Energia.

I – Intensidade de fótons.

k – Constante de Boltzmann.

T – Temperatura absoluta (Equação (9)).

$\vec{P}$ – Vetor momento de dipolo induzido (em negrito no texto).

α - Polarizabilidade.

q – Coordenada normal.

m – massa.

$\Delta x, \Delta y, \Delta z$ – Variação de posição.

κ – Constante de força.

T – Energia cinética (a partir da Equação (18)).

V – Energia Potencial.

L – Lagrangeana.

$\dot{x}$ – Primeira derivada da posição em relação ao tempo.

$\ddot{x}$ – Segunda derivada da posição em relação ao tempo.

μ – Massa reduzida.

H – Função hamiltoniana.

$\vec{p}$ – Vetor momento.

$\hbar$ - Constante de Planck corrigida.

Ψ – Função de onda.

φ – Função de onda dependente unicamente da posição.

SFM – Sistema fagocitário mononuclear.

LC – Leishmaniose cutânea.

LV – Leishmaniose visceral.

LMC – Leishmaniose mucocutânea.

UF – Unidade Federativa.

T, A, G, C – Bases nitrogenadas Timina, Adenina, Guanina e Citosina, respectivamente.

LET – Transferência Linear de Energia (do inglês “Linear Energy Transfer”).

X – Grandeza física exposição.

eV – Elétron-Volt.

dQ - Carga total de íons.

SI – Sistema Internacional de Unidades.

g – grama.

C – Coulomb.

R – Röntgen.

N_P – Número de pares de íons.

Γ – Constante de taxa de exposição.

$\mathcal{A}$ – Atividade de uma fonte radioativa.

r – Distância.

Ci – Curie.

D - Grandeza física dose absorvida.

rad – Radiation absorbed dose.

J – Joule.

Gy – Gray.

Vp – Tensão de pico.

W – Energia média para formar um par de íons.

μ_m – Coeficiente mássico de absorção de energia.

μ_{ab} – Coeficiente de atenuação linear do meio.

ρ - Densidade.

ψ – Grandeza física fluência.

N – Número de fótons.

S – Seção de área.

f – fator f.

ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas.

UFU – Universidade Federal de Uberlândia.

CDTN – Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear.

Co-60 – Cobalto 60.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Raimundo Vieira e Maria de Fátima, que me deram apoio e incentivo, do primeiro ao último período do curso. Sou grato também aos meus amigos Ruan Carlos, Genilson de Oliveira, Nayara Matos, Sara Jane e Ana Tália, além de outros amigos que estiveram sempre presente ao longo do curso; sem essas pessoas a realização deste trabalho não seria possível. Meus agradecimentos a todos os meus irmãos, em especial à minha irmã Denise Cruz que contribuiu para que o sonho da faculdade se tornasse realidade. Agradeço também ao meu amigo Emanuel Castro por sua contribuição na etapa final do TCC.

Agradeço à professora Dra. Raigna A. Silva, responsável pela orientação desse trabalho, além de ser uma grande amiga; agradecer ao pessoal do GEM por estarem sempre disponíveis para discussões tanto concernentes ao TCC quanto ao curso em geral. Um agradecimento especial ao Fernando por ter me acompanhado e tirado inúmeras dúvidas ao longo da pesquisa. Também sou grato ao Professor Dr. Sydnei Magno da Silva, que contribuiu com as revisões do conteúdo e ao seu grupo de pesquisa por apoiar cada etapa da pesquisa com a disponibilização das amostras. Também não poderia esquecer o Professor Dr. Alexandre Marletta por suas dicas valiosas durante a pesquisa. Gostaria de prestar meus agradecimentos ao Professor Dr. Noélio O. Dantas por ceder o Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores – LNMIS. Quero agradecer de forma especial ao Técnico de Laboratório Guilherme Fernandes por sua disposição e boa vontade na realização dos experimentos que são a base desse TCC. Gostaria de agradecer ainda ao pessoal do CDTN em BH por apoiarem a pesquisa do TCC com a irradiação das amostras.

Agradeço imensamente à Deus por ter me concedido saúde. Sem Ele, receio que essa jornada não seria concluída. Também sou grato ao Criador por ter dado saúde aos meus familiares e tranquilizado o meu espírito, nos momentos mais desafiadores da minha trajetória acadêmica, até então.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, por me proporcionar um ambiente criativo e instigante para os estudos. Sou grato à cada membro do corpo docente, à direção e a administração dessa instituição de ensino. Agradeço ainda às Agências de Fomento: FAPEMIG, CNPq e CAPES pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica e Auxílio Financeiro nos diversos projetos de Pesquisa, que permitiram a realização desse trabalho.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado. A imaginação circunda o mundo. ”

(Albert Einstein)

1 INTRODUÇÃO

A espectroscopia Raman é uma espectroscopia óptica para caracterização de moléculas baseada na dispersão inelástica da luz monocromática por uma determinada amostra. Durante o processo, o fóton transfere energia para a amostra ou recebe energia dela. Esta diferença de energia do fóton que é 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 molecular. Assim, a espectroscopia Raman é usada para identificar uma grande variedade de produtos químicos^[1-4]. Na literatura existem diversas bases de dados contendo espectros de referência de diferentes materiais^[5,6]. Esta técnica espectroscópica é amplamente utilizada no estudo de materiais biológicos; por exemplo, proteínas^[7,8], DNA^[9-12] e cromossomos^[13]. Com esta técnica podemos obter informações valiosas sobre a composição química, a estrutura secundária presente nas macromoléculas e o ambiente químico circundante de subunidades específicas^[14].

Entre as diferentes especificidades da técnica de espectroscopia Raman^[15] foi escolhida a espectroscopia micro-Raman, pelo fato de que as assinaturas espectrais da composição química de cada material (“impressões digitais moleculares”) acontecem em escalas abaixo da micrométrica. O sucesso no emprego da técnica micro-Raman, tem sido fortemente impulsionado pelo desenvolvimento de métodos de análise de dados específicos, que permitem obter informações importantes dos espectros vibracionais de amostras complexas; tais como tecidos, fluidos e tumores humanos^[16]. Além disso, a partir do princípio da espectroscopia Raman intensificada pela superfície (Surface Enhancement Raman Spectroscopy – SERS) nós utilizamos a configuração micro-Raman, juntamente com um substrato específico cuja frequência de plasma estava em ressonância com a linha de excitação do laser, a fim de melhorar a resposta do sinal espalhado das amostras de DNA dos parasitas *Leishmania infantum* e *L. major* ^[10,14].

A leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 65 países, com 500 mil novos casos notificados anualmente; sendo 90% dos quais, concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Sudão do Sul, Bangladesh e Brasil (sendo este último responsável por

aproximadamente 90% dos casos nas Américas)^[17]. 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^[18]. Apesar disso, as doenças causadas pelos parasitas do gênero *Leishmania* ainda são negligenciadas; talvez pelo fato de afetar, na sua maioria, pessoas em situação de vulnerabilidade sócio econômica.

O DNA é uma molécula grande com uma estrutura helicoidal dupla bem conhecida. 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. Em 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. Duas das bases são grupos de anel duplo (purinas); chamadas adenina e guanina. As bases em sequências opostas devem ser complementares: adenina pares com timina, e guanina pares com citosina^[19-22].

Existem fortes evidências de que o DNA é o principal alvo para os efeitos biológicos da radiação, incluindo a morte celular, carcinogênese e mutação. Nesse sentido, a radiação ionizante induz um grande número de alterações no DNA, a maioria das quais são reparadas com sucesso pela célula^[17]. Essas alterações se dão, por exemplo, com a quebra de fita simples (Single Strand Break – SSB) ou a quebra de fita dupla (Double Strand Break – DSB) do DNA e com as quebras das ligações de hidrogênio com e sem perda de base. A primeira alteração ocorre quando uma dose de radiação ionizante; raios X, por exemplo, quebra apenas uma das duas cadeias que formam a hélice do DNA; o segundo caso acontece se a radiação incidente alterar duas cadeias em locais opostos uma da outra, ou separadas por poucos pares de bases de uma mesma hélice^[17, 23]

Nesse trabalho investigaremos os efeitos da interação da radiação gamma com as bases timina, guanina, citosina e adenina; bem como os DNAs de duas espécies de *Leishmania*, a *L. infantum* e a *L. major*, utilizando a Espectroscopia Raman. As doses escolhidas estão dentro dos limites das doses que são usadas em tratamento de Radioterapia.

A estrutura desse trabalho foi organizada como segue. A Seção 2 aborda resumidamente, a teoria na qual esse trabalho foi embasado; discutindo sobre o efeito

Raman, um panorama das leishmanioses no Brasil e no Mundo, os efeitos da radiação no DNA e as grandezas físicas envolvidas nos processos de medida da dose incidente nas moléculas em estudo. Na Seção 3, encontram-se os procedimentos utilizados no desenvolvimento desse trabalho, incluindo a preparação e irradiação das amostras; além da obtenção dos espectros Raman. Os resultados e discussão à cerca dos dados obtidos, estarão na Seção 4. Finalmente, a última seção apresenta as nossas conclusões e perspectivas em relação ao trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Radiação eletromagnética.

A radiação eletromagnética tem sua descrição ondulatória estabelecida por James C. Maxwell (1831 – 1879), a qual pode ser descrita por dois vetores variantes que descrevem a oscilação em fase dos campos elétrico e magnético, durante o deslocamento temporal da onda eletromagnética no espaço determinado. A radiação é normalmente, vista como composta de duas ondas perpendiculares plano-polarizadas^[24]

A figura 1 ilustra uma onda de radiação eletromagnética polarizada viajando na direção z. Ela consiste de uma componente na direção x e outra na direção y, que são perpendiculares entre si^[25]

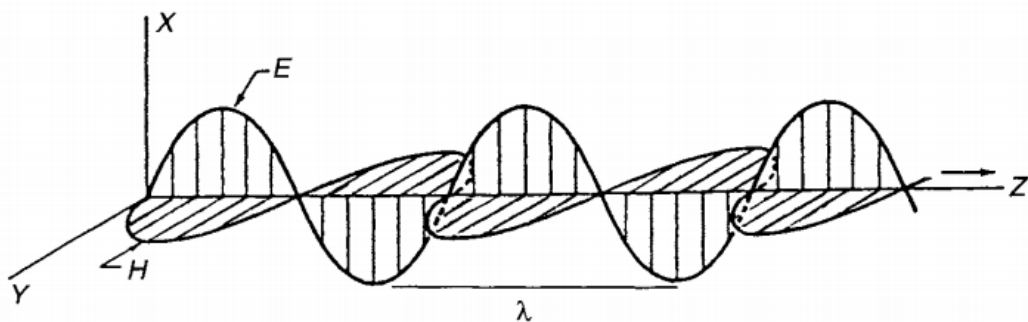


Figura 1. Onda eletromagnética plano-polarizada^[25].

A magnitude do campo elétrico (E^1) em um dado tempo (t) é expressa por

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu t \quad (1)$$

¹ As letras em negrito denotam vetores

onde E_0 é a amplitude inicial e ν é a frequência da onda^[25].

A distância ente dois pontos da mesma fase em ondas sucessivas é chamado de comprimento de onda, λ , que é medido em unidades de comprimento, tais como Å (angstrom), nm (nanômetro), cm (centímetro), etc. A relação entre elas é:

$$1\text{Å} = 10^{-8} \text{ cm} = 10^{-1} \text{ nm}. \quad (2)$$

A frequência ν é o número de ondas na distância viajada pela radiação em um segundo. Assim,

$$\nu = \frac{c}{\lambda}, \quad (3)$$

onde c é velocidade da luz (3×10^{10} cm/s). Se λ está em unidades de centímetros, a dimensão de ν é (cm/s)/(cm) = 1/s. Esta unidade “recíproca do segundo” é também chamada de “hertz” (Hz)^[25].

O terceiro parâmetro, que é mais comum em espectroscopia vibracional, é o “número de onda” definido por

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c}. \quad (4)$$

A diferença entre ν e $\tilde{\nu}$ é óbvia. O número de onda tem dimensão de (1/s)/(cm/s) = 1/cm. Combinando (3) e (4), temos^[25].

$$\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c} = \frac{1}{\lambda} \quad (5)$$

A radiação eletromagnética também pode ser tratada como partícula. Essas partículas são chamadas de fótons ou pacotes de energia. Isso se deve ao físico alemão Max Planck (1858-1947), que recebeu o Prêmio Nobel de 1918 pela descoberta dos *quanta* de energia. Cada fóton carrega uma energia de

$$E = h\nu \quad (6)$$

onde h é a constante de Planck, cujo valor mais aceito é $h = 6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s}$ ^[26]

2.2 Espectroscopia Raman.

2.2.1 Efeito Raman.

A espectroscopia Raman estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria; sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia vibracionais de átomos ou moléculas. Diretamente obtêm-se as diferenças entre estes níveis, e a partir destas medidas determinam-se as posições energéticas relativas ao nível fundamental. No caso de moléculas, a região espectral onde estas transições são observadas depende do tipo de níveis envolvidos: eletrônicos, vibracionais ou rotacionais. 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 (em casos particulares, também no infravermelho longínquo). As diferentes regiões espectrais exigem equipamentos específicos com elementos ópticos e eletrônicos apropriados. Sendo assim, cada tipo de espectroscopia exige uma tecnologia própria [27].

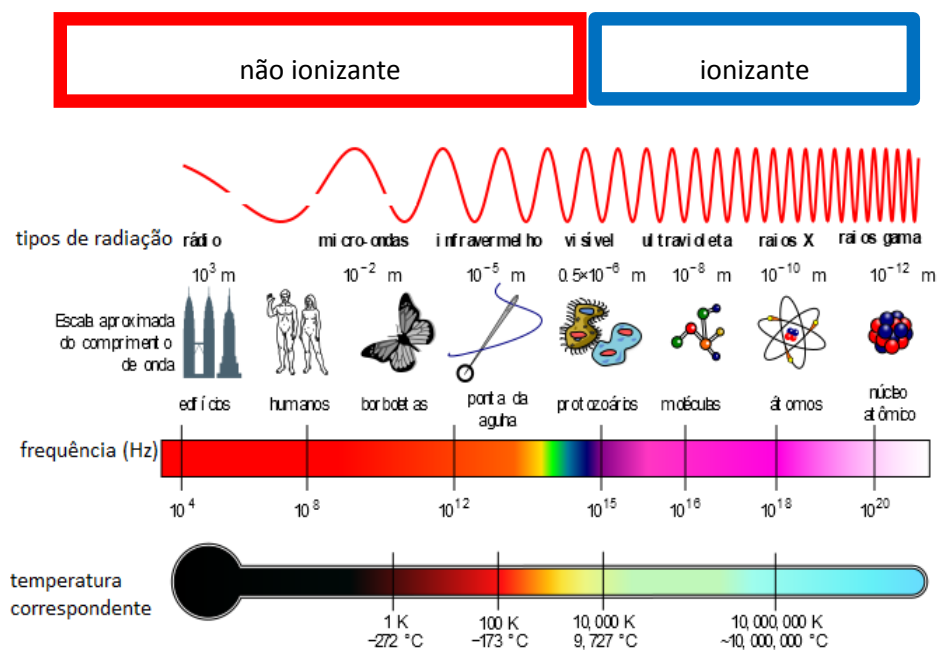


Figura 2. Esquema da região do espectro eletromagnético correspondente a radiação não ionizante e ionizante. Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Espectro_EM_pt.svg - adaptado.

Quando a radiação eletromagnética de energia $h\nu$ incide sobre uma molécula, a energia pode ser transmitida, absorvida ou espalhada. No efeito Tyndall [28], a radiação é espalhada por partículas (fumaça ou neblina, por exemplo). No espalhamento Rayleigh as moléculas espalham a luz visível. Tanto um como outro efeito, não implicam em alterações dos comprimentos de onda dos fótons da radiação

incidente, sendo o espalhamento elástico. Em 1928, C. V. Raman (1888-1970) descreveu outro tipo de espalhamento, conhecido a partir de então como efeito Raman. Este efeito havia sido previsto teoricamente por A. Smekal (1895-1959) em 1923^[29]. O efeito logo despertou interesse entre os físicos, que procuraram explicar seu mecanismo. Em 1934, George Placzek (1905-1955) publicou sua obra fundamental sobre a teoria do efeito Raman. Os trabalhos experimentais dessa época se limitavam, em geral, à obtenção e comparação de espectros. Na década de 1940 a espectroscopia Raman já era usada para se obter informações sobre a simetria molecular e as ligações químicas ^[27].

Em um equipamento Raman, a amostra é irradiada com uma fonte intensa de radiação monocromática, normalmente na região visível do espectro (fig. 2). Geralmente a frequência desta radiação é muito maior do que a frequência vibracional, porém bem menor do que a frequência requerida para a ocorrência de transições eletrônicas. No espalhamento Rayleigh a interação entre a molécula e o fóton incidente é uma colisão elástica. Uma vez que tanto a energia vibracional como a energia rotacional da molécula não sofrem alterações em uma colisão elástica, a energia e, portanto, a frequência do fóton espalhado é a mesma do fóton do incidente, característica principal deste tipo de colisão^[29].

O efeito Raman pode é considerado uma colisão inelástica entre o fóton incidente e a molécula, onde, como consequência, a energia vibracional é modificada em uma quantidade ΔE_m . De forma a haver conservação de energia, a energia do fóton espalhado $h\nu_s$ deve ser diferente da energia do fóton incidente $h\nu_i$ por uma quantidade igual a ΔE_m .

$$h\nu_i - h\nu_s = \Delta E_m. \quad (7)$$

Se a molécula ganha energia, ΔE_m é positivo e, portanto, ν_s é menor que ν_i , originando linhas Stokes no espectro Raman. Quando a molécula perde energia, ΔE_m é negativo, e ν_s é maior que ν_i , originando linhas anti-Stokes no espectro. Uma comparação esquemática entre espalhamento Raman e Rayleigh encontra-se na figura 3. Na figura 3 a diferença de energia entre os dois níveis presentes é igual a $\Delta E_m = h\nu_m$ ^[29].

Quando o fóton incidente interage com uma molécula no estado vibracional fundamental, a molécula absorve energia do fóton e é excitada momentaneamente a um determinado estado energético intermediário (ou virtual), o qual não é estável (linhas pontilhadas na figura 3). A molécula, portanto, perde energia imediatamente, retornando (com maior probabilidade) ao nível vibracional fundamental, emitindo um fóton espalhado (para compensar sua perda de energia) com mesma frequência e mesma energia do fóton incidente. Esse fenômeno é o espalhamento Rayleigh^[27,29] – fig. 3(b).

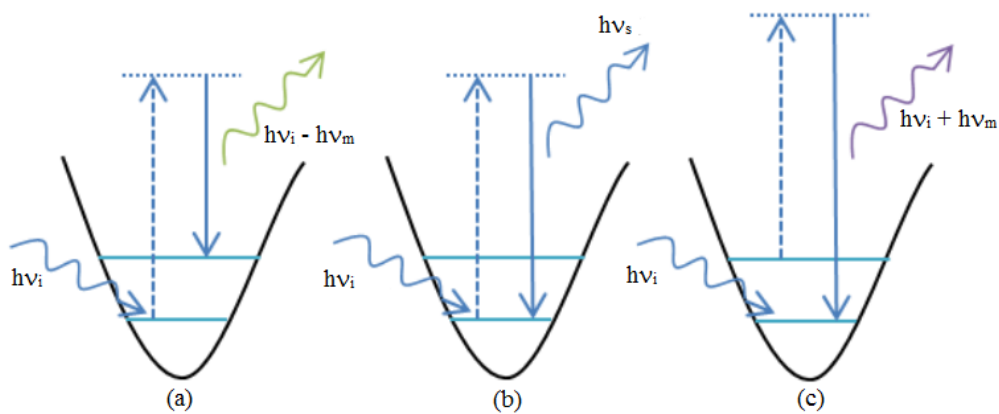


Figura 3. Ilustração esquemática dos espalhamentos Raman e Rayleigh. Em (a) Espalhamento Stokes; em (b) espalhamento Rayleigh; em (c) espalhamento anti-Stokes^[24].

No entanto, uma pequena porcentagem das moléculas que se encontram no nível instável, pode retornar a um nível excitado, ao invés de decair diretamente ao nível vibracional fundamental. O fóton espalhado, neste caso, apresenta energia menor que o fóton incidente; sendo a diferença dada por:

$$hv_i - hv_s = \Delta E_m = hv_m, \quad (8)$$

onde $\nu_s = \nu_i - \nu_m$. Este fóton espalhado origina uma linha Stokes no espectro Raman - fig. 3(a). Quando a molécula decai para um nível fundamental, a perda de energia é compensada pela emissão de um fóton, cuja energia é $h\nu_m$, que é maior do que aquela do fóton incidente. Este fóton espalhado produz uma linha anti-Stokes no espectro Raman ^[2,27,29] - fig. 3(c).

Como o número de ocupações para cada estado excitado decresce à medida que o sistema atinge estados de energia mais elevada, a população dos estados excitados segue a distribuição de Boltzmann, assim, deve-se esperar para as bandas anti-Stokes uma menor intensidade que as linhas Stokes. Isto se verifica experimentalmente e a relação entre as intensidades anti-Stokes (I_{AS})/Stokes (I_S) é dada por^[27,29]:

$$\frac{I_{AS}}{I_S} = \left(\frac{\nu_i + \nu_m}{\nu_i - \nu_m} \right)^4 e^{-\frac{h\nu_m}{kT}} \quad (9)$$

Em temperaturas medianas, a maioria das moléculas encontra-se no estado fundamental. Linhas Stokes, portanto, são mais intensas do que as linhas anti-Stokes. Esta diferença aumenta com o aumento da frequência vibracional^[27,29]. Experimentalmente, observamos as linhas anti-Stokes, já que as frequências vibracionais, normalmente, são altas.

2.2.2 Espectro Raman

Quando uma molécula é exposta ao campo elétrico da radiação eletromagnética, seus elétrons e seu núcleo sofrem forças opostamente direcionadas, exercidas pelo campo elétrico da radiação. Como resultado, os elétrons sofrem um deslocamento com relação ao núcleo, criando um momento dipolar induzido, causado pelo campo elétrico externo. O momento dipolar induzido $\mathbf{P}$, dividido pelo campo elétrico $\mathbf{E}$, é a polarizabilidade α induzida na molécula^[27,29]

$$\mathbf{P} = \alpha \mathbf{E}. \quad (10)$$

A polarizabilidade pode ser entendida como a maior ou a menor deformação da nuvem eletrônica da molécula em relação ao núcleo, causada pela ação de um campo elétrico externo. Para que uma dada vibração molecular seja ativa no Raman, ela deve ser acompanhada de uma variação na polarizabilidade da molécula^[27,29].

O campo elétrico da radiação eletromagnética nas vizinhanças da molécula varia com o tempo, de forma que:

$$E = E_0 \cos(2\pi\nu t), \quad (11)$$

onde E_0 é uma constante, a amplitude do campo, ν a frequência da radiação incidente e t é o tempo. Este campo elétrico oscilante induzirá na molécula, por sua vez, um momento dipolar oscilante $\mathbf{P}$ cuja frequência será a mesma que aquela do campo elétrico externo. Combinando-se as equações (10) e (11) tem-se^[27,29]:

$$\mathbf{P} = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu t). \quad (12)$$

Da Teoria Clássica, este momento dipolar oscilatório emitirá radiação em todas as direções que apresentarem a mesma frequência que a sua (e, portanto, também da radiação excitante)^[27,29].

Em moléculas, a polarizabilidade α não apresenta um valor constante, já que certas vibrações e rotações podem causar variação nela. Para pequenos deslocamentos, α pode ser expandida em uma série de Taylor:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 q + \text{termos de ordem superior}, \quad (13)$$

onde α_0 é a polarizabilidade de equilíbrio, q é a coordenada normal. O subscrito “0” significa que $\frac{\delta\alpha}{\delta q}$ é a taxa de variação da polarizabilidade com relação a q tomada na posição de equilíbrio dos núcleos. Na aproximação harmônica, os termos de ordem superior podem ser negligenciados. A coordenada normal q varia periodicamente^[27,29]

$$q = q_0 \cos(2\pi\nu_m t), \quad (14)$$

onde ν_m é a frequência de vibração de q , e q_0 é uma constante, o valor máximo de q . Combinando as equações (13) e (14) temos:

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 q_0 \cos(2\pi\nu_m t). \quad (15)$$

Substituindo-se α na equação (12) tem-se:

$$\mathbf{P} = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu t) + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 q_0 \mathbf{E}_0 [\cos(2\pi\nu_m t) \cos(2\pi\nu t)]. \quad (16)$$

Utilizando-se de uma identidade trigonométrica apropriada podemos escrever:

$$\mathbf{P} = \alpha_0 \mathbf{E}_0 \cos(2\pi\nu t) + \left(\frac{\delta\alpha}{\delta q} \right)_0 \frac{q_0 \mathbf{E}_0}{2} [\cos 2\pi(\nu - \nu_m)t + \cos 2\pi(\nu + \nu_m)t]. \quad (17)$$

Pode-se deduzir a partir dessa equação que o momento dipolar induzido $\mathbf{P}$ varia com três frequências: ν , $\nu - \nu_m$ e $\nu + \nu_m$; podendo portanto, originar espalhamento Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes, respectivamente^[27,29].

2.2.3 Modelo Clássico para a Vibração Molecular.

Consideremos 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 fig. 4.

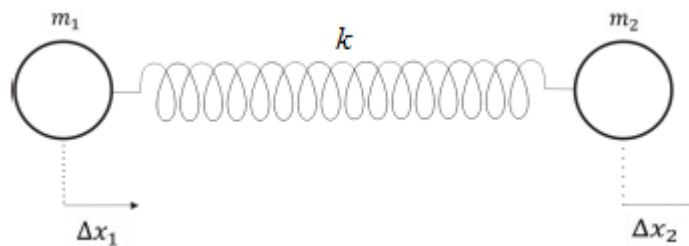


Figura 4. Esquema de uma molécula diatômica, constituídas por massas m_1 e m_2 , ligadas por uma mola com constante de mola k ^[27].

Interessa-nos o pequeno deslocamento dos núcleos durante a vibração, melhor descritos pelas variações das coordenadas cartesianas de movimento (Δx , Δy , Δz) ^[27]. Desconsiderando os movimentos de translação e de rotação, a energia cinética para a molécula diatômica é

$$T = \frac{1}{2} (m_1 \Delta \dot{x}_1^2 + m_2 \Delta \dot{x}_2^2) , \quad (18)$$

enquanto a energia potencial é dado por

$$V = \frac{1}{2} k (\Delta x_2 - \Delta x_1)^2 . \quad (19)$$

Sabemos que este tipo de problema pode ser resolvido pela Lagrangeana (L), na qual $L = T - V$. Então^[27],

$$\frac{d}{dt} \left[\frac{\partial L}{\partial \dot{x}} \right] - \frac{\partial L}{\partial x} = 0 \rightarrow \frac{d}{dt} \left[\frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta x} = 0 . \quad (20)$$

Desta forma, calculando a lagrangeana da Eq. (20) para cada um dos núcleos, teremos:

$$\frac{d}{dt} \left[\frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}_1} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta x_1} = 0 , \quad (21)$$

e

$$\frac{d}{dt} \left[\frac{\partial T}{\partial \Delta \dot{x}_2} \right] + \frac{\partial V}{\partial \Delta x_2} = 0 . \quad (22)$$

Resolvendo primeiramente com a equação (21), usando (19) e (20) teremos:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} \left\{ \frac{\partial}{\partial \Delta \dot{x}_1} \left[\frac{1}{2} (m_1 \Delta \dot{x}_1^2 + m_2 \Delta \dot{x}_2^2) \right] \right\} + \frac{\partial}{\partial \Delta x_1} \left[\frac{1}{2} k (\Delta x_2 - \Delta x_1)^2 \right] &= 0 \\ \frac{d}{dt} \{ m_1 \Delta \dot{x}_1 \} + k [(\Delta x_2 - \Delta x_1)(-1)] &= 0 \\ m_1 \Delta \ddot{x}_1 - k (\Delta x_2 - \Delta x_1) &= 0 . \end{aligned} \quad (23)$$

Analogamente, para a equação (22), teremos:

$$\frac{d}{dt} \left\{ \frac{\partial}{\partial \Delta \dot{x}_2} \left[\frac{1}{2} (m_1 \Delta \dot{x}_1^2 + m_2 \Delta \dot{x}_2^2) \right] \right\} + \frac{\partial}{\partial \Delta x_2} \left[\frac{1}{2} k (\Delta x_2 - \Delta x_1)^2 \right] = 0$$

$$\frac{d}{dt}\{m_2\Delta\dot{x}_2\} + k[(\Delta x_2 - \Delta x_1)] = 0$$

$$m_2 \Delta \ddot{x}_2 + k(\Delta x_2 - \Delta x_1) = 0 . \quad (24)$$

Supondo que as equações diferenciais (23 e (24) tenham soluções periódicas do tipo:

$$\Delta x_1 = A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi) , \quad (25)$$

e

$$\Delta x_2 = A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi) . \quad (26)$$

onde A_1 e A_2 são constantes. Derivando (25 e (26) em relação ao tempo, temos:

$$\frac{d}{dt}(\Delta x_1) = -2\pi\nu A_1 \sin(2\pi\nu t + \phi)$$

$$\frac{d^2}{dt^2}(\Delta x_1) = -4\pi^2\nu^2 A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi) , \quad (27)$$

e

$$\frac{d}{dt}(\Delta x_2) = -2\pi\nu A_2 \sin(2\pi\nu t + \phi)$$

$$\frac{d^2}{dt^2}(\Delta x_2) = -4\pi^2\nu^2 A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi) , \quad (28)$$

e então substituindo em (23) e (24), teremos

$$-4\pi^2\nu^2 m_1 A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi) - k[A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi) - A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi)] = 0$$

$$-4\pi^2\nu^2 m_1 A_1 - k(A_2 - A_1) = 0 , \quad (29)$$

e

$$-4\pi^2\nu^2 m_2 A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi) + k[A_2 \cos(2\pi\nu t + \phi) - A_1 \cos(2\pi\nu t + \phi)] = 0$$

$$-4\pi^2 v^2 m_2 A_2 + k(A_2 - A_1) = 0 . \quad (30)$$

Portanto, obtemos o sistema de equações:

$$(-4\pi^2 v^2 m_1 + k)A_1 - kA_2 = 0 , \quad (31)$$

e

$$-kA_1 + (-4\pi^2 v^2 m_2 + k)A_2 = 0 . \quad (32)$$

As equações (31 e (32) 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

$$\begin{vmatrix} -4\pi^2 v^2 m_1 + k & -k \\ -k & -4\pi^2 v^2 m_2 + k \end{vmatrix} = 0 \quad (33)$$

O que implica

$$\begin{aligned} & (-4\pi^2 v^2 m_1 + k)(-4\pi^2 v^2 m_2 + k) - k^2 = 0 \\ & 16\pi^4 v^4 m_1 m_2 - 4\pi^2 v^2 m_1 k - 4\pi^2 v^2 m_2 k + k^2 - k^2 = 0 \\ & 4\pi^2 v^2 [4\pi^2 v^2 m_1 m_2 - k(m_1 + m_2)] = 0 \end{aligned} \quad (34)$$

Logo obtemos as raízes:

$$v = 0 , \quad (35)$$

e

$$4\pi^2 v^2 m_1 m_2 = k(m_1 + m_2)$$

$$v^2 = \frac{1}{4\pi^2} k \frac{(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}$$

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad (36)$$

onde μ é a massa reduzida, definida como,

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{(m_1 + m_2)}. \quad (37)$$

Substituindo estas raízes nas equações (31) e (32), obtemos para^[27]

- $\nu = 0$

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

$$kA_1 - kA_2 = 0$$

$$A_1 = A_2. \quad (38)$$

Esse resultado implica que as amplitudes são iguais para ambos os núcleos, e ainda, que $\Delta x_1 = \Delta x_2$, implicando para nós num movimento de translação. E para^[27]

- $\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$

$$-kA_1 + \left[-4\pi^2 \left(\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \right)^2 m_2 + k \right] A_2 = 0$$

$$-kA_1 + \left[-\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2} m_2 + k \right] A_2 = 0$$

$$-A_1 - \left[\frac{(m_1 + m_2)}{m_1} - 1 \right] A_2 = 0$$

$$-A_1 m_1 = [(m_1 + m_2) - m_1] A_2$$

$$A_1 m_1 = -m_2 A_2, \quad (39)$$

que pode ser escrito como

$$\frac{A_1}{A_2} = -\frac{m_2}{m_1} \Rightarrow \frac{\Delta x_1}{\Delta x_2} = -\frac{m_2}{m_1}. \quad (40)$$

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^[27].

2.2.4 Descrição Quântica para a Vibração Molecular

Seja o hamiltoniano definido como $H = T + V$. Para o oscilador harmônico em uma dimensão, a energia cinética da partícula é dada por,

$$T = \frac{1}{2m} p^2 \rightarrow T = -\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{d^2}{dx^2}, \quad (41)$$

com o momento em uma dimensão, dado por $p = -i\hbar \frac{d}{dx}$ e onde μ é a massa reduzida^[27].

E a energia potencial elástica como sendo

$$V = \frac{1}{2} kx^2. \quad (42)$$

Resolver o oscilador harmônico simples, do ponto de vista quântico, implica em encontrar a solução para a equação de Schrödinger, dada por:

$$H\Psi = E\Psi. \quad (43)$$

Substituindo as equações (41) e (42), na equação (43), temos

$$\begin{aligned} (T + V)\Psi &= E\Psi \\ \left(-\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{d^2}{dx^2} + \frac{kx^2}{2} \right) \Psi &= E\Psi, \\ \frac{d^2\Psi}{dx^2} + \frac{2\mu}{\hbar^2} \left(E - \frac{kx^2}{2} \right) \Psi &= 0. \end{aligned} \quad (44)$$

Como a equação (44) é independente do tempo, podemos dizer que a função de onda é composta por um produto da dependência temporal $e^{iEt/\hbar}$ com uma função de onda dependente unicamente da posição, $\varphi(x)$. Ou seja,

$$\Psi(x,t) = e^{iEt/\hbar} \varphi(x). \quad (45)$$

Assim, podemos reescrever a equação^[27] (44)

$$\frac{d^2 \phi(x)}{dx^2} + \frac{2\mu}{\hbar^2} \left(E - \frac{kx^2}{2} \right) \phi(x) = 0. \quad (46)$$

Considerando a função de onda dependente da posição, podemos propor uma solução que satisfaça a igualdade da equação (46), dada por

$$\varphi(x) = Ae^{-\alpha x^2/2}, \quad (47)$$

Vamos verificar que ela satisfaz o proposto em (45). Logo,

$$\frac{d\varphi}{dx} = -A\alpha x e^{-\alpha x^2/2} \quad (48)$$

e

$$\frac{d^2\varphi}{dx^2} = -A\alpha e^{-\alpha x^2/2} + A\alpha^2 x^2 e^{-\alpha x^2/2} = -\alpha\varphi + \alpha^2 x^2 \varphi. \quad (49)$$

Trabalhando (44) e igualando com (46), tem-se:

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

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

$$\alpha = \frac{2\mu}{\hbar^2} E, \quad (50)$$

e

$$\alpha^2 = \frac{\mu k}{\hbar^2} \rightarrow \alpha = \frac{\sqrt{\mu k}}{\hbar} . \quad (51)$$

Por fim, substituindo (51) em (50), temos

$$E = \frac{\alpha \hbar^2}{2\mu} = \frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{\sqrt{\mu k}}{\hbar} = \frac{\hbar}{2} \sqrt{\frac{k}{\mu}} = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (52)$$

mas, usando a Eq. (36), ficamos com

$$E = \frac{1}{2} h\nu . \quad (53)$$

Sendo ν a frequência para um oscilador harmônico. Portanto, (45) satisfaz como solução para (44). A relação (53) mostra que este valor da energia representa a energia do estado fundamental do oscilador^[27].

Importante notar que, nenhum sistema físico descrito por um oscilador harmônico, com energia potencial elástica, possui “zero” de energia. Sendo esta, a menor energia permitida pelo Princípio da Incerteza^[27].

2.3 Leishmanioses

As leishmanioses constituem um espectro de doenças causadas por espécies do protozoário *Leishmania*, da família Trypanosomatidae. Estes parasitos exibem diferentes morfologias celulares, que são adaptadas ao hospedeiro vertebrado e ao vetor, sendo as duas principais formas evolutivas: promastigota e amastigota. As promastigotas, flageladas, são encontradas no tubo digestivo do vetor, enquanto que as amastigotas, sem flagelo aparente, são intracelulares obrigatórias, podendo ser identificadas nas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) do mamífero infectado ^[30]. Embora a morfologia das formas evolutivas varie, a arquitetura celular básica é conservada entre elas, sendo que alojado dentro da célula há um núcleo oval e uma mitocôndria única que ocupa grande parte do citoplasma. Esta possui, ainda, uma região em formato de bastão conhecida como cinetoplasto (característica

diagnóstica dos tripanossomatídeos) [31,32]. O flagelo (aparente e altamente móvel das promastigotas e não aparente das amastigotas) é conectado ao corpo celular através do corpo basal, o qual está situado dentro da bolsa flagelar [33,34]

A *Leishmania* produz lesões nos níveis cutâneo (LC), mucocutâneo (LMC) e visceral (LV). A parasitose é considerada endêmica em grandes bacias tropicais, subtropicais e mediterrâneas[35]. No Velho Mundo há apenas um subgênero: *Leishmania*; no entanto, no Novo Mundo o gênero foi dividido em dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*) de acordo com o desenvolvimento do parasito no trato digestivo do vetor. Dependendo da área geográfica, muitas espécies diferentes podem infectar humanos; por exemplo, no Brasil umas das espécies mais comuns é a *Leishmania infantum*, que causa a LV [36, 37].

O parasito é transmitido aos seres humanos pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Nas Américas, o vetor pertence ao gênero *Lutzomyia* [37], e no Velho Mundo, ao gênero *Phlebotomus*[35,36].

As leishmanioses estão inseridas no grupo de doenças tropicais zoonóticas que são negligenciadas. Prevaecem em mais de 98 países. As figuras 5 e 6 apresentam uma visão geral das duas formas clínicas mais comuns da doença, a LV e LC, respectivamente.

No mundo estima-se cerca de 350 milhões de pessoas em risco e a incidência anual das leishmanioses é estimada entre 1,3 milhões de novos casos, sendo que 700.000 a 1.000.000 para a LC e 300.000 para a LV. Quanto à forma visceral, cerca de 20.000-30.000 dos casos evoluem para o óbito do portador [32,39-40].

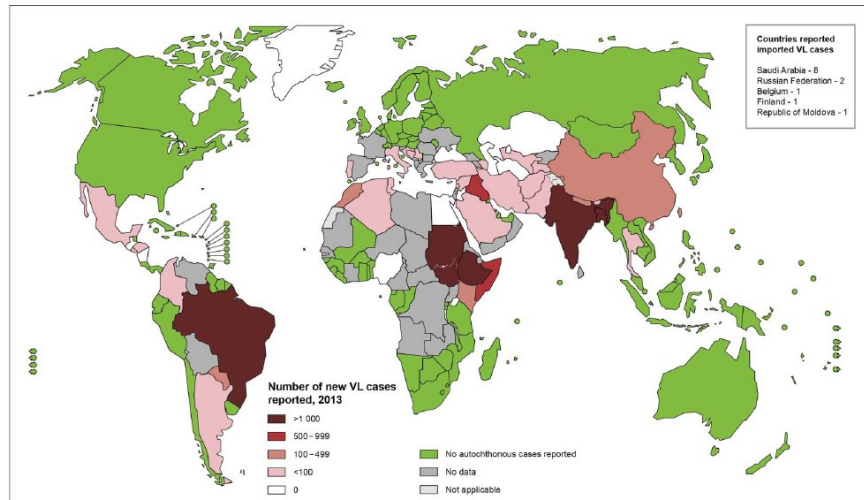


Figura 5. Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose visceral no mundo, em 2015. Fonte: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

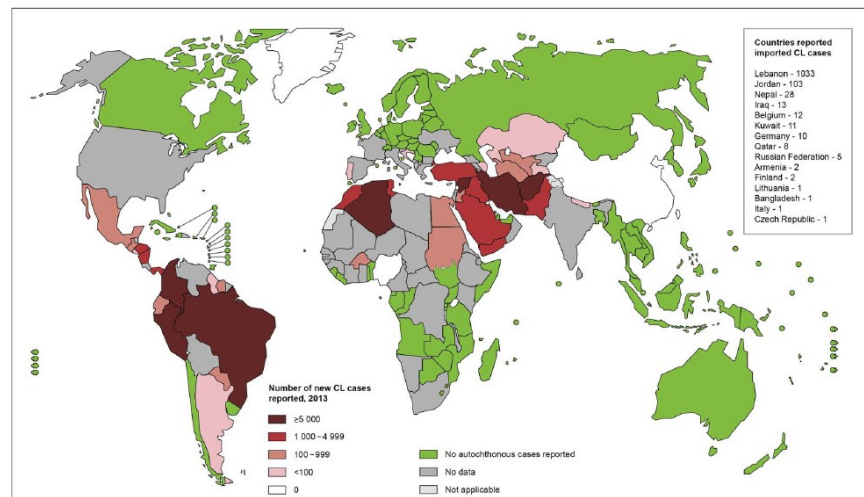


Figura 6. Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose cutânea no mundo, em 2013. Fonte: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

O Brasil detém a maior concentração de casos de LC e LV nas américas, acima de 3.000 novos casos em 2015 para LV e mais de 20.000 novos casos para LC. A seguir são apresentados dois gráficos (figuras 7 e 8) que resumem a evolução dos casos de LV de 2006 a 2015, para as regiões brasileiras. Podemos observar que não

existiu surto de LV na região Sul do país. Em comparação, a região Nordeste apresenta uma média de casos de LV acima de 1.500/ ano.

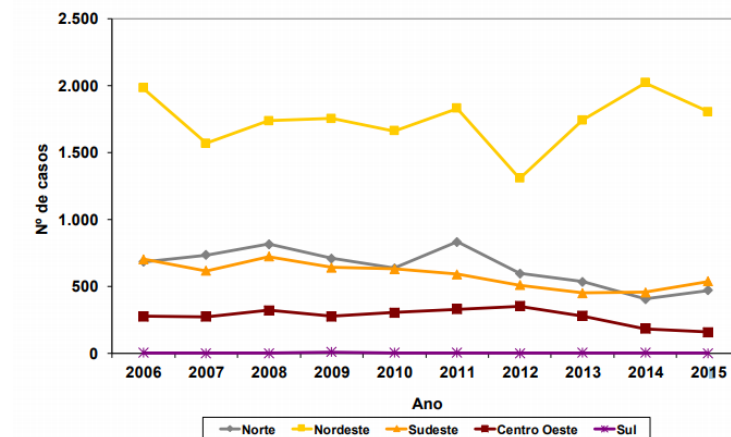


Figura 7. Casos de leishmaniose visceral por regiões brasileiras, 2006 a 2015. Fonte: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf>.

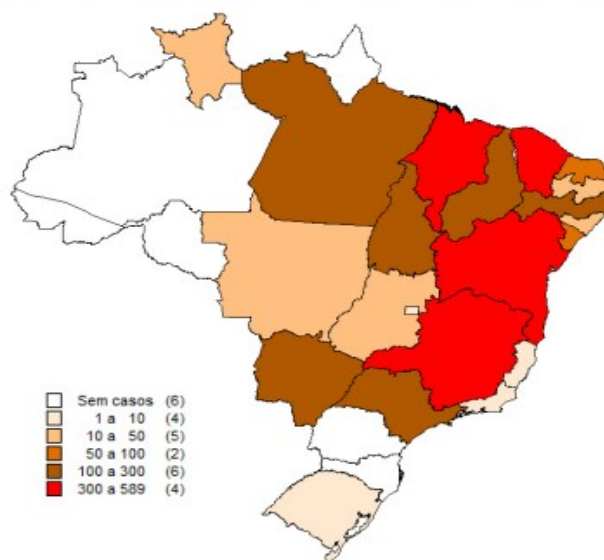


Figura 8. Casos de leishmaniose visceral por UF de infecção, Brasil, 2015. Fonte: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf>.

A LV foi inicialmente considerada uma doença rural no Brasil; no entanto, depois dos anos 1980, surgiu principalmente nas grandes cidades do país. O primeiro surto urbano relatado ocorreu em Teresina, a capital do estado do Piauí, resultando

em 900 casos de LV de 1981 a 1985. Nas décadas anteriores, esta cidade relatou, anualmente, uma média de 3,8 casos de LV. A doença então se estendeu até São Luís (Estado do Maranhão, MA) e Natal (Estado do Rio Grande do Norte, RN), ambas cidades grandes na região Nordeste do país. Desde de os anos 1990, a doença tem se expandido ao longo de todo o país, com casos autóctones relatados em 25% dos municípios Brasileiros em 21 estados. Em quase 30 anos, o número médio de casos relatados por ano aumentou três vezes, se comparados os períodos de 1980 a 2012). Antes dos anos 1980, 80% - 95% dos casos aconteciam na região Nordeste; porém, em 2001, pela primeira vez, a proporção de casos autóctones para aquela região ficou abaixo de 80%, tem se mantido estável até então. Esta diminuição na proporção dos casos relatados pelos estados nordestinos corresponde diretamente ao aparecimento da doença em cidades com populações acima de 100.000 habitantes, tal como Belo Horizonte (Estado de Minas Gerais, MG), Araguaína (Estado de Tocantins, TO), Campo Grande (Estado do Mato Grosso do Sul, MS), Bauru (Estado de São Paulo, SP), Palmas (TO), Cametá (Estado do Pará, PA), Rondonópolis (Estado do Mato Grosso, MT), Três Lagoas (MS), Montes Claros (MG) e Araçatuba (SP). Estas 10 cidades sozinhas são responsáveis por 15,0% dos casos de LV reportados no Brasil de 2001 a 2012. Portanto fica claro que a LV é uma doença de áreas urbanas e que não há sinais notáveis que sua disseminação está sob controle^[37].

Como podemos observar na figura 8, os dados disponíveis em 2015 mostram que a LV se concentra predominantemente nos estados MA, Ceará (CE), Bahia (BA) e MG.

2.3.1 Ciclo de Vida e Morfologia

O parasito possui duas fases distintas em seu ciclo de vida, amastigota e promastigota (Fig. 9). A forma amastigota é encontrada e se multiplica por divisão binária em células do SFM dos mamíferos hospedeiros. É pequena, arredondada ou oval, mede de 3 a 5 μm , e contém um núcleo grande^[41].

Após ingestão durante o repasto sanguíneo pelo inseto vetor (flebotomíneo), a amastigota se transforma em formas promastigotas (Figura. 9). As promastigotas se multiplicam no intestino do inseto, se transformando em promastigotas metacíclicas, e migram para o aparelho bucal do vetor, onde são liberados quando a próxima

alimentação de sangue é feita. O ciclo de vida completo no vetor é de 4 a 8 dias. Após a inoculação/regurgitação dentro do sítio da picada, as promastigotas metacíclicas muda para as formas amastigotas, depois de serem internalizados por macrófagos presentes na pele do hospedeiro. Esta mudança de forma evolutiva ajuda a vencer a resposta imune do hospedeiro^[41].

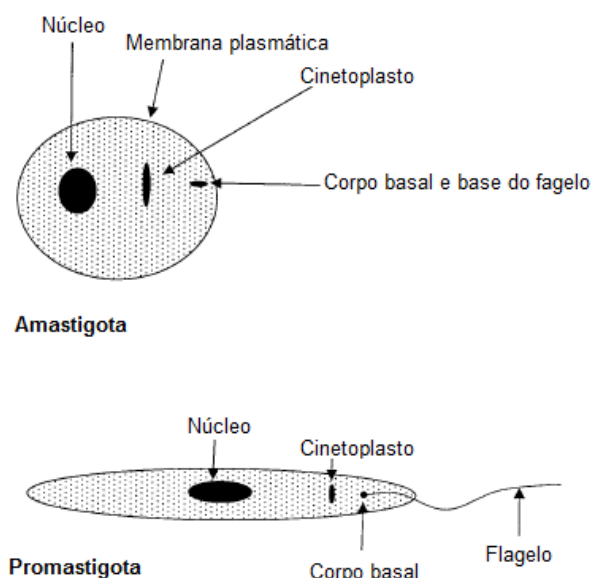


Figura 9. Formas evolutivas de *Leishmania* sp [41].

O ciclo de vida de *Leishmania* é similar para as LC, LMC e LV, sendo que os sinais e sintomas característicos de cada forma clínica dependem, principalmente, da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e da resposta imune do hospedeiro frente ao parasito^[41].

2.4 Efeito da Radiação no DNA

2.4.1 A Molécula de DNA

O núcleo da célula é a parte mais sensível à radiação e sua sensibilidade é atribuída à molécula de DNA. Para entender o efeito da radiação na molécula de DNA, um conhecimento de sua estrutura é essencial. Ela tem uma estrutura de dupla-hélice consistindo de duas fitas, as quais são como os dois corrimões de uma escada (fig. 10a). Contudo, existem casos, por exemplo de vírus, cuja estrutura é de uma hélice apenas ^[42]. As fitas são conectadas umas às outras ligações químicas entre de quatro bases nitrogenadas: timina (T), adenina (A), guanina (G) e citosina (C) (fig. 10b). As bases nitrogenadas são ligadas às moléculas de açúcar, ribose, nas fitas de ambos

os lados, e são pareadas umas às outras por ligações de hidrogênio. Estas quatro bases são arranjadas de uma maneira muito específica para formar um gene específico em todas espécies vivas e fornece características únicas para estas espécies [19,23].

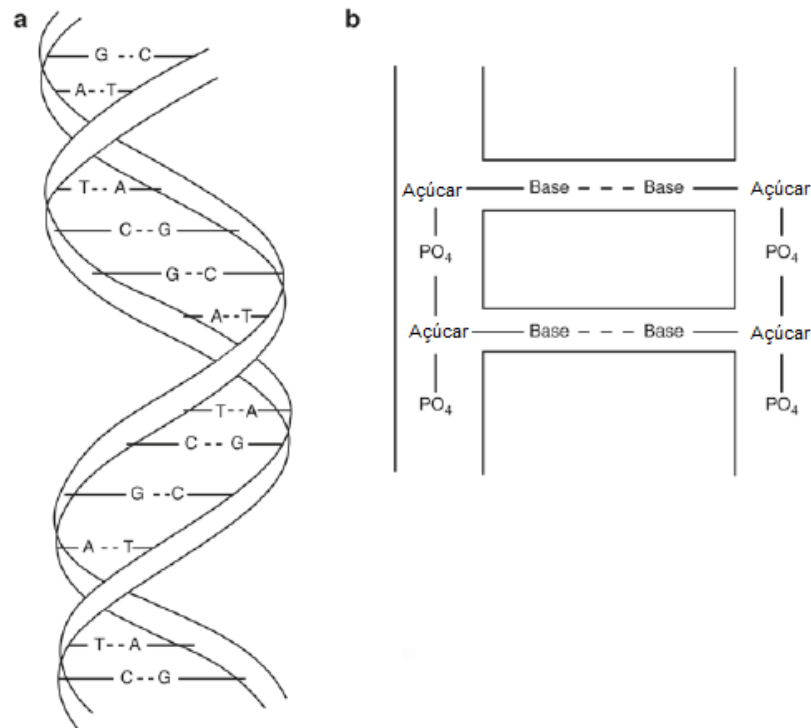


Figura 10. a: Estrutura dupla-hélice da molécula de DNA composta por quatro bases: adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C). b: Configuração de uma molécula de DNA: fitas são formadas por moléculas de açúcar ligadas por grupos fosfatos. Os degraus da estrutura tipo escada são formados por bases conectadas umas às outras por bandas de hidrogênio (linha tracejada) e às moléculas de açúcar nas fitas de ambos os lados[23].

A radiação pode danificar a molécula de DNA de diversas maneiras; por exemplo[23]:

- a) perda de uma base;
- b) clivagem da ligação de hidrogênio entre as bases;
- c) quebra de uma das fitas da molécula de DNA (Fita única);
- d) quebra de ambas as fitas da molécula de DNA (Fita dupla).

Estes efeitos da radiação nas moléculas de DNA são ilustrados na figura 11. Estas mudanças resultam nas tão chamadas *mutações*, que tem efeitos adversos no código genético. O número de mutações aumenta com o aumento da exposição à radiação. Em exposições de baixa dose, as quebras são de fita única e podem ser reparadas através da junção dos componentes quebrados na ordem original^[23].

Em exposições mais altas, no entanto, quebras de fita dupla ocorrem e as chances de reparo diminuem. Também, radiação de alta transferência linear de energia (do inglês LET) causam mais danos às moléculas de DNA por causa das quebras de dupla fita. Se a célula não é reparada, ela pode sofrer uma deficiência funcional menor ou uma consequência maior (morte celular). Se o dano do DNA ocorrer nas células germinativas, a prole futura pode ser afetada.^[19,23]

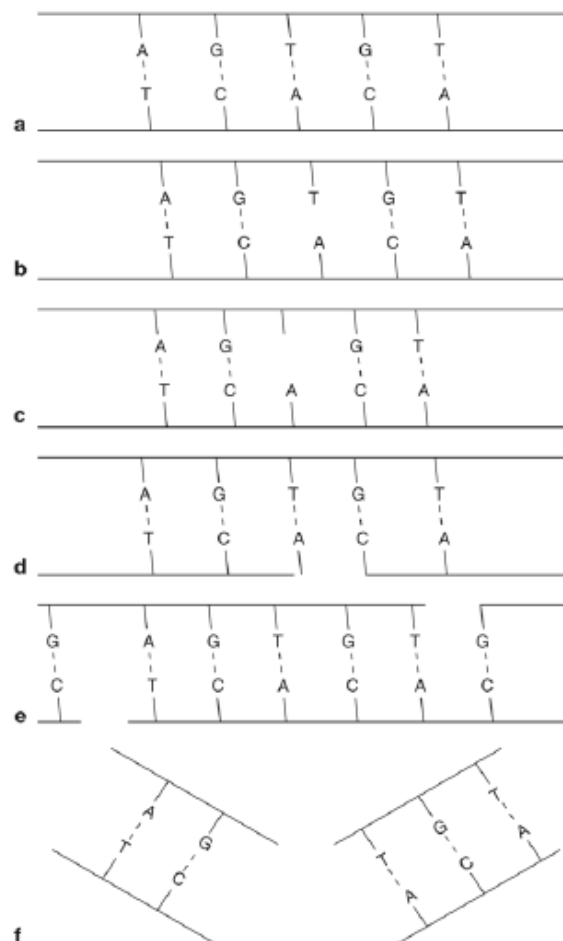


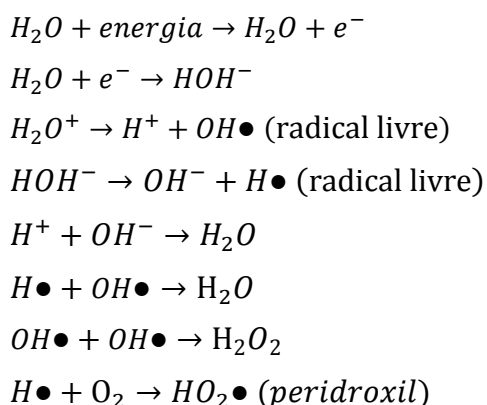
Figura 11. Ilustração dos efeitos da radiação nas moléculas de DNA: a Molécula de DNA normal; b ligação de hidrogênio é quebrada sem a perda da base; c ligação de hidrogênio é quebrada com a perda da base T; d quebra de fita única que pode ser

reparada; e quebras de fita dupla que são bem separados e podem ser reparada; f quebras de fita dupla que são muito próximas para serem reparadas^[23].

2.4.2 Ações Direta e Indireta da Radiação.

A molécula de DNA de uma célula é o alvo mais sensível à radiação. O dano da radiação à célula pode ser causado por meio da ação direta e indireta da radiação nas moléculas de DNA. Na ação direta, a radiação colide com a molécula de DNA diretamente, rompendo a estrutura molecular (figura 12). Tal mudança estrutural leva ao dano celular ou mesmo à morte celular. Células danificadas que sobrevivem podem mais tarde induzir carcinogêneses ou outras anormalidades. Este processo se torna predominante com radiação de alta LET tais como partículas α e nêutrons, e altas doses de radiação^[19,23].

Na ação indireta, a radiação se choca com as moléculas de água, o maior constituinte da célula, e outras moléculas orgânicas na célula, através do qual radicais livres tais como o peridroxil ($\text{HO}_2\bullet$) e alcóxi ($\text{RO}_2\bullet$) são produzidos. Uma variedade de reações que podem ocorrer após a radiação interagir com a molécula de água é mostrado abaixo.



Radicais livres são caracterizados por um elétron desemparelhado na estrutura, o qual é muito reativo, e, portanto, reage com moléculas para causar um dano estrutural na molécula (fig. 12). O peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , também é tóxico para a molécula. O resultado da ação indireta da radiação nas moléculas é a diminuição da função ou a morte da célula. O número de radicais livres produzidos pela radiação ionizante

depende da dose total, mas não da taxa de dose. Sabe-se que a maioria do dano induzido por radiação resulta dos mecanismos da ação indireta, porque a água é responsável por aproximadamente 70% dos constituintes da célula^[19,23].

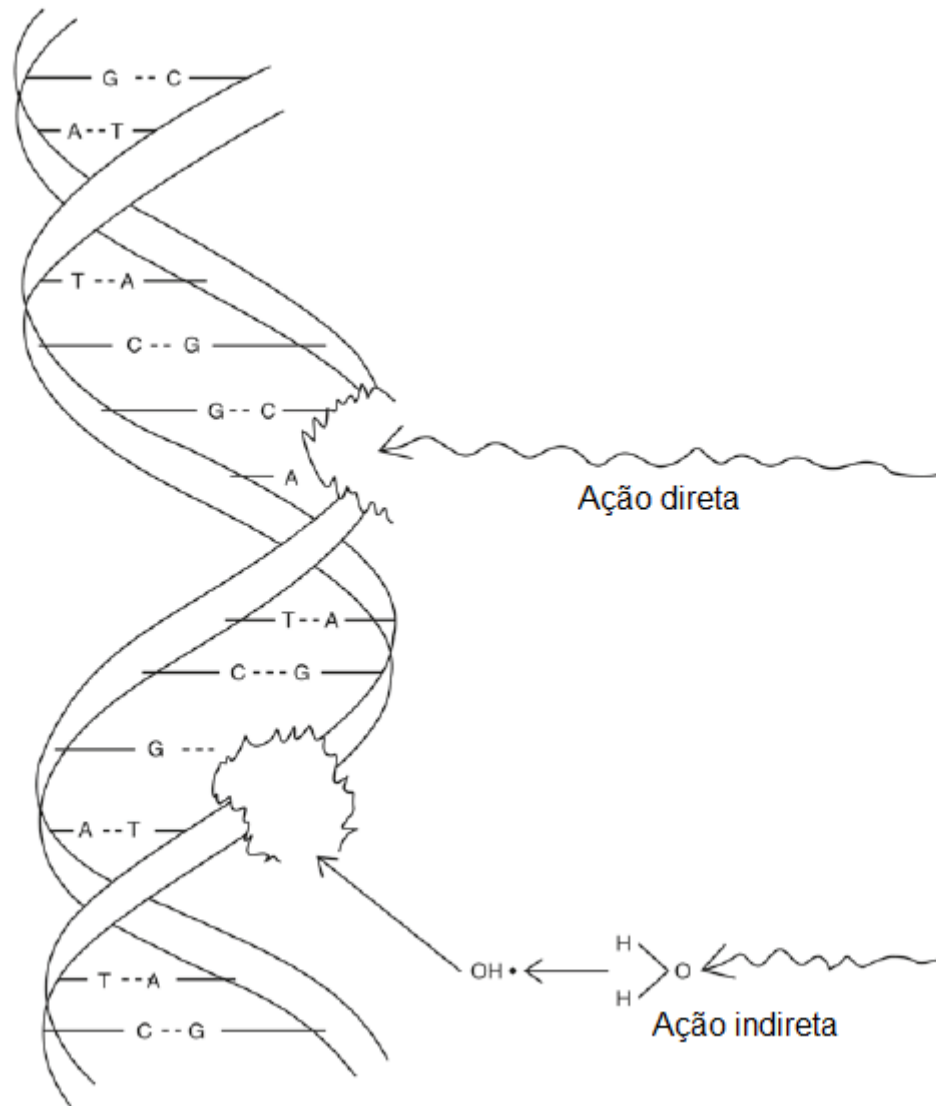


Figura 12. Ilustração da ação direta e indireta na molécula de DNA. Na ação direta, a radiação colide com a estrutura do DNA diretamente, ao passo que na ação indireta, a radiação produz radicais livres no citoplasma, os quais reagem adversamente com a molécula de DNA para causar dano estrutural^[23].

2.5 Grandeza Físicas

Para falar dos efeitos da radiação gama na estrutura dos DNAs apresentados nesse trabalho, faz-se necessário a definição de alguns parâmetros físicos aqui relacionados.

2.5.1 Exposição

A exposição, que tem como símbolo o X , é uma grandeza definida apenas para fótons de raios X e gama, quando estes interagem no ar. Em outras palavras, ela é uma medida da habilidade dos fótons para ionizar o ar e é de valor limitado na física de radiação moderna, porque é definida somente para o ar como meio absorvedor e para fótons em um intervalo de energia $h\nu$, relativamente estreito, de $1 \text{ keV} < h\nu < 3 \text{ MeV}$. A definição de exposição é, então^[43,44]:

$$X = \frac{dQ}{dm}, \quad (54)$$

onde dQ é o valor absoluto da carga total de íons de mesmo sinal, produzidos no ar, quando todas as partículas carregadas (elétrons e pósitrons) liberados por fótons num elemento de volume de ar cuja massa é dm , forem completamente freados no ar. Inicialmente, a unidade de exposição foi definida como röntgen (com o símbolo de r , mais tarde modificado para R); sendo a nova unidade no Sistema Internacional – SI o $C/(kg \text{ de ar})$, de modo que^[43,44]:

$$1R = 2,58 \times 10^{-4} \frac{C}{kg_{ar}} \text{ (exatamente),}$$

ou

$$1 \frac{C}{kg_{ar}} = 3.876R.$$

É possível calcular o número N_p de pares de íons formados em um volume de ar com massa de $1kg$ quando exposto à radiação X ou gama no valor de $1R$. Sabemos que a carga de 1 íon é a carga de 1 elétron, que é igual a $1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$. Logo^[43] :

$$N_p = \frac{\text{carga total de íons de um mesmo sinal}}{\text{carga do elétron}},$$

$$N_p = \frac{2,58 \times 10^{-4} C}{1,6 \times 10^{-19} C} = 1,6125 \times 10^{15} \text{ pares de íons.} \quad (55)$$

2.5.1.1 Relação entre a Exposição X e a Atividade $\mathcal{A}$ de uma Fonte Emissora de Raios gama

A exposição devido a raios gama emitidos por uma fonte radioativa de atividade conhecida pode ser calculada por meio da relação^[43]:

$$X = \frac{\Gamma \mathcal{A} t}{r^2}, \quad (56)$$

onde X é a exposição; Γ , a constante de taxa de exposição de um radionuclídeo que emite fótons; $\mathcal{A}$, a atividade da fonte; t , o tempo de exposição e r , a distância até a fonte. Γ é característico de um radionuclídeo e é função da energia e da abundância dos fótons emitidos e do coeficiente máximo de absorção de energia do ar. Por exemplo, o radionuclídeo Co-60 de meia vida física igual a 5,26 anos e energia média dos fótons igual a 1,250 MeV tem $\Gamma = 12,97 \text{ R} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mCi}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ^[43].

2.5.2 Dose Absorvida

A dose absorvida D é a grandeza mais importante em dosimetria da radiação, intimamente ligada aos danos biológicos. Ela é definida como^[43,44]:

$$D = \frac{dE}{dm}, \quad (57)$$

onde dE é a energia média depositada pela radiação em volume elementar de massa dm . Quando foi introduzida em 1950 sua unidade era o rad, abreviação para *radiation absorbed dose*, sendo^[43]:

$$1 \text{ rad} = 10^{-2} \frac{\text{J}}{\text{kg}}.$$

Essa grandeza pode ser usada medições em qualquer meio e para todos tipo de radiação^[43,44]. A definição da unidade rad foi estabelecida levando em conta que uma exposição à radiação X de 1 R com energia na faixa dos raios X usados em diagnóstico, resultasse em uma dose absorvida de 1 rad no tecido mole. Para o osso, resultava em uma dose absorvida de aproximadamente 6 rad. A partir de 1975, foi recomendada a substituição dessa unidade pelo gray (Gy) no Sistema Internacional, sendo^[43]:

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}}.$$

Como exemplo, pode-se citar que, em uma seção de radioterapia, o tumor é, em geral, irradiado com dose absorvida de radiação de $2 \text{ Gy} = 200 \text{ rad}$, e a dose total prescrita para o tratamento está em torno de 50 a 70 Gy. Em radiodiagnóstico o paciente é irradiado com uma dose que varia de 1,0 mGy a 12,0 mGy para tensões de pico entre 40 kVp a 140 kVp ^[43,45].

Na Área Médica, especificamente Radioterapia, costuma-se usar a unidade centigray (cGy), uma vez que $1 \text{ cGy} = 1 \text{ rad}$ ^[43].

2.5.2.1 Relação entre a Dose Absorvida no Ar e Exposição a Raios X e gama.

A dose absorvida no ar é dada por^[43].

$$D_{ar} = \frac{\text{energia média depositada pela radiação}}{1kg_{ar}} \quad (58)$$

Quando toda a energia cinética dos elétrons liberados pela radiação no ar é gasta em colisões, sem emissão de radiação de freamento, pode-se dizer que^[43]:

$$D_{ar} = \frac{WN_p}{1kg_{ar}}, \quad (59)$$

onde W é a energia média necessária para formar um par de íons no ar seco – que, no caso de a radiação incidente ser constituída de elétrons ou fótons, vale $W = 33,97 \text{ eV} = 33,97 \times 1,6 \times 10^{-19} \text{ J}$; N_p é o número de pares de íons produzidos no volume de ar com massa de 1 kg. Se a radiação é com fótons, que produzem uma exposição X de 1 R, N_p pode ser obtido como visto na Eq. (55) ^[43]:

$$X = 1 \text{ R} = 2,58 \times 10^{-4} \frac{\text{C}}{\text{kg}_{ar}}, \quad N_p = 1,6125 \times 10^{15} \text{ pares de íons}$$

Ao substituírmos esses valores na Eq. (59), obtemos para a dose absorvida no ar^[43]:

$$D_{ar}(\text{Gy}) = \frac{(33,97 \times 1,6 \times 10^{-19} \text{ J})(1,6125 \times 10^{15} \text{ pares de íons})}{1kg_{ar}},$$

$$D_{ar} = 0,00876 \text{ Gy} = 8,76 \text{ mGy, para exposição de } X = 1 \text{ R.}$$

Para qualquer outro valor de exposição em R usa-se a seguinte relação^[43]..:

$$D_{ar}(Gy) = 0,00876X(R). \quad (60)$$

Essa relação só é válida quando houver equilíbrio eletrônico no volume em questão. Nessa situação cada partícula carregada que deixa o volume de interesse com dada energia cinética é substituída por outra partícula carregada secundária, que entra no volume com a mesma energia cinética^[43,44].

A dose no ar pode também ser calculada conhecendo-se o coeficiente mássico de absorção de energia^[43],

$$\mu_m = \left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{ar}, \quad (61)$$

onde μ_{ab} é o coeficiente de atenuação linear do meio (no caso o ar), que depende do material que constitui o meio e da energia da radiação; ρ é a densidade do meio (no caso o ar). μ_m é expresso em $[cm^2/g]$, é independente da densidade do material e tem valores menos variáveis entre os elementos químicos. Além disso, é necessário que se conheça também a fluência ψ que caracteriza um dado campo de radiação. A fluência é a energia transportada por um feixe por unidade de área. Para um feixe monoenergético de fótons é definida como^[43,44]:

$$\psi = \frac{N}{S} h\nu, \quad (62)$$

onde N é o número de fótons que atravessam a área S, e $h\nu$ é a energia de cada fóton do feixe. No caso do feixe não ser monoenergético, deve se considerar o espectro de energia do mesmo^[43,44]..

A dose absorvida no ar será dada, em condições de equilíbrio eletrônico, por^[43]:

$$D_{ar} = \left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{ar} \psi. \quad (63)$$

2.5.2.2 Dose absorvida num meio

Para meios diferentes do ar, como os tecidos menos densos de um corpo, a dose absorvida pode ser calculada levando em conta a dose absorvida no ar no mesmo local. Isso pode ser feito através da razão dos coeficientes mássicos de absorção de energia no meio, pelo de absorção de energia no ar. Tais coeficientes tem dependência com o meio e com a energia da radiação^[43].

Assim, a dose absorvida no meio pode ser definida como^[43]:

$$D_{meio} = \left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{meio} \psi, \quad (64)$$

onde: μ_{ab} , ρ e ψ foram definidos acima.

Se dividirmos a Eq. (64) pela Eq. (63), e se a fluência de energia é a mesma no ar e no meio, obtemos^[43]:

$$\frac{D_{meio}}{D_{ar}} = \frac{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{meio} \psi}{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{ar} \psi} \rightarrow D_{meio} = \frac{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{meio}}{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{ar}} D_{ar} \quad (65)$$

mas da Eq. (60) a dose no ar (D_{ar}) em Gy é

$$D_{ar}(Gy) = 0,00876X(R).$$

Substituindo esse valor na Eq. (65), fica

$$D_{meio}(Gy) = 0,00876 \frac{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{meio}}{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{ar}} X(R) = 0,00876 f X(R), \quad (66)$$

onde $f = \frac{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{meio}}{\left(\frac{\mu_{ab}}{\rho} \right)_{ar}}$, que é chamado de fator f ^[43].

Por conseguinte, da Eq. (64), nota-se que é possível calcular a dose num dado meio medindo-se a exposição no ar, no mesmo local. Observe que a dose é dada em Gy, se o fator 0,00876 for usado, e se a exposição for medida em R^[43].

A Tabela 1 contém os valores de f para alguns meios com a energia correspondente.

Tabela 1- Alguns meios com seus respectivos fatores f e energia.

Energia do fóton (MeV)	<i>f</i> (água/ar)	<i>f</i> (músculo/ar)	<i>f</i> (gordura/ar)	<i>f</i> (osso/ar)
0,010	1,04	1,05	0,62	5,65
0,030	1,01	1,05	0,62	6,96
0,050	1,03	1,06	0,75	5,70
0,100	1,10	1,09	1,05	1,97
0,200	1,11	1,10	1,11	1,12
0,600	1,11	1,10	1,11	1,03
1,250	1,11	1,10	1,11	1,03

Fonte: OKUNO, Emico; YOSHIMURA, Elisabeth Mateus. **Física das radiações**. Oficina de Textos, 2010.

3 METODOLOGIA

3.1 Parasitos

Utilizou-se amostras de DNA genômico dos parasitas do gênero *Leishmania*. Essas amostras foram fornecidas pelo Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pelo Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva, colaborador nesse trabalho. Foram usadas duas espécies, a *L. infantum* e a *L. major*. Além disso, foram analisadas também amostras das quatro bases nitrogenadas que compõem o DNA em separado: Adenina, Guanina, Timina e Citosina, na concentração de 100mM (Ludwig Biotech, Brasil).

Este modelo de parasitos possui um cariótipo de 36 cromossomos se comparado a outros parasitos como o *L. braziliensis*.² Além disso os parasitos do gênero *Leishmania* se reproduzem basicamente de forma monoclonal, o que lhes confere uma propagação integral do material genético para seus descendentes. Nesse modelo, segregação e recombinação, que ocorre na reprodução sexual, estão

² Mais informações podem ser obtidas em: POUBEL, S. B. VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *Leishmania infantum* x *L. chagasi* PROCEDENTES DE VÁRIAS REGIÕES DO BRASIL. 2010. Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Setor de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, Paraná.

ausentes. Isso permite cultivar esses parasitos em grande quantidade sem ocorrências de aberrações³.

3.2 Preparação das amostras.

As amostras de DNA utilizadas nesse trabalho foram obtidas a partir de alíquotas do DNA de formas promastigotas de *L. infantum* e *L. major*. O DNA foi extraído de 10^7 parasitos mantidos em meio de cultura α -MEM com auxílio de um kit comercial, de acordo com as recomendações do fabricante^[46] obtendo-se uma concentração de 61,5 ng/ μ L para a *L. major* e 90,9 ng/ μ L para a *L. infantum*. O DNA extraído de cada espécie foi alíquotado em volumes de 10 μ L e colocado dentro de tubos plásticos de microcentrifuga, tipo eppendorf, a fim de se evitar contaminação e desnaturação em processos de descongelamento repetitivos durante as medidas. As amostras foram mantidas a -20 °C para evitar desnaturação, processo no qual as moléculas de DNA se rompem e perdem sua configuração helicoidal.

3.3 Procedimento de Irradiação

Três alíquotas de cada base separadas de DNA foram submetidas, cada uma, a diferentes doses de radiação gama de uma fonte de Co-60 (tempo de meia-vida física 5,2 anos) cuja energia média dos fótons é igual a 1,250 MeV (Tabela 2). O DNA dos parasitos foi irradiado somente com a maior dose. As irradiações foram feitas no CDTN em Belo Horizonte, em colaboração com a dra. Estefânia Martins. Também foram irradiadas, nas três doses, alíquotas de água de 10 μ L cada. As três doses foram feitas a uma distância de 3,5 m e a uma taxa de dose de 34,92 Gy/h e atividade $\mathcal{A} = 26.359,65$ Ci.

Tabela 2. Doses de saída e absorvida da fonte de Co-60 nas amostras, além do tempo utilizado na irradiação de cada dose.

Dose de saída (Gy)	Dose absorvida (Gy)	Tempo (min)
1,8	1,44	3
5	3,91	8,6

³ Mais informações podem ser obtidas em: SILVA, V. P. M. VARIAÇÃO GENÉTICA DE *Leishmania* spp. CIRCULANTES ENTRE HUMANOS E CÃES E INFECÇÕES DE FLEBOTOMÍNEOS EM ÁREAS ENDÊMICAS PARA AS LEISHMANIOSES NO RIO GRANDE DO NORTE. 2015. Tese (Doutoramento em Bioquímica). Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte.

15	12,02	25,7
----	-------	------

3.4 Obtenção dos Espectros Raman

Todas estas amostras foram medidas no equipamento micro-Raman Multiusuários da UFU. A configuração microscopia Raman utilizada foi 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); detector CCD (Charge Coupled Device); fontes de excitação (lasers) com acessórios ópticos (filtros, lentes, prismas, etc.) e um microscópio da Olympikus, conforme esquema da figura 13.

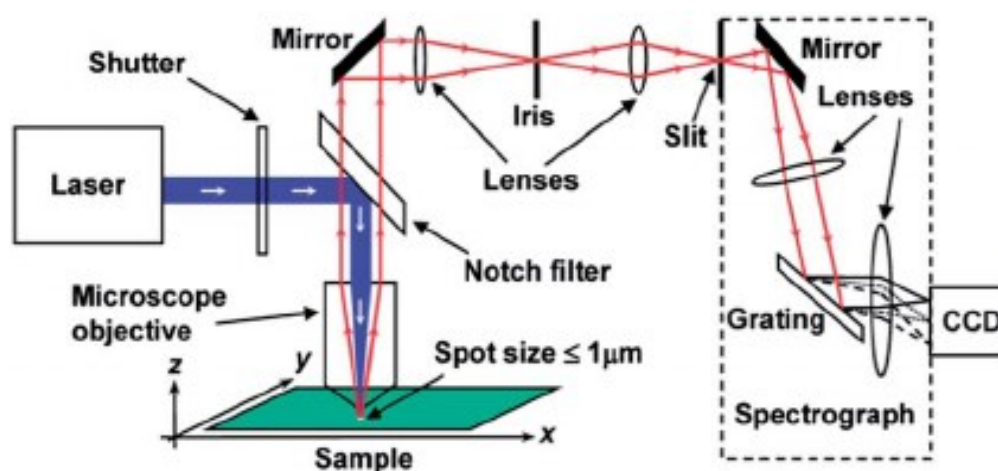


Figura 13. Esquema do espectrômetro Raman. Fonte: https://www.researchgate.net/profile/Haishan_Zeng/publication/261609194/figure/fig1/AS:296929436160003@1447804902253/Fig-1-Schematic-of-the-LabRam-system-used-for-recording-Raman-micro-spectra-Not-shown.png

Utilizou-se o comprimento de onda de excitação do laser nas amostras em 325 nm, na região do ultravioleta. Para as amostras não irradiadas foi utilizado uma potência de saída do laser em 50%, 3 acumulações, 20 segundos de exposição ao laser. Para as bases irradiadas foi utilizada uma potência de saída do laser em 100%, 3 acumulações e 60 segundos de exposição ao laser. As espécies *L. infantum* e *L. major*, foram medidas com uma potência de saída do laser em 100%, 10 acumulações e 10 segundos de exposição ao laser. A região espectral de interesse foi de 70 cm⁻¹ à 2000 cm⁻¹, onde a maioria dos constituintes do DNA possuem modos vibracionais

importantes e ativos no Raman. As frequências das bandas vibracionais foram obtidas através do ajuste por lorentzianas, usando o software Origin 9.0®.

Na obtenção dos espectros Raman foi confeccionado um substrato, onde numa lâmina de microscópio foram feitos 18 poços e metalizados com ouro, em seguida. Os poços foram feitos com a ajuda de uma broca óptica, e depois pulverizados com ouro. Esse substrato permitiu obter um melhor sinal/ruído nos espectros.

Para se realizar as medidas, pingou-se uma alíquota das amostras em solução, dentro de um dos poços, com o auxílio de uma pipeta; e em seguida, os espectros Raman foram obtidos. Utilizou se uma lâmina ou poço diferente para cada medição efetuada (fig. 14).

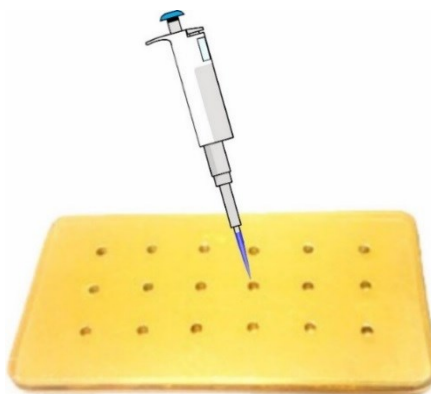


Figura 14. Lâmina com poços e metalizada com ouro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.

Caracterização Raman das amostras.

Bases nitrogenadas

Na figura 15 pode-se observar os espectros Raman das quatro bases nitrogenadas que compõem o DNA. A região de interesse de acordo com os espectros é de 70 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} .

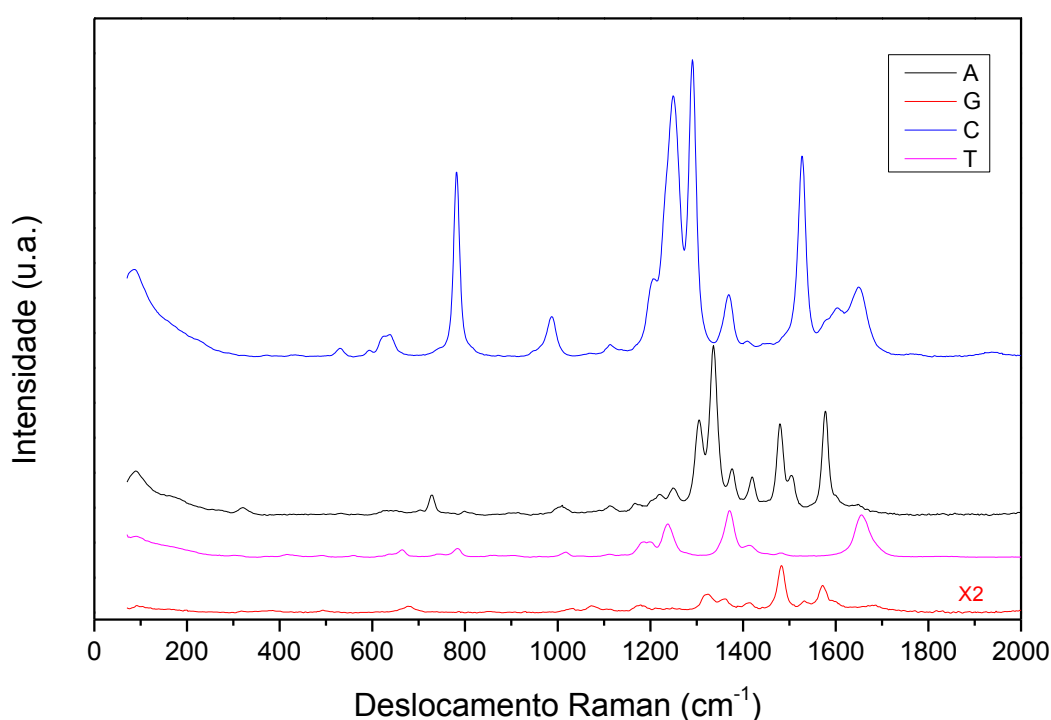


Figura 15. Espectros Raman das bases nitrogenadas que compõem o DNA: adenina A (linha preta), guanina G (linha vermelha), citosina C (linha azul) e timina T (linha rosa). Região 70 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} . Excitação do laser 325 nm.

Em todos os espectros Raman na fig. 15 foi possível observar bandas que correspondem aos grupamentos químicos que compõem as bases. Para tentar atribuir os modos vibracionais presentes nas bandas com mais acurácia, cada espectro foi dividido em quatro regiões, são elas: **Região I** – $70\text{--}560\text{ cm}^{-1}$; **Região II** – $560\text{--}1140\text{ cm}^{-1}$; **Região III** – $1140\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$; **Região IV** – $1450\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$. Além disso, foi feito o ajuste das regiões espectrais selecionadas usando o Programa Origin® Versão 9.0,

com funções Lorentzianas, que descrevem a amplitude das oscilações em função da energia, tendo o oscilador harmônico como modelo físico.

Função Lorentziana utilizada:

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x - x_c)^2 + w^2} \quad (67)$$

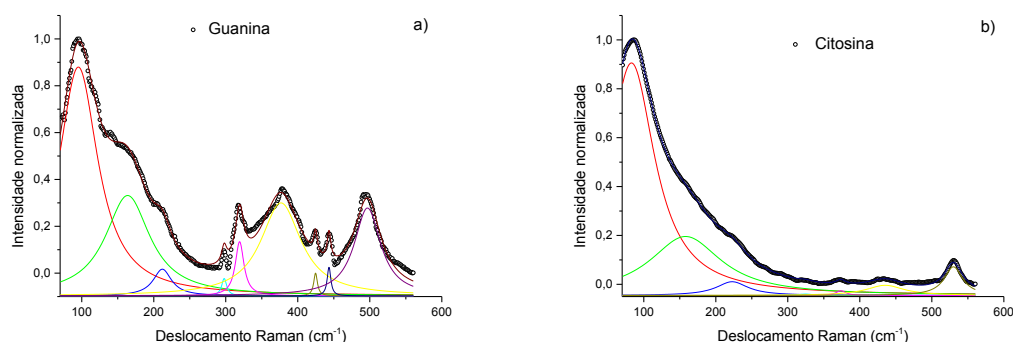
Onde: A = área; w = largura e x_c = centro.

O procedimento de ajuste foi o seguinte:

- 1 – foi selecionada a mesma região para todas as bases.
- 2 – foram adicionadas lorentzianas correspondentes aos grupamentos químicos presentes nas estruturas das bases; e em número, de acordo com a literatura.

Região I – 70-560 cm^{-1}

A figura 16 apresenta os espectros Raman das bases nitrogenadas G, C, A e T para a região espectral 70 cm^{-1} a 560 cm^{-1} . Essa região corresponde aos modos de torção dos anéis das bases de DNA^[14]. Como pode ser observado nos ajustes, foram necessárias entre 6 e 9 lorentzianas para a análise dessa região. Cada uma das bases apresentam uma assinatura espectral distinta. Isso se deve às diferenças na configuração e conformação molecular de cada base. Contudo, os espectros também apresentam bandas em posições similares: em torno de 90 cm^{-1} , 200 cm^{-1} , 300 cm^{-1} e 500 cm^{-1} . À banda em torno de 500 cm^{-1} é atribuído o modo de cisalhamento para as bases C e G^[47].



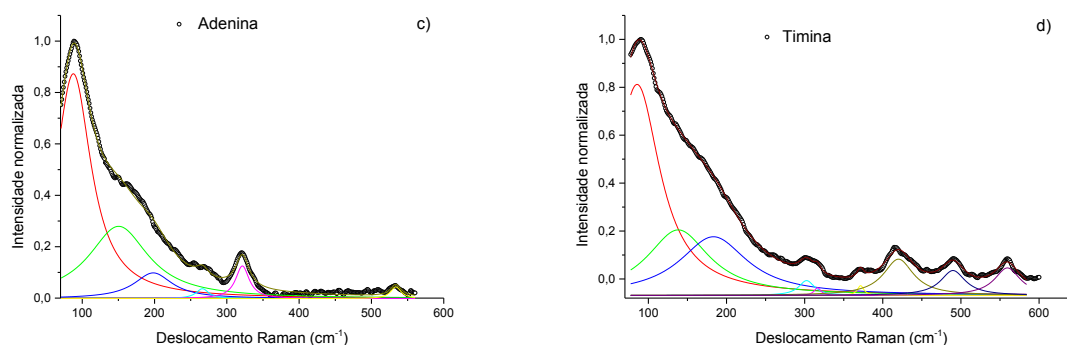
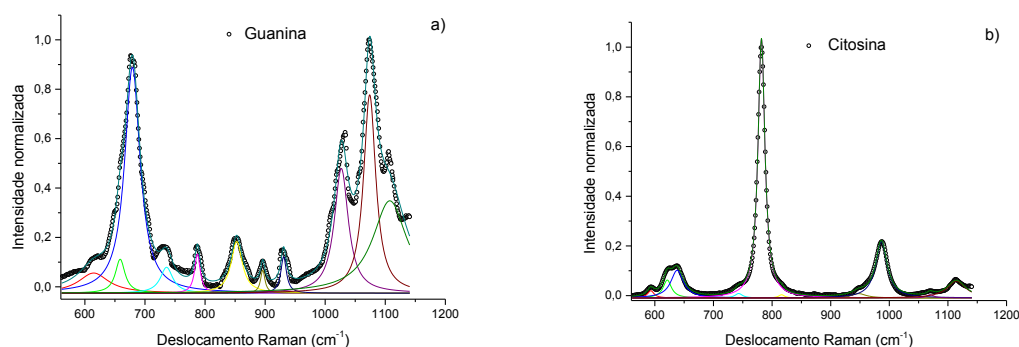


Figura 16. Ajustes com lorentzianas dos espectros Raman para a região 70-560 cm^{-1} . Em a) guanina, b) citosina, c) adenina e d) timina.

Região II – 560-1140 cm^{-1}

Para ajustar essa região foram necessárias entre 10 e 15 lorentzianas (figura 17). A banda em torno de 780 cm^{-1} é mais intensa nas bases C e T (comum para todas as pirimidinas^[14]) representa os modos de respiração dos anéis dessas bases^[47]. As bandas próximas de 900 e 1140 cm^{-1} estão associadas aos modos vibracionais de estiramento das ligações C-C e C-N^[48]. Já as bandas na região de menor energia entre 600 e 750 cm^{-1} podem ser atribuídas aos modos de torção das ligações C-C, além dos modos de respiração das bases^[48].



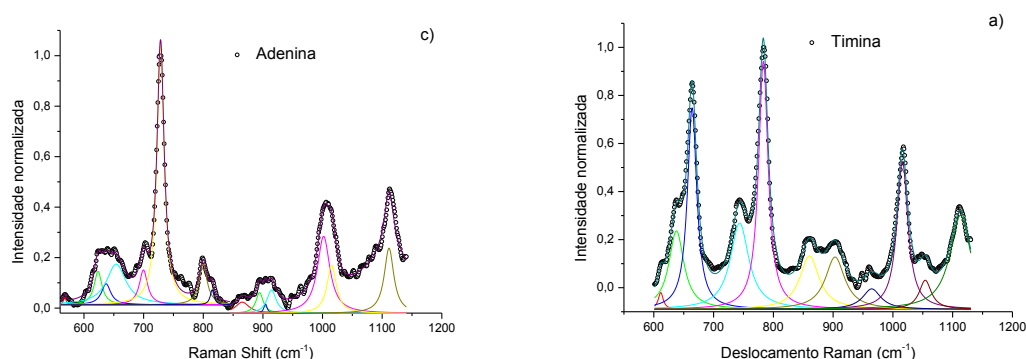


Figura 17. Ajustes com lorentzianas dos espectros Raman para a região 560-1140 cm^{-1} . Em a) guanina, b) citosina, c) adenina e d) timina.

Região III – 1140-1450 cm^{-1}

Para fazer o ajuste dessa região foram necessárias entre 6 e 10 lorentzianas, como pode ser constatado na figura 18. Nesse intervalo podem ser encontradas os modos vibracionais correspondentes às ligações C-C, C=C (A, T, C e G), C=O (G, T e C), C-N (A, T, C e G), N-H (A, T, C e G), CH_3 (T) e NH_2 (C e A) que são comuns das bases nitrogenadas [14,47-49].

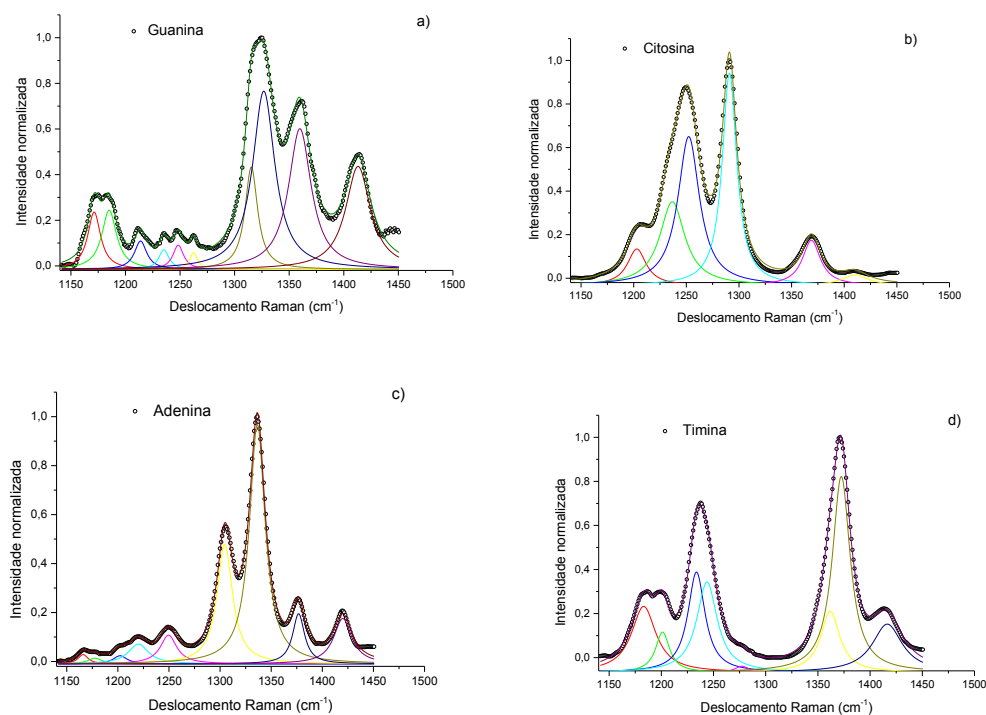


Figura 18. Ajustes com lorentzianas dos espectros Raman para a região 1140-1450 cm^{-1} . Em a) guanina, b) citosina, c) adenina e d) timina.

Região IV – 1450-2000 cm^{-1}

O ajuste nessa região foi feito apenas com no máximo 5 lorentzianas, o que pode ser verificado na figura 19. O intervalo de 1480 – 1575 cm^{-1} corresponde ao grupo amida II presente nas bases C, T e G. A região compreendida entre 1500 e 1700 cm^{-1} é bem conhecida pela predominância dos modos vibracionais associados às ligações C=C, C=O e C=N^[49].

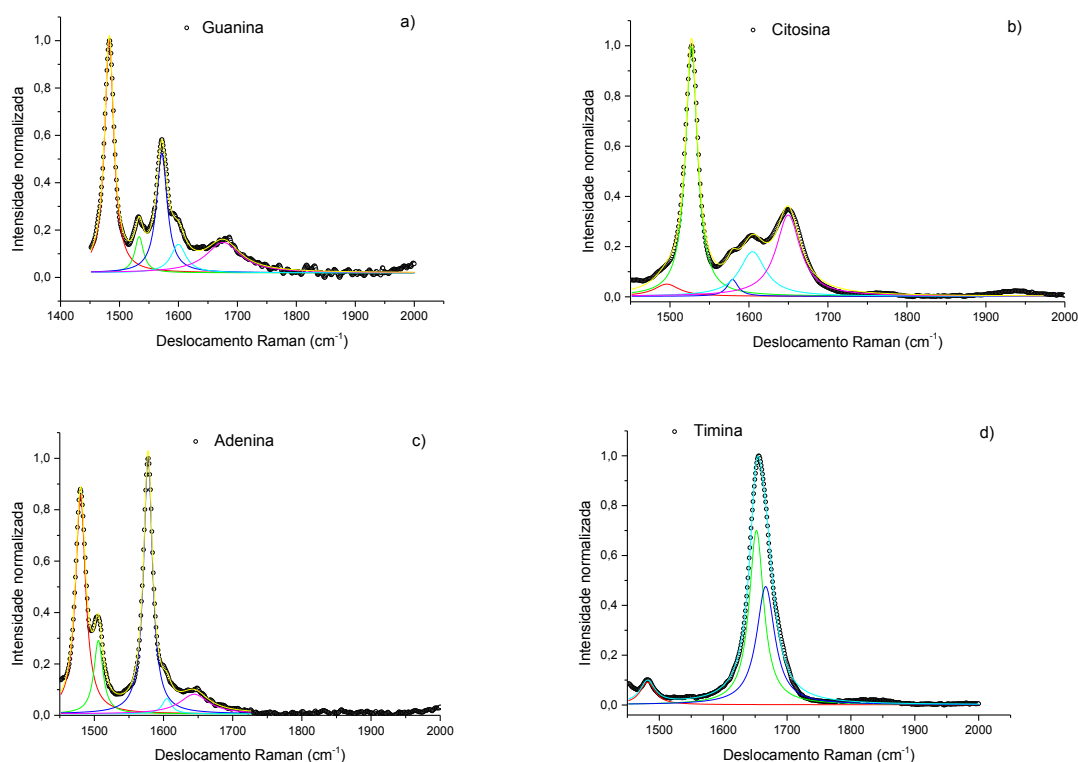


Figura 19. Ajustes com lorentzianas dos espectros Raman para a região 1450-2000 cm^{-1} . Em a) guanina, b) citosina, c) adenina e d) timina.

A figura 20 mostra a estrutura química, bem como os tipos de ligações das bases nitrogenadas constituintes do DNA.

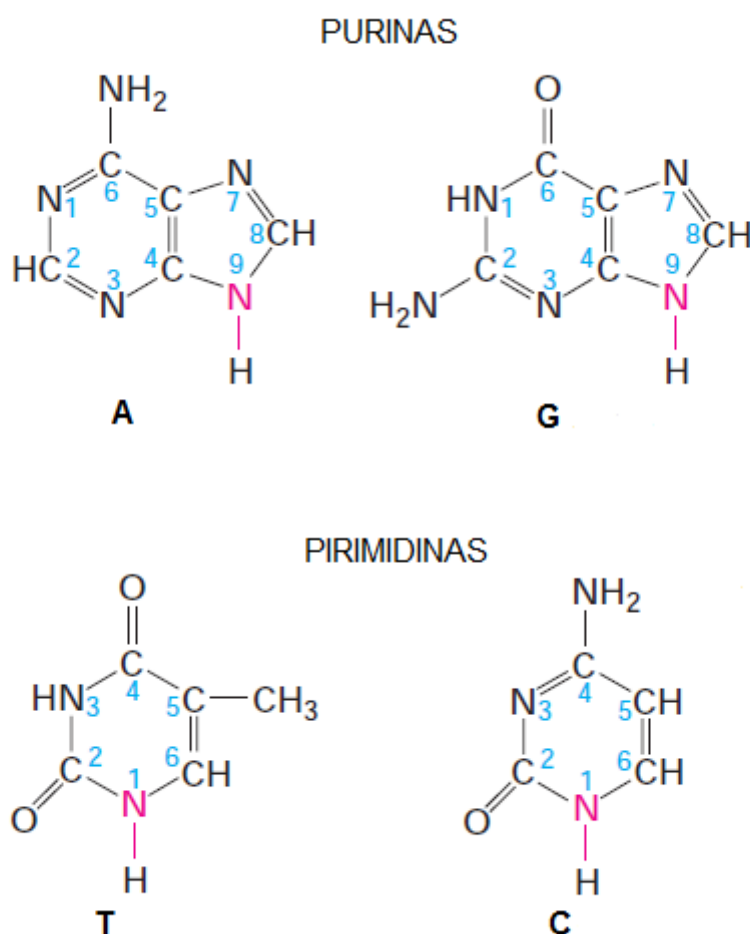


Figura 20. Estrutura química das bases A, G, T e C. Adaptado da referência [51].

A tentativa de atribuição dos modos normais de ligação, bem como a localização de cada base, está apresentada nas Tabelas 3, 4, 5 e 6. Nessas tabelas, foram colocados os valores de cada Lorentziana encontrada para cada base e comparadas com os valores encontrados na Literatura. Em seguida, fizemos a atribuição dos modos e especificação das bases.

Considerando o erro experimental no deslocamento Raman $< 1 \text{ cm}^{-1}$, podemos observar que em todas as bases, temos a presença dos modos normais de vibração que as caracterizam como bases nitrogenadas.

Tabela 3. Deslocamentos Raman ν (cm^{-1}) para a base **adenina A** e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.

Frequência	Atribuições	Referência
------------	-------------	------------

ν (cm⁻¹)		
87	Banda sem atribuição	
150	Banda sem atribuição	
198	Torção do grupo COO ⁻	[49]
266	Banda sem atribuição	
321	Cisalhamento da ligação C-N, Adenina	[14, 52]
533	Adenina	[52]
567	Banda sem atribuição	
623	Adenina, modo de torção da ligação C-C, CN-NCC	[14, 48, 52]
637	Adenina, modo angular para fora do plano associado à ligação OH	[50, 52]
654	Adenina	[52]
699	Modos angulares para fora do plano	[50]
728	Modos angulares para fora do plano do grupo amina, Adenina	[14, 48, 50, 52]
799	Banda sem atribuição	
814	Deformação da ligação CH no anel,	[50]
865	Associada ao estiramento da ligação CC	[48-49]
894	Associada ao estiramento da ligação CC	[49]
904	Associada ao estiramento da ligação CC	[49]
914	Associada ao estiramento da ligação CC	[49]
1001	Associada ao estiramento da ligação CC, vibração de estiramento de anel associada fortemente aos modos de torção no plano da ligação CH, estiramento do anel aromático da adenina	[48-50]

1015	Associada ao estiramento da ligação CC, vibração de estiramento de anel associada fortemente aos modos de torção no plano da ligação CH	[49-50]
1111	Deformação do anel de benzeno da adenina, estiramento da ligação CC	[48-50]
1166	Estiramento da ligação CC	[50]
1177	Modo angular assimétrico do grupo CNH ₂	[49]
1202	Banda sem atribuição	
1220	Adenina	[48]
1249	Modos associados às ligações CN e CH, Adenia	[14, 52]
1304	Adenina, deformação do grupo CH ₂	[48, 52]
1336	Adenina, modos atribuídos à ligação CN, bases purinas de DNA, movimento tipo tesoura das ligações CH	[14, 48, 50, 52]
1376	Modo de respiração do anel da adenina, modos relacionados às ligações CN, Adenina	[14, 48, 52]
1419	Adenina, modo de deformação das ligações CH	[14, 48, 50, 52]
1479	Adenina, Benzeno	[48, 50, 52]
1505	Modos angulares no plano das ligações CH, respiração do anel, adenina	[48, 50, 52]
1577	Vibração da ligação C=N, respiração do anel, adenina	[48, 50, 52]
1604	Vibração da adenina, vibração da ligação C=O	[48, 50]
1644	Modo angular intermolecular da água	[48, 52]

Tabela 4. Deslocamentos Raman ν (cm⁻¹) para a base **citossina C** e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.

Frequência ν (cm⁻¹)	Atribuições	Referência
82	Cisalhamento de anel	[47]
158	Banda sem atribuição	
222	Torção de anel	[47]
324	Banda sem atribuição	
374	Vibração tipo abanamento da ligação NH ₂ e OH	[47]
435	Torção de anel	[47]
529	Torção do grupo COH, Cisalhamento de anel	[47]
593	Citosina, Cisalhamento de anel	[14, 47, 52]
621	Citosina, C=O+NR ⁺ +CN, modo de torção C-C	[14, 47-48]
637	Citosina, vibração angular fora do plano das ligações CH	[52]
743	Torção de anel, vibração angulares fora do plano	[47, 50]
781	Citosina, Respiração de anel, torção de anel, vibração angulares fora do plano	[14, 47-48, 50, 52]
816	Estiramento da ligação C-C (atribuição a colágeno), deformação de CH do anel	[48, 50]
947	Vibração CH fora do plano	[47]
986	Vibração da ligação CH, Vibração CH fora do plano, Estiramento β -folha da ligação C-C	[14, 47]
1069	Modo angular da ligação CH	[47]
1114	Modo angular da ligação CH	[47]
1202	Modo angular do grupo COH, Tirosina e Fenilalanina	[47-48]
1236	Aparece nessa referência sem atribuição	[14]

1252	Citosina	[52]
1291	Citosina, Vibração das ligações NC + C=C, Citosina, deformação de NH	[14, 48, 50, 52]
1368	Vibração das ligações N=C-C=C, estiramento da ligação C-C.	[14, 50]
1410	Estiramento da ligação C-O(H), estiramento simétrico de COO ⁻ , estiramento da ligação C-N e deformação das ligações N-H, e C-H	[47, 50]
1495	Citosina, Estiramento das ligações CN, estiramento C=C no anel, deformação de CH	[47-48, 50, 52]
1527	Citosina, vibração no plano do conjugado –C=C–, estiramento das ligações C=C e C=N	[48, 52]
1579	Anel de pirimidina	[48, 52]
1604	Citosina, Estiramento das ligações CN e CC, Citosina (NH ₂), vibração da ligação C=N	[47-48, 50, 52]
1649	Citosina (Estiramento da ligação C=O) e H ₂ O, Vibração das ligações O=C-NC, conformação aleatória da citosina.	[14, 48, 50, 52]

Tabela 5. Deslocamentos Raman ν (cm⁻¹) para a base **guanina G** e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.

Frequência ν (cm⁻¹)	Atribuições	Referência
95	Cisalhamento de anel	[47]
163	Torção de anel	[47]
211	Banda sem atribuição	
297	Banda sem atribuição	
319	Cisalhamento do grupo NCC=O	[47]

376	Vibração associada às ligações CN, torção de anel	[14, 47]
424	Banda sem atribuição	
496	Guanina, vibração associada ao grupo CNC, modo angular fora do plano da ligação NH	[14, 47, 52]
614	Cisalhamento de anel	[47]
658	Guanina, estiramento em fase de anel, modo de anel	[14, 47, 52]
679	Guanina, modo de anel, modo de respiração do anel	[47-48, 52]
735	Estiramento de anel, vibrações angulares fora do plano	[47, 50]
787	Modo angular fora do plano da ligação NH, presença de DNA, guanina	[47-48, 50]
852	Modo angular fora do plano da ligação NH, Guanina, respiração do anel da tirosina	[47-48]
896	Modos associados à ligação C-C	[50]
930	Modo angular no plano do grupo NCN, modo de respiração esquelético C-C α -Hélice	[47-48]
1026	Vibração associada às ligações NH, modo angular das ligações CH, Picos de carboidratos para soluções	[14, 47, 50]
1074	Modo abanamento do grupo NH ₂ e estiramento das ligações CN, vibração da ligação C-C, conformação cis esquelética da ligação CC de DNA	[47-48, 50]
1107	Pico de carboidratos para solução, estiramento das ligações CC e CO	[48, 50]
1171	Vibração associada às ligações CN, CNH, Guanina, estiramento das ligações CO	[14, 48, 50]
1185	Modo angular das ligações CH, Guanina, Vibração de ligações CH ₂	[47-48, 50]

1213	Estiramento de anel e modo angular da ligação NH, Estiramento das ligações C-N	[47-48]
1235	Amida III	[48, 50]
1248	Guanina, amida III	[48, 50]
1262	Vibração associada às ligações CN e CH, modo angular do grupo COH, modo de respiração de anel	[14, 47-48]
1315	Guanina, amida III	[48, 50]
1326	Guanina, estiramento das ligações CN, modo angular das ligações NH, abanamento do grupo CH ₃ CH ₂ presente em purinas,	[47-48, 52]
1359	Vibração associada às ligações CN, estiramento de anel e modo angular da ligação NH, Triptofano, deformação de C-H e N-H	[47-48, 50, 52]
1413	Modo angular no plano das ligações NH, estiramento C-N e deformação C-H, N-H	[47, 50]
1482	Guanina, modo de respiração de anel, amida II, C-H acoplada com a vibração de anel da guanina	[47, 50, 52]
1533	Guanina	[50]
1571	Guanina, amida II	[48, 50, 52]
1599	Amida I, estiramento da ligação C=O	[48, 50]
1675	Guanina, estiramento da ligação C=O, estiramento C=C	[48, 50, 52]

Tabela 6. Deslocamentos Raman ν (cm⁻¹) para a base **timina T** e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.

Frequência ν (cm ⁻¹)	Atribuições	Referência
85	Cisalhamento de anel	[47]

132	Banda sem atribuição	
183	Banda sem atribuição	
302	Banda sem atribuição	
316	Vibração das ligações CN	[14]
371	Banda sem atribuição	
420	Banda sem atribuição	
489	Vibração das ligações CNC e NCC, timina	[14, 52]
559	Banda sem atribuição	
611	Vibrações angulares fora do plano das ligações CH, vibração do grupo NCO	[14, 50]
637	Associado com vibrações angulares fora do plano das ligações OH	[50]
664	Vibrações angulares fora do plano das ligações CH, modo de respiração do anel da timina, timina	[48, 50, 52]
743	Vibrações angulares fora do plano, modo de respiração do anel da timina, timina	[48, 50, 52]
783	Vibrações angulares fora do plano, timina, modo de respiração de anel, timina	[14, 48, 50, 52]
860	Vibrações angulares fora do plano, tirosina	[48, 50]
903	Vibrações angulares fora do plano,	[50]
964	Modo tipo tesoura das ligações C=O, modo angular fora do plano da ligação CH.	[50]
1015	Estiramento das ligações CO e CC, modo tipo tesoura do grupo OCH	[50]
1054	Estiramento das ligações CO, CN e CC, modo tipo tesoura do grupo OCH,	[48, 50]

1112	Estiramento das ligações CO e CC no anel, modo angular no plano da ligação CH.	[48, 50]
1181	Região da banda da amida III, vibração das ligações CH e CN, timina	[14, 50, 52]
1201	Região de vibração de bandas de DNA e Amida III, vibração das ligações CH e CN, timina	[14, 48, 50, 52]
1233	Amida III	[48, 50]
1243	Amida III, timina	[48, 50, 52]
1277	Timina, deformação N-H, amida III	[48, 50]
1361	Estiramento C-O, deformação C-H e N-H, triptofano, vibração das ligações NH-C=O	[14, 48, 50,]
1372	Deformação C-H e N-H, modo de respiração do anel, timina	[48, 50, 52]
1416	Deformação C-H e N-H, estiramento C-N, timina	[14, 50, 52]
1481	Região da amida II	[48, 50]
1652	Amida I, Vibração das ligações C=O e C-C	[14, 48, 50]
1666	Estiramento da ligação C=O, amida I, estiramento do grupo carbonil, timina	[14, 48, 50, 52]

DNA

Espectros Raman dos parasitos *L. infantum* e *L. major* foram obtidos sob as mesmas condições para as bases nitrogenadas.

A figura 21 apresenta os espectros Raman do DNA dos parasitos *L. infantum* e *L. major* antes de serem irradiados, na região entre 70 cm⁻¹ e 2000 cm⁻¹.

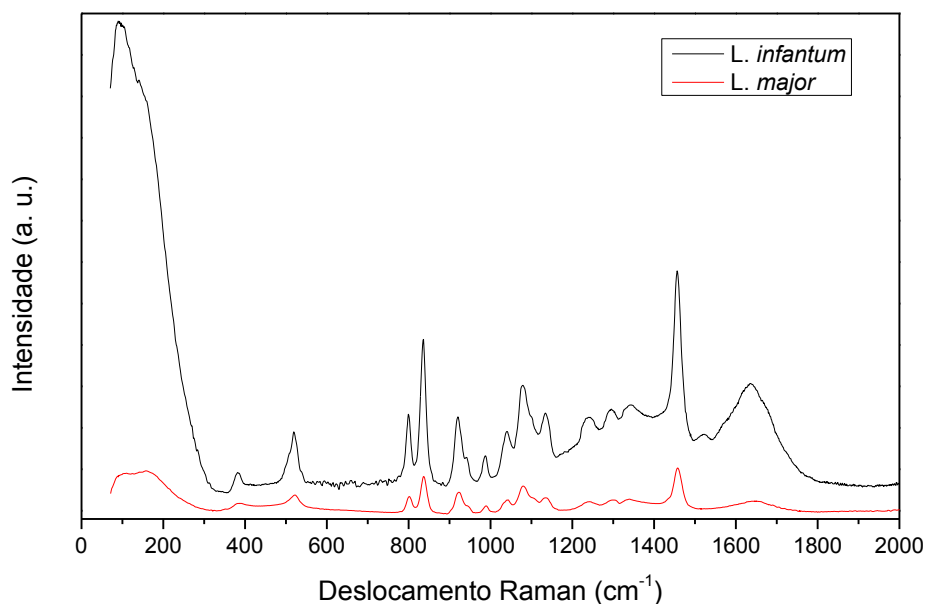


Figura 21. Espectros Raman para os parasitos *L. infantum* (linha preta) e *L. major* (linha vermelha). Região 70 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} . Excitação do laser 325 nm .

Observamos na fig. 21 que os dois parasitos apresentam a mesma forma espectral. As intensidades apresentam variação, pois a concentração de cada parasito numa mesma solução é diferente.

Neste caso os espectros foram divididos em três regiões, a saber, **Região I** – $70\text{--}890\text{ cm}^{-1}$, **Região II** – $890\text{--}1190\text{ cm}^{-1}$ e **Região III** – $1190\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$, e efetuado os ajustes com Lorentzianas.

Região I – $70\text{--}890\text{ cm}^{-1}$

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 ajustes que nessa região há a presença de pelo menos 07 Lorentzianas.

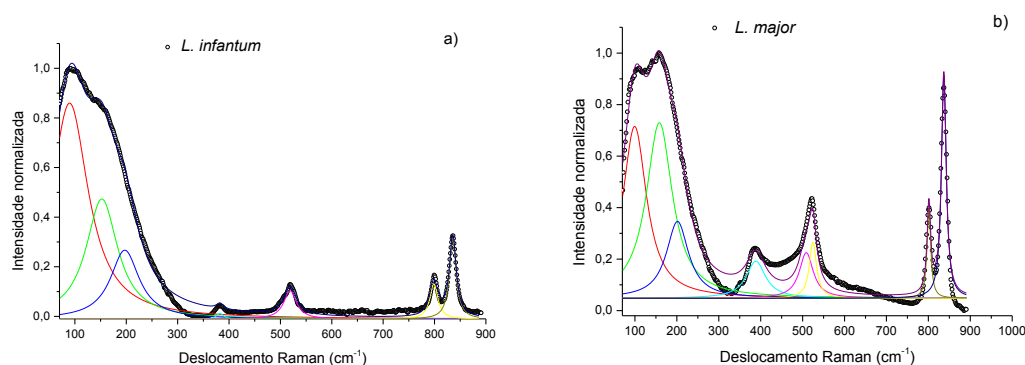


Figure 22. Ajustes com Lorentzianas da Região entre 50 e 890 cm^{-1} . Em a) *L. infantum* e b) *L. major*.

Região II – 890-1190 cm^{-1}

Nessa região estão presentes modos vibracionais do anel da pentose e do grupamento fosfato, presentes na estrutura dos DNAs, esquematizados na figura 23.

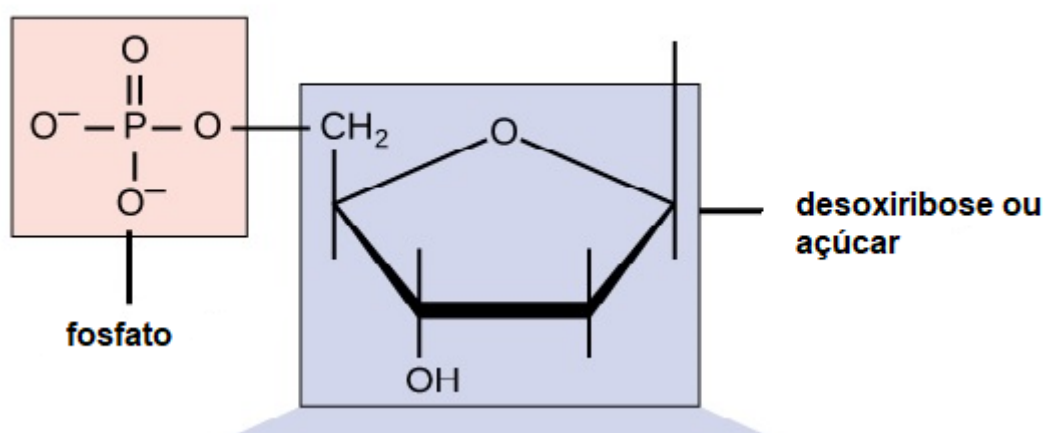


Figura 23. Partes do DNA com principais modos vibracionais na região 890 – 1190 cm^{-1} . Adaptado de

http://cnx.org/resources/31519303252327f3ea58c6a45a1caf4abc5a783a/Figure_03_05_01.jpg

Novamente, foram necessárias pelo menos 07 Lorentzianas para o ajuste dessa região. Podemos observar nos espectros da Figura 24 um modo vibracional intenso, correspondente ao estiramento do ânion PO_2^- , em torno de 1080 cm^{-1} .

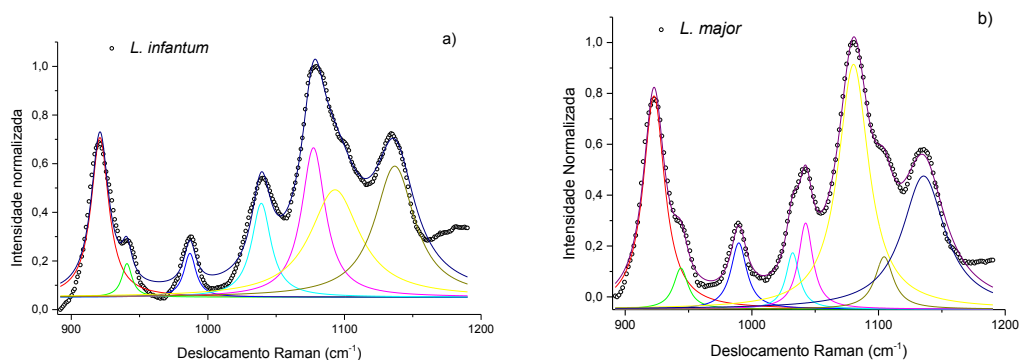


Figura 24. Ajustes com Lorentzianas para a Região entre 890 e 1190 cm^{-1} . Em a) *L. infantum* e b) *L. major*.

Região III – $1190\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$

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

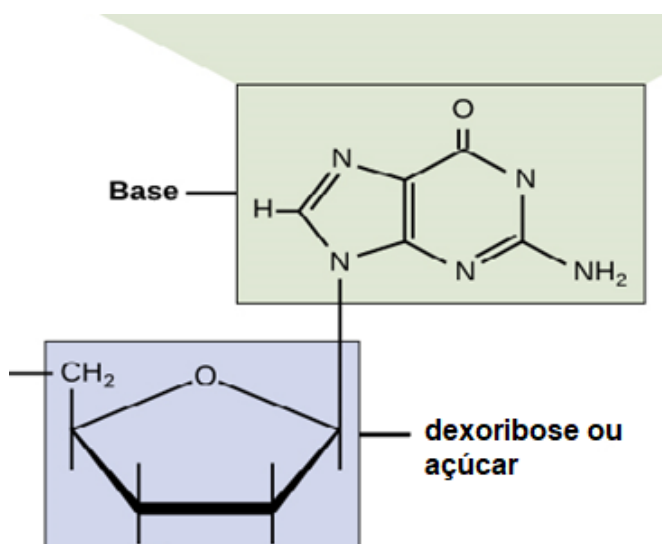


Figura 25. Partes do DNA com principais modos vibracionais na região $1190\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$.

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 necessários, novamente, pelo menos 07 Lorentzianas para o ajuste dessa região.

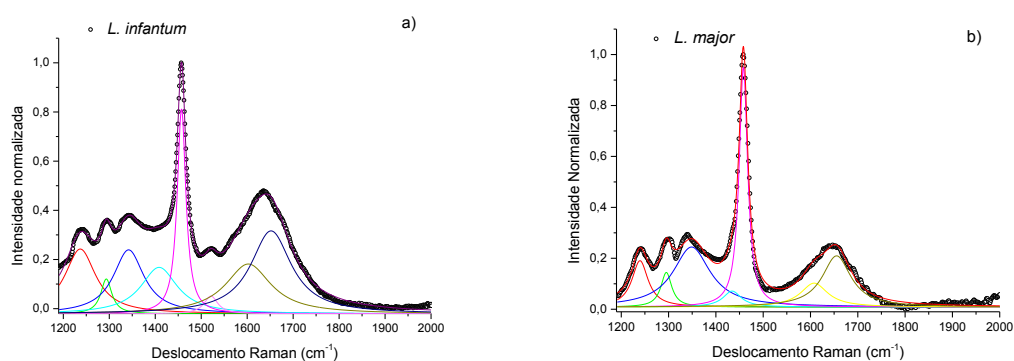


Figure 26. Ajustes com Lorentzianas para a Região entre 1190 e 1890 cm^{-1} . Em a) *L. infantum* e b) *L. major*.

A Tabela 7 apresenta o deslocamento Raman para os parasitos *L. infantum* e *L. major*, e uma tentativa de atribuição dos modos vibracionais, de acordo com a Literatura.

Tabela 7. Deslocamentos Raman para os parasitos *L. infantum* e *L. major* e a tentativa de atribuição dos modos de acordo com a literatura.

Frequência ν (cm^{-1})		Atribuições	Referências
<i>L. infantum</i>	<i>L. major</i>		
89	99	Cisalhamento de anel	[47]
152	158	Torção do grupo COOH, guanina	[47, 52]
197	201	Torção das ligações C-N, citosina	[47, 52]

382	383	Guanina, torção NH ₂ da guanina	[47, 49]
---	508	Torção do grupo COH	[47]
518	524	Adenina, Citosina e Guanina, deformação dos grupamentos CCN/CCC/OCC	[14, 47, 49, 52]
798	801	Estiramento do grupo OPO do grupo desoxirribose fosfato, citosina, timina e guanina, estiramento das ligações CN, interações iônicas do grupo fosfato e geometria da estrutura do DNA, DNA hélice esquerda (forma Z)	[14, 47-49, 52]
835	836	Estiramento do grupo OPO do esqueleto desoxirribose fosfato, modos de deformação e abanamento do grupo NH ₂ , guanina, deformação de grupos amina, DNA hélice esquerda ((forma Z))	[14, 48-49, 52]
920	922	Vibração do esqueleto desoxirribose fosfato, adenina, estiramento das ligações CC, DNA hélice esquerda (forma Z)	[47, 49-50, 52]
940	943	Modos angulares no plano das ligações CH, adenina, estiramento das ligações CN, citosina	[14, 47, 49]
986	989	Timina, citosina	[14]
1039	1041	Vibração do esqueleto desoxirribose fosfato, citosina e guanina, deformação e abanamento do grupo HNH mais modo angular de CH ₂ , modos esqueléticos, estiramento simétrico do ânion PO_2^-	[14, 47-48, 50, 52]
---	1080	Vibração do fosfato associado ao grupo fosfodiéster	[48, 50]

1093	1104	Estiramento simétrico do ânion PO_2^- do grupo desoxirribose fosfato, guanina, deformação do grupo HOC mais estiramento das ligações CN+CC, estiramento simétrico P-O-C	[14, 47-48, 50, 52]
1136	1135	Estiramento de ligações CN, citosina, estiramento simétrico da ligação CN mais deformação e torção do grupo NH_2	[47, 49]
1236	1239	Timina, citosina, guanina e adenina, deformação do grupo HCH e COH, amida III, estiramento assimétrico do ânion PO_2^-	[47-49, 52]
1293	1295	Citosina, adenina e guanina, deformação N-H citosina	[48-49, 50, 52]
1342	1349	Adenina, citosina, deformação do grupo HCH e COH, guanina,	[14, 47-48, 52]
1408	---	Adenina, timina, guanina, deformação do grupo HNH, deformação assimétrica do grupo metil	[14, 47, 50]
---	1434	Adenina, guanina, timina, citosina, deformação do grupo HNH, modo tipo tesoura do grupo CH_2	[14, 47-49]
1457	1458	Deformação do grupo CH_2 do esqueleto desoxirribose fosfato, Adenina, guanina, deformação do grupo HCH, desoxirribose e modos de DNA, vibração do grupo metil presente timina e grupos amida	[47-49, 52]
1521	---	Adenina, citosina, guanina, vibração – $C=C$ -, estiramento de $C=N$ e $C=C$	[14, 48-49, 50, 52]
1602	1607	Citosina, timina e guanina, estiramento de $C=C$, deformação do grupo HNH e estiramento de $C=O$, amida I, vibração da	[47-49, 50, 52]

		ligação C=N da citosina e N-H da adenina, C=N e NH ₂ da adenina	
1651	1655	Estiramento da ligação C=O da citosina e vibração de moléculas H ₂ O, timina e guanina, estiramento do grupo carbonila, adenina e amida I	[48-49, 50, 52]

A caracterização do DNA das espécies *L. infantum* e *L. major* também foi feita com base nas análises das 4 bases nitrogenadas, que compõem os ácidos nucleicos, estudadas anteriormente. Na fig. 27 a partir da comparação dos espectros do DNA dos parasitos *L. infantum* e *L. major* foram identificadas as bandas que correspondem seguintes bases: Adenina, Citosina, Guanina e Timina.

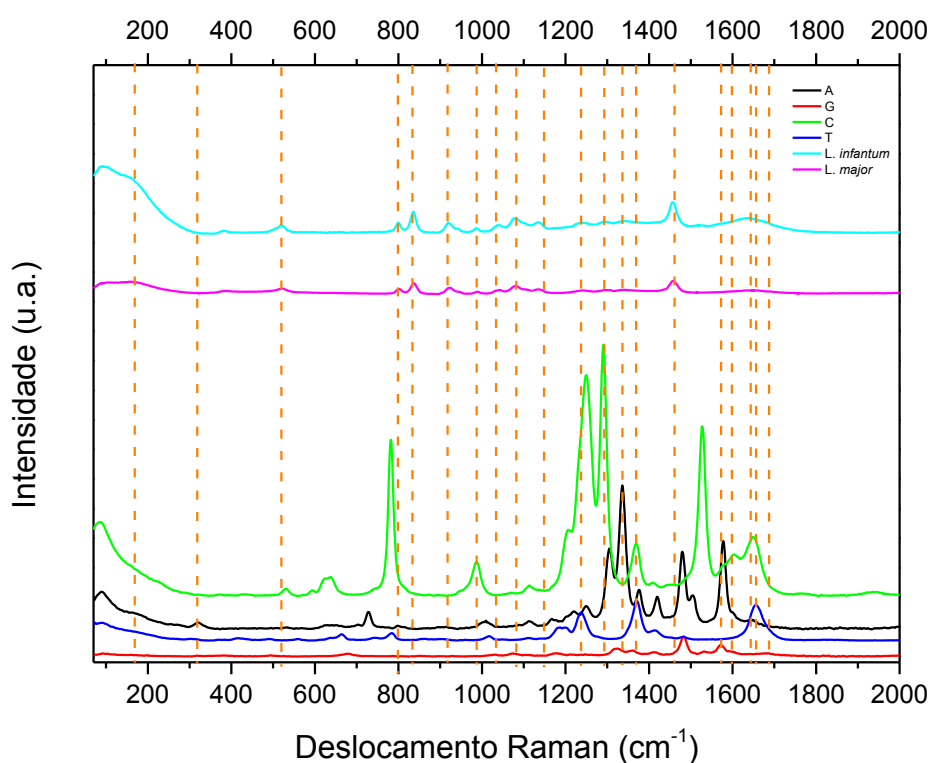


Figura 27. Comparação dos espectros Raman do DNA dos parasitos *L. infantum* (linha azul clara) e *L. major* (linha rosa) com os espectros das bases nitrogenadas G (linha vermelha), T (linha azul escura), A (linha preta) e C (linha verde).

Análises das amostras após irradiação gama.

A Figura 29 mostra uma comparação entre as quatro doses de radiação gama diferentes para cada base de DNA separada. Em todas as bases pode se notar que que ao aumentar a dose parece haver também um aumento no dano às bases. Fica mais clara essa observação para a base A, que com a dose de 1.8 Gy ainda apresenta algumas bandas na região de 1200 a 1800 cm^{-1} , embora com menor intensidade; e nas doses maiores esses picos também desaparecem ficando apenas uma banda larga em 1640 cm^{-1} . Essa banda está associada às ligações OH. Isso é razoável pois a quantidade de dano em moléculas de DNA aumenta linearmente com a dose de radiação, começando em alguns mGy [53-54]. Já o desaparecimento completo das bandas nas doses de 5 e 15 Gy (com exceção da banda em 1640 cm^{-1}) pode estar associado à alta taxa de dose, uma vez que parece haver relação de aumento do dano ao DNA com o aumento da taxa dose[55].

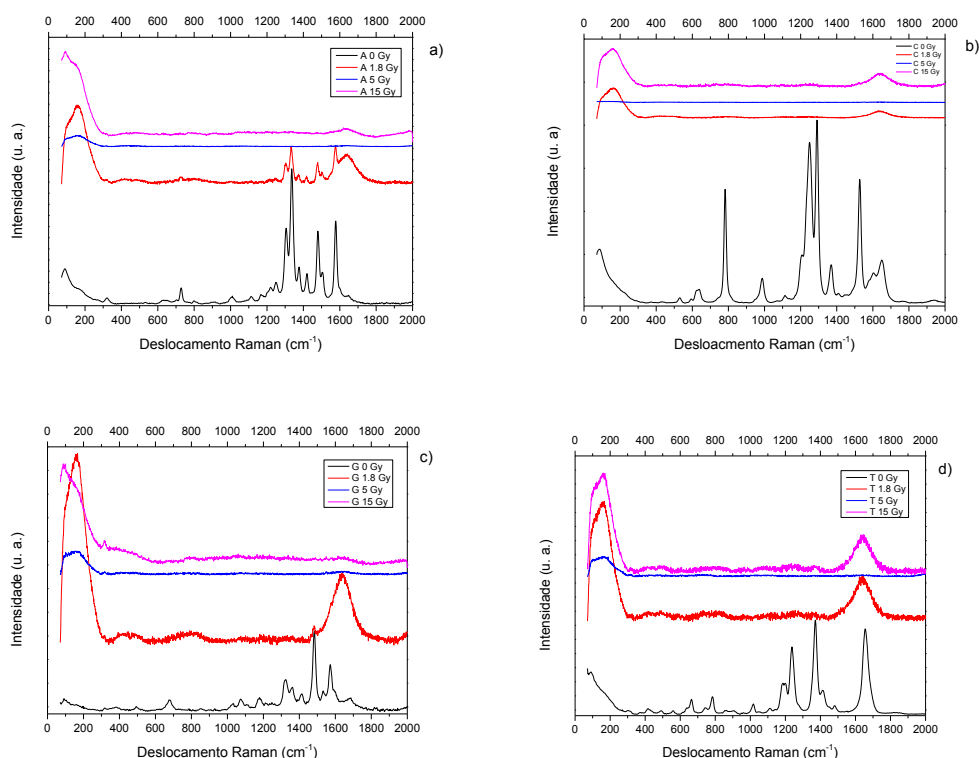


Figure 28. Comparação entre quatro doses diferentes dos espectros das bases de DNA separadas: linha preta – 0 Gy; linha vermelha – 1.8 Gy; linha azul – 5 Gy e linha rosa – 15 Gy. Em a) adenina, b) citosina, c) guanina e d) timina.

A figura 29 traz uma comparação entre duas doses do DNA irradiado com radiação gama dos parasitos *L. infantum* e *L. major*.

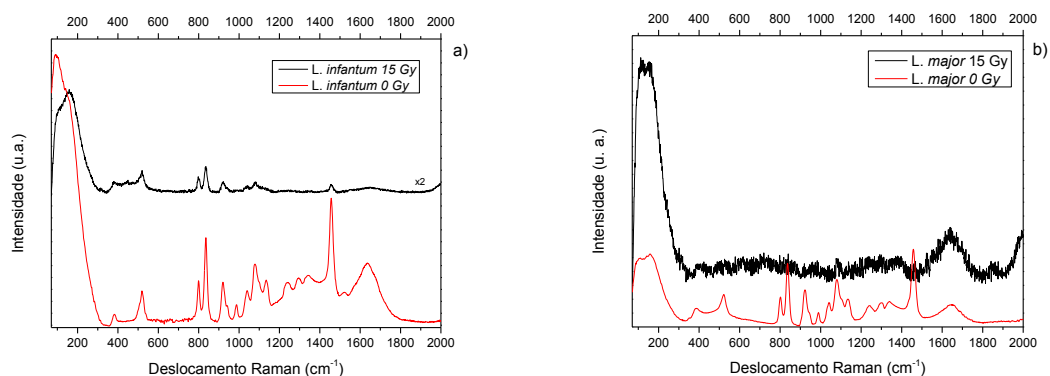


Figura 29. Irradiação com radiação gama do DNA dos parasitos *L. infantum* (em a)) e *L. major* (em b)). Linha vermelha 0 Gy e linha preta 15 Gy.

Nos dois parasitos é possível ver que essa dose foi suficiente para eliminar quase todas as bandas presentes no espectro de dose 0 Gy.

Para o parasito *L. infantum*, após a irradiação permaneceram apenas as bandas que estão descritas na Tabela 8, predominantemente, abaixo de 970 cm^{-1} . A banda em torno de 986 cm^{-1} , atribuída as bases T e C, desaparece completamente. Podemos associar esse desaparecimento às quebras de fita simples e dupla.

Tabela 8. Deslocamento Raman para o parasito *L. infantum* após irradiação com radiação gama.

Frequência $\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Atribuição	Referência
78	Guanina, torção NH_2 da guanina	[47, 49]
518	Adenina, Citosina e Guanina, deformação dos grupamentos CCN/CCC/OCC	[14, 47, 49, 52]
798	Estiramento do grupo OPO do grupo desoxirribose fosfato, citosina, timina e guanina, estiramento das ligações CN, interações iônicas do grupo fosfato e geometria da estrutura do DNA, DNA hélice esquerda (forma Z)	[14, 47-49, 52]

835	Estiramento do grupo OPO do esqueleto desoxirribose fosfato, modos de deformação e abanamento do grupo NH ₂ , guanina, deformação de grupos amina, DNA hélice esquerda ((forma Z))	[14, 48-49, 52]
920	Vibração do esqueleto desoxirribose fosfato, adenina, estiramento das ligações CC, DNA hélice esquerda (forma Z)	[47, 49-50, 52]
940	Modos angulares no plano das ligações CH, adenina, estiramento das ligações CN, citosina	[14, 47, 49]
1040	Vibração do esqueleto desoxirribose fosfato, citosina e guanina, deformação e abanamento do grupo HNH mais modo angular de CH ₂ , modos esqueléticos, estiramento simétrico do ânion PO_2^-	[14, 47-48, 50, 52]
1457	Deformação do grupo CH ₂ do esqueleto desoxirribose fosfato, Adenina, guanina, deformação do grupo HCH, desoxirribose e modos de DNA, vibração do grupo metil presente timina e grupos amida	[47-50, 52]
1651	Estiramento da ligação C=O da citosina e vibração de moléculas H ₂ O, timina e guanina, estiramento do grupo carbonila, adenina e amida I	[48-50, 52]

Por outro lado, somente uma banda larga com centro em 1660 cm⁻¹ que está relacionada ao estiramento da ligação C=O da citosina e vibração de moléculas H₂O, timina e guanina, estiramento do grupo carbonila, adenina e amida I, permaneceu no espectro do parasito *L. major*. Além dessas alterações, também foi observado nos espectros do *L. infantum* uma diminuição na intensidade dos picos. Sugerindo, assim, quebras das ligações e grupos químicos que correspondem a essas bandas. Particularmente na região espectral entre ~900-1150 cm⁻¹, que corresponde aos modos vibracionais associados aos açúcares e o grupo fosfato, essa diminuição na

intensidade indica rompimento dessas moléculas, o que pode ser associado às quebras de fitas simples e dupla do DNA [58].

A radiação gama interage com as moléculas de DNA de forma indireta, isto é, primeiro são gerados radicais livres através da radiólise da água [56] e então esses radicais danificam a estrutura molecular do material genético [58-59]. As alterações observadas sugerem a ação massiva desses radicais. A Figura 30 mostra como é a ação do radical livre hidroxila na estrutura do DNA. O radical $OH \bullet$ reage com o DNA em 1 e forma uma nova configuração em 2. Talvez essa mudança na configuração dos anéis de açúcares e bases sejam um dos fatores para as alterações na intensidade das bandas[60], além de sugerirem quebras de fitas duplas.

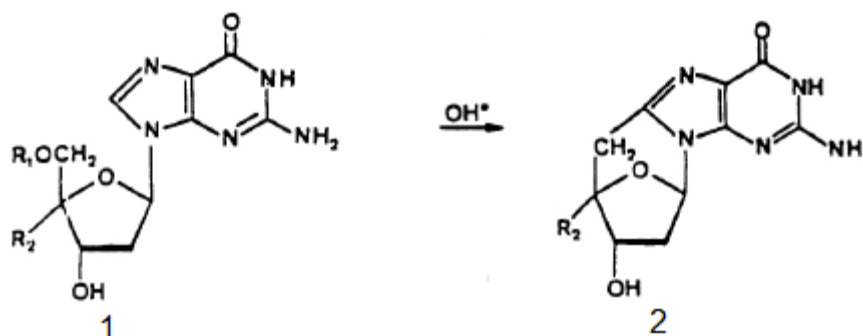


Figura 30. Interação do radical livre $OH \bullet$ na estrutura do DNA. Adaptado da referência [58].

Devido à liberação de elétrons da ionização das moléculas de DNA pela radiação gama, uma série de reações distintas da apresentada na fig. 31 ainda podem ocorrer[61]. A Figura 31 sumariza algumas das reações nucleofílicas na base guanina, que podem ocorrer devido à irradiação. Um elétron pode interagir com a base em 1 e resultar em 3 alterações diversas: 6 com a adição do grupamento NHR ; 4 com a adição de uma ligação $C=O$ e; 5 com adição de uma ligação $C=O$ e quebra de $C-N$.

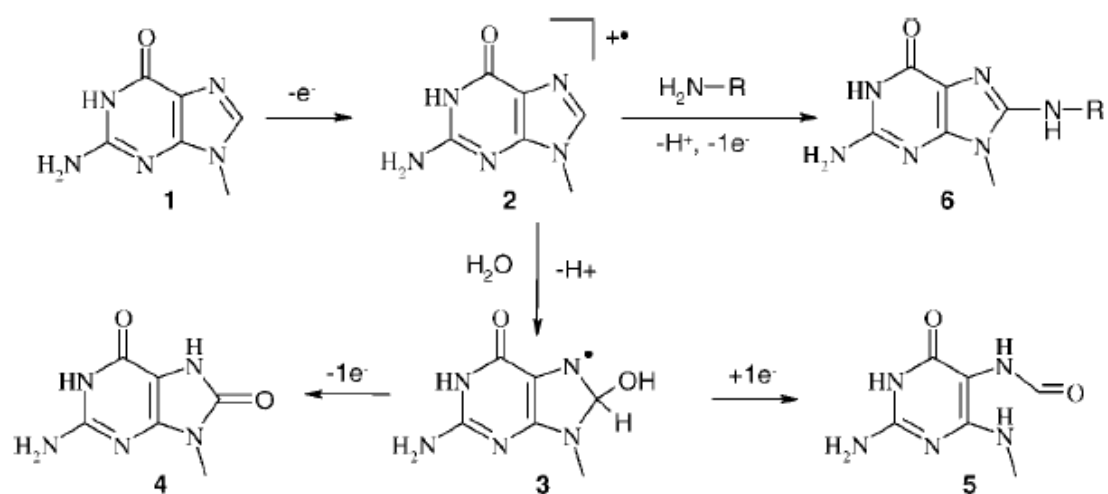


Figura 31. Tipos de reações que podem ocorrer na base guanina devido à ionização do DNA (ou solvente). Fonte: referência [61].

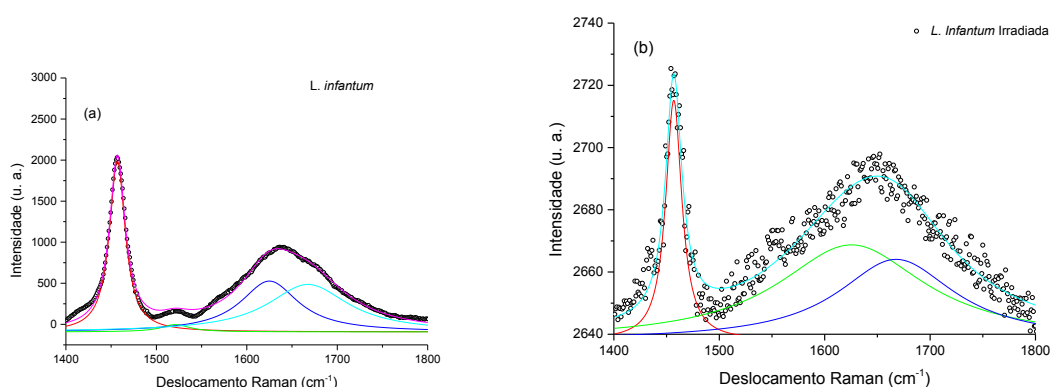
5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho foram apresentados os dados e análises à cerca da caracterização por espectroscopia Raman de bases de DNA separadas não irradiadas e irradiadas com radiação gama, bem como do DNA dos parasitos *L. infantum* e *L. major*. As bases separadas foram caracterizadas em primeiro lugar, e logo em seguida, o DNA dos parasitos. Seguindo essa mesma sequência para as amostras irradiadas. A posição de cada banda do espectro foi definida a partir de um ajuste com funções lorentzianas.

A maioria das bandas presentes nos espectros dessas amostras puderam ser atribuídas de acordo com a literatura científica às ligações e grupos químicos que compõem os ácidos nucleicos.

De acordo com nossos resultados foi possível associar as alterações nos espectros das amostras irradiadas às doses de radiação aplicadas. Além disso foi possível associar quebras de fita única associada à diminuição da intensidade das bandas na região dos açúcares e fosfato; e quebras de fita dupla associada ao desaparecimento de bandas que correspondem às bases nitrogenadas, por exemplo a banda em 987 cm^{-1} . Contudo não foi possível constatar a interação da radiação quanto às quebras das ligações de hidrogênio sem a perda da base, quebras das ligações de hidrogênio com a perda da base, visto que nas caracterizações não associamos nenhuma banda às ligações de pontes de hidrogênio (pareamento das bases).

Comparando a região de ligações duplas, dos espectros Raman dos parasitos, antes e depois da irradiação, podemos corroborar essa nossa conclusão; como podemos observar na figura 32 abaixo.



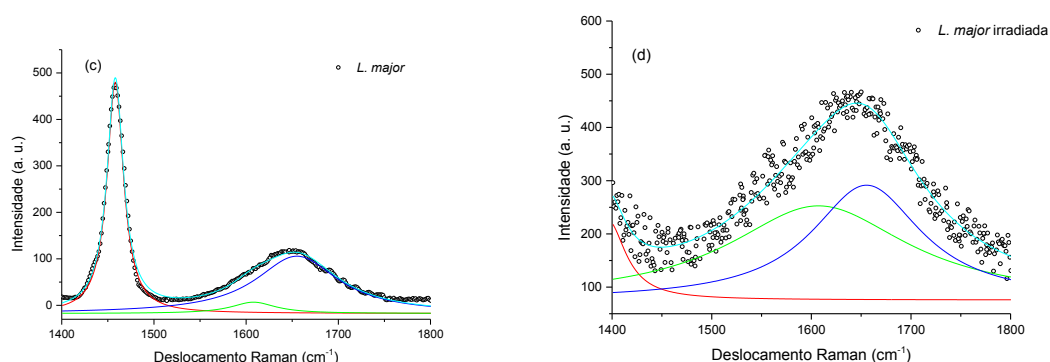


Figura 32. *L. infantum* e *L. major* não irradiada (a) e (c) e irradiada (b) e (d), respectivamente, na região de 1400 a 1800 cm^{-1} .

A figura 32 (d) para a *L. major* irradiada, mostra que este parasito sofreu uma maior alteração com a radiação gamma, do que o parasito *L. infantum*.

Parece que os pares de bases T e C da *L. infantum* são mais sensíveis à irradiação gama. Isso corroborou o fato de que as bases pirimidinas irradiadas em separado se mostraram também mais sensíveis a este tipo de radiação.

Perspectivas

Irradiar amostras do parasito *L. infantum* em meio de cultura com variação não só da dose recebida, mas também da distância e taxa de radiação e acompanhar seu desenvolvimento através da Espectroscopia Raman a fim de se estudar aberrações cromossômicas. Variando esses parâmetros estaremos aumentando ou diminuindo a dose recebida pela amostra. Isso nos possibilitará inferir sobre os reais danos da radiação ionizantes em seres vivos.

REFERÊNCIAS

- [1] FEINE, Ilan; GAFNY, Ron; PINKAS, Iddo. Combination of prostate-specific antigen detection and micro-Raman spectroscopy for confirmatory semen detection. **Forensic science international**, v. 270, p. 241-247, 2017.
- [2] LARKIN, Peter. **Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation**. Elsevier, 2011.
- [3] VIRKLER, Kelly; LEDNEV, Igor 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.
- [4] ZHU, Guangyong 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.
- [5] DE GELDER, Joke et al. Reference database of Raman spectra of biological molecules. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 38, n. 9, p. 1133-1147, 2007.
- [6] KOLESOV, Boris A. Raman spectra of crystalline secondary amides. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 179, p. 216-220, 2017.
- [7] NAWROCKA, Agnieszka 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.
- [8] MANDRILE, Luisa et al. Species-specific detection of processed animal proteins in feed by Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 229, p. 268-275, 2017.
- [9] MARINI, Monica et al. Raman on suspended DNA: Novel super-hydrophobic approach for structural studies. **Microelectronic Engineering**, v. 175, p. 38-42, 2017.
- [10] BARHOUMI, Aoune et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 16, p. 5523-5529, 2008.
- [11] SÁNCHEZ-CORTÉS, Santiago et al. Specific interactions of antiretrovirally 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.
- [12] FLEISCHMANN, Martin; HENDRA, Patrick J.; MCQUILLAN, A. James. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163-166, 1974.
- [13] PUPPELS, GJea 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, Cornelis et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA bases. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 17, n. 3, p. 289-298, 1986.

- [15] LEE, Chongsoo; BAIN, Colin D. Raman spectra of planar supported lipid bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1711, n. 1, p. 59-71, 2005.
- [16] CAMERLINGO, Carlo et al. Micro-Raman spectroscopy and univariate analysis for monitoring disease follow-up. **Sensors**, v. 11, n. 9, p. 8309-8322, 2011.
- [17] BAILEY, Dale L. et al. **Nuclear medicine physics: a handbook for teachers and students**. Vienna: International Atomic Energy Agency (IAEA), 2014.
- [18] CAO, YunWei Charles; JIN, Rongchao; MIRKIN, Chad A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. **Science**, v. 297, n. 5586, p. 1536-1540, 2002.
- [19] HALL, Eric J.; GIACCIA, Amato J. **Radiobiology for the Radiologist**. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [20] YANG, Nianjun; JIANG, Xin. Nanocarbons for DNA sequencing: A review. **Carbon**, v. 115, p. 293-311, 2017.
- [21] GOUD, E. Veerashekhar et al. Synthesis, structure and DNA interaction studies of bisphosphoramides: Theoretical and experimental insights. **Inorganica Chimica Acta**, v. 461, p. 84-91, 2017.
- [22] AHMAD, Muneer; JUNG, Low Tan; BHUIYAN, Al-Amin. 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.
- [23] SAHA, Gopal B. **Physics and radiobiology of nuclear medicine**. Springer Science & Business Media, 2012.
- [24] SANTOS, R. B. L. **Introdução à Espectroscopia Vibracional Raman**. 2011. 201 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Física da UFP. Universidade Federal do Pará, Pará.
- [25] FERRARO, John R. **Introductory raman spectroscopy**. Academic press, 2003.
- [26] LLEWELLYN, Ralph A.; TIPLER, Paul Allen. Física Moderna. 2014.
- [27] SALA, Oswaldo. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. Unesp, 2008.
- [28] RAMAN, C. V. Relation of Tyndall effect to osmotic pressure in colloidal solutions. 1927.
- [29] DE OLIVEIRA, Gelson Manzoni. **Simetria de Moléculas e Cristais: Fundamentos da espectroscopia vibracional**. Bookman Editora, 2009.
- [30] BATES, Paul A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

- [31] ALEMAN, Cesar. Finestructure of cultured *Leishmania brasiliensis*. **Experimental parasitology**, v. 24, n. 2, p. 259-264, 1969.
- [32] CHAPPUIS, François et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.
- [33] LACOMBLE, Sylvain et al. Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. **Journal of cell science**, v. 122, n. 8, p. 1081-1090, 2009.
- [34] DEAN, Samuel et al. A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. **Open biology**, v. 5, n. 1, p. 140197, 2015.
- [35] BERRUETA, T. U. **Leishmaniosis o Leishmaniasis**. Disponível em: < <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html> >. Acesso em 4 de outubro de 2017.
- [36] WHO. **Leishmaniasis in the WHO european reagon**. Disponível em: < http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0007/246166/Fact-sheet-Leishmaniasis-Eng.pdf > Acesso em: 4 de outubro de 2017.
- [37] WERNECK, Guilherme Loureiro. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de saude publica**, v. 48, n. 5, p. 851-856, 2014.
- [38] MAIA-ELKHOURY, Ana Nilce Silveira et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.
- [39] ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- [40] WHO 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. In WHO Technical Report Series, Organization, W.H., ed. (Genebra, World Health Organization), p. 201.
- [41] JORGENSEN, JAMES H. et al. **Manual of Clinical Micribiology**. ASM press, 11th ed. v 1.
- [42] KRUPOVIC, Mart; FORTERRE, Patrick. Single-stranded DNA viruses employ a variety of mechanisms for integration into host genomes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1341, n. 1, p. 41-53, 2015.
- [43] OKUNO, Emico; YOSHIMURA, Elisabeth Mateus. **Física das radiações**. Oficina de Textos, 2010.
- [44] PODGORSK. E B. **Radiation Physics for Medical Physics**. Springer, 2016. 3th ed.

[45] NERISSIAN, D. Y. **Princípios Físicos em Radiologia**. Disponível em: < http://rle.dainf.ct.utfpr.edu.br/hipermidia/images/documentos/Principios_fisicos_em_radiologia.pdf >. Acesso em 25 de outubro de 2017.

[46] NucleoSpin® Tissue – Genomic DNA from Tissue, Cap.5: Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells.

[47] BRAUER, Brina 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.

[48] MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; UR REHMAN, Dr Ihtesham. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 134-179, 2008.

[49] FREIRE, Paulo TC et al. Raman Spectroscopy of Amino Acid Crystals. In: **Raman Spectroscopy and Applications**. InTech, 2017.

[50] MOVASAGHI, Zanyar; REHMAN, Shazza; REHMAN, Ihtesham U. Raman spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, n. 5, p. 493-541, 2007.

[51] LODISH, Harvey et al. **Molecular Cell Biology**. W. H. Freeman (2008).

[52] PRESCOTT, B.; STEINMETZ, W.; THOMAS, G. J. Characterization of DNA structures by laser Raman spectroscopy. **Biopolymers**, v. 23, n. 2, p. 235-256, 1984.

[53] LOMAX, M. E.; FOLKES, L. K.; O'NEILL, P. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. **Clinical oncology**, v. 25, n. 10, p. 578-585, 2013.

[54] SUTHERLAND, Betsy M. et al. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 1, p. 103-108, 2000.

[55] MIN, Jiho; LEE, Chang Woo; GU, Man Bock. Gamma-radiation dose-rate effects on DNA damage and toxicity in bacterial cells. **Radiation and environmental biophysics**, v. 42, n. 3, p. 189-192, 2003.

[56] DESOUKY, Omar; DING, Nan; ZHOU, Guangming. Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 2, p. 247-254, 2015.

[58] MCGEEHAN, John E. et al. X-ray radiation-induced damage in DNA monitored by online Raman. **Journal of synchrotron radiation**, v. 14, n. 1, p. 99-108, 2007.

[59] BERGER, M.; CADET, J. Radiation chemistry of DNA components. Formation of the 8, 5'-cyclo-2', 5'-dideoxyguanosine by gamma irradiation of deaerated aqueous solutions of 2'-deoxyguanosine and its 5'-monophosphate ester. **Chemistry Letters**, v. 12, n. 4, p. 435-438, 1983.

[60] DOVBESHKO, Galina I. et al. FTIR spectroscopy studies of nucleic acid damage. **Talanta**, v. 53, n. 1, p. 233-246, 2000.

[61] CADET, Jean; DOUKI, Thierry; RAVANAT, Jean-Luc. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. **Accounts of chemical research**, v. 41, n. 8, p. 1075-1083, 2008.

APÊNDICE I – Trabalhos realizados durante a pesquisa que culminou no TCC.

V Encontro Brasileiro de Espectroscopia Raman em Campos do Jordão SP - Brasil.
Período: 03 a 06/12/2017.

Impressões digitais micro-Raman do DNA de diferentes espécies do gênero *Leishmania*.

Diego Mendes dos Santos^{1*}, Adriano Queiroz¹, Renata Cristina de Paula^{1,2}, Fernando Costa Basílio¹, Karen Ferraz Faria², Alexandre Marletta¹

Sydnei Magno da Silva² e Raigna A. Silva^{1,3}

1 – Instituto de Física - Universidade Federal de Uberlândia

2 - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade Federal de Uberlândia

3 – Departamento de Física - Universidade Federal de Minas Gerais.

[*diegostd@hotmail.com](mailto:diegostd@hotmail.com).

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

Introdução

Nesse trabalho apresentamos os primeiros resultados experimentais de espalhamento Raman para seis espécies do gênero *Leishmania*. No contexto desse estudo, depositamos filmes finos de Au em um substrato de vidro, a fim de obter um sinal Raman com uma boa relação sinal-ruído para amostras de DNA em solução aquosa. A extração de DNA das espécies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. major* foram realizadas com auxílio um kit comercial, de acordo com as recomendações do fabricante¹. Os espectros micro-Raman foram obtidos em quatro linhas de excitação de laser: 325 nm, 532 nm, 633 nm e 785 nm, e mantidas as mesmas condições de preparação e obtenção para todas as amostras. As nossas análises preliminares dos espectros obtidos, indicam ser possível separar as espécies de *Leishmania* em dois grupos: as espécies responsáveis pela manifestação clínica da leishmaniose cutânea e da leishmaniose visceral. Identificamos também o grupo de espécies responsável pela ocorrência das leishmanioses nas Américas e na Europa.

Resultados e Discussões

Para todas as espécies *Leishmania* os espectros micro-Raman mostraram bandas de vibração no intervalo de 50 a 4000 cm⁻¹ correspondendo aos grupos de frequências constituintes do DNA^{2,3,4,5} e da solução. As espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. major* são os agentes etiológicos da leishmaniose cutânea; ao passo que as espécies *L. donovani* e *L. infantum*, causam leishmaniose visceral. As espécies *L. donovani* e *L. major* ocorrem na Europa; por outro lado as espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. infantum* ocorrem nas Américas. Em todos os espectros observamos bandas abaixo de 2000 cm⁻¹ e acima de 2700 cm⁻¹ relativas ao DNA. Biomoléculas naturais não possuem nenhum sinal Raman na região de 1800 cm⁻¹ a 2800 cm⁻¹, chamados de “região-Raman silenciosa” da célula, de acordo com a Literatura⁶.

Conclusões e Perspectivas

Nossas primeiras análises indicaram a dominância dos modos da base guanina nos espectros das seis espécies. Além disso, como seus espectros são muito semelhantes as quatro linhas de laser deverão ser ajustadas e analisadas; por exemplo, analisando as intensidades relativas das bandas vibracionais relacionadas aos diversos grupamentos químicos presentes nas bases de DNA. Finalmente, será identificada a impressão digital de cada uma destas seis espécies de *Leishmania*.

Agradecimentos



Referências

- ¹ NucleoSpin® Tissue – Genomic DNA from Tissue, Cap.5: Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells
- ² FREIRE, Paulo TC et al. Raman Spectroscopy of Amino Acid Crystals. In: Raman Spectroscopy and Applications. InTech, 2017.
- ³ C. Otto, T. J. J. van den Tweel, F. F. M. de Mu1 and J. Greve, *JOURNAL OF RAMAN SPECTROSCOPY*, VOL. 17, 289-298 (1986)
- ⁴ OLIVEIRA, Patrícia Karen et al. Análise da composição bioquímica da pele por espectroscopia Raman. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 28, n. 3, p. 278-87, 2012.
- ⁵ Brina Brauer, R. Benny Gerber, Martin Kabeláč, Pavel Hobza, Joost M. Bakker, Ali G. Abo Riziq and Mattanah S. de Vries; *J. Phys. Chem. A*, 2005, 109 (31), 6974-6984.
- ⁶ LI, Yuee et al. Raman tags: Novel optical probes for intracellular sensing and imaging. *Biotechnology advances*, v. 35, n. 2, p. 168-177, 2017.

X Sefis: 10ª Semana da Física em Uberlândia MG - Brasil. Período: 27 a 29/11/2017

Micro-Raman fingerprints for difference in DNA of
Leishmania species

Diego Mendes dos Santos¹, Adriano Queiroz¹, Renata Cristina de Paula²,
Fernando Costa Basílio¹, Karen Ferraz Faria², Alexandre Marletta¹, Sydnei
Magno da Silva², Raigna Augusta da Silva¹

¹Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia

²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia

This contribution reports on experimental work of Raman scattering from DNA of six *Leishmania* species. In the context of this study, we have deposited Au thin film onto glass substrate in order to obtain Raman signal with good signal-to-noise ratios for DNA samples in solution much better than that on others substrates. DNA sample of *L. donovani*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* and *L. major* were extracted from 10⁷ *Leishmania* promastigotes maintained in □-MEM culture medium using a commercial kit according to the manufacturer's recommendations. Backscattering micro-Raman spectra were recorded in four excitation lines at 325 nm, 532 nm, 633 nm and 785 nm. For all *Leishmania* species the micro-Raman spectra showed vibration bands in the range of 50 to 4000 cm⁻¹ corresponding to frequency groups of the DNA constituents. Ours first spectral analyses have indicated the dominance of the guanine basis modes in the spectra of six species. In addition, as their spectra are very similar to four laser lines we will carry out Lorentzians adjustment and so we will study the relative intensities of several chemical groups present in DNA bases. Finally, we intend to identify the fingerprint of each of these six *Leishmania* species.

Palavras-chave: DNA, Raman scattering, Leishmania species

Agradecimentos: Ao Profº. Dr. Noélio de O. Dantas por nos fornecer seu laboratório e aos órgãos de fomento: CNPq, FAPEMIG e CAPES.

Referências

- [1] NucleoSpin® Tissue – Genomic DNA from Tissue, Cap.5: Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells.
- [2] FREIRE, Paulo TC et al. Raman Spectroscopy of Amino Acid Crystals. In: Raman Spectroscopy and Applications. InTech, 2017.
- [3] C. Otto,T. J. J. van den Tweel, F. F. M. de Mu1 and J. Greve, JOURNAL OF RAMAN SPECTROSCOPY, VOL. 17, 289-298 (1986)
- [4] OLIVEIRA, Patrícia Karen et al. Análise da composição bioquímica da pele por espectroscopia Raman. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica, v. 28, n. 3, p. 278-87, 2012.
- [5] BrinaBrauer , R. Benny Gerber ,Martin Kabelá ,Pavel Hobza , Joost M. Bakker, Ali G. Abo Riziq andMattanjah S. de Vries; J. Phys. Chem. A, 2005, 109 (31), 6974-6984.

6º Encontro do INCT de Nanomateriais de Carbono em Curitiba PR – Brasil. Período: 27 a 29/11/2016.

RAMAN OPTICAL ACTIVITY APPLIED TO BIOLOGICAL SYSTEMS

SANTOS, Diego Mendes dos¹; QUEIROZ, Adriano Luiz de¹; BASÍLIO, Fernando Costa¹; MUNIZ, Marcella Cogo¹; DALKIRANIS, Gustavo Gonçalves¹; MARLETTA, Alexandre¹; ARMOND, Raigna Augusta da Silva Zadra¹; PAULA, Renata Cristina de²; SILVA, Sydnei Magno da²;

E-mail:diegostd@hotmail.com

¹*Institute of Physics from Federal University of Uberlândia - Brazil*

²*Institute of Biomedical Sciences from Federal University of Uberlândia - Brazil*

Raman Optical Activity (ROA) provides information about of chirality in molecules with high relevance for health area. In the present work, we implemented new technique to measure the ROA spectra of chiral molecules per Raman Spectroscopy by Ellipsometry (RaSE). ROA quantifies the small difference in the intensity of Raman scattering for chiral molecules in incidence of polarized circularly laser light and RaSE measures the Raman scattering by Stokes parameters, which describe the polarization state of light. This work aims study of *L. infantum* parasite the etiological agent of Visceral Leishmaniasis by RaSE technique. DNA sample of *L. infantum* was extracted of a crop from parasite in the promastigote phase in according to the manual procedure of extraction kit user NucleoSpin® Tissue – Genomic DNA from Tissue, Chapter.5: Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells. This procedure provided us a DNA concentration $S = 17,5\text{ng}/\mu\text{L}$ and $V = 50\mu\text{L}$. RaSE spectra were obtained as excitation light linear in polarization set up that can be decomposed in two circular polarization to obtain Stokes parameters that describes the signal ROA. Raman spectra showed vibration bands in the range of 400 to 1700 cm^{-1} corresponding to DNA constituents. Asymmetry factor (g) $\sim 0,15$. Raman spectra assigned vibration mode of DNA and indicated chirality preponderance. Preliminary measurements of Stokes polarization parameters to DNA samples indicated a chirality preponderance of LCP light over RCP light.

Acknowledgements

CNPq, FAPEMIG, CAPES.

Referencies

- [1] BARRON, L. D. **Molecular Light Scattering and Optical Activity**; Cambridge University Press, Ed.; 2nd ed.; New York, 2009; p.468.
- [2] OTTO, C. et al. **Surface-enhanced Raman spectroscopy of DNA bases**. Journal of Raman Spectroscopy, v. 17, n. 3, p. 289-298, 1986.
- [3] SMITH, B. C. **Infrared spectral interpretation: a systematic approach**. United States of America: CRC Press, 1999. p. 125-14.

XV Brazilian MRS meeting em Campinas SP - Brasil. Período: 25 a 29/09/2016.

RAMAN OPTICAL ACTIVITY APPLIED TO BIOLOGICAL SYSTEMS

Diego Mendes dos Santos¹, Marcella Cogo Muniz¹, Gustavo Gonçalves Dalkiranis¹, Fernando Costa Basílio¹, Adriano de Queiroz¹, Alexandre Marletta¹, Renata Cristina de Paula^{1,2}, Sydney Magno da Silva², Raigna Augusta da Silva Zadra Armond¹

¹*Institute of Physics from Federal University of Uberlândia - Brazil*

²*Institute of Biomedical Sciences from Federal University of Uberlândia - Brazil*

Non ionizing applications

Raman Optical Activity (ROA) provides information about of chirality in molecules with high relevance for health area. In the present work, we implemented a new technique to measure the ROA spectra of chiral molecules per Raman Spectroscopy by Ellipsometry (RaSE). ROA quantifies the small difference in the intensity of Raman scattering for chiral molecules in incidence of polarized circularly laser light and RaSE measures the Raman scattering by Stokes parameters, which describe the polarization state of light. The main purpose of this work is study of *L. infantum* parasite the etiological agent of Visceral Leishmaniasis by RaSE technique. DNA sample of *L. infantum* was extracted of a crop from parasite in the promastigote phase in according to the manual procedure of extraction kit user NucleoSpin® Tissue – Genomic DNA from Tissue, Chapter.5: Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells. This procedure provided us a DNA concentration $S = 17,5\text{ng}/\mu\text{L}$ and $V = 50\mu\text{L}$. RaSE spectra were obtained as excitation light linear in polarization set up that can be decomposed in two circular polarization to obtain Stokes parameters that describes the signal ROA. Raman spectra showed vibration bands in the range of 400 to 1700 cm^{-1} corresponding to DNA constituents. S3 Stokes parameter indicated a chirality preponderance of LCP light over RCP light. Raman spectra assigned vibration mode of DNA and indicated a chirality preponderance. We will study *L. infantum* by RaSE-ROA in order to obtain information on the structure that is lost with the use of other techniques.

Acknowledgement

CNPq, FAPEMIG, CAPES, LMNIS – UFU.

[2] Smith, B.C., *Infrared spectral interpretation: a systematic approach*. 1998: CRC press.

[2] Miranda, A.M., et al., *Line shape analysis of the Raman spectra from pure and mixed biofuels esters compounds*. Fuel, 2014. **115**: p. 118-125.

[3] Armond, R.A.d.S.Z., *Estudos de Materiais Eletrólitos Poliméricos por Espectroscopia Raman*, in *Instituto de Ciências Exatas*. 1995, Universidade Federal de Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. p. 26-27.

1th European Congress of Medical Physics em Atenas- GR. Período: 1 a 04/09/2016.

RAMAN OPTICAL ACTIVITY APPLIED TO BIOLOGICAL SYSTEMS

Diego Mendes dos Santos¹, Marcella Cogo Muniz¹, Gustavo Gonçalves Dalkiranis¹, Fernando Costa Basílio¹, Adriano de Queiroz¹, Alexandre Marletta¹, Renata Cristina de Paula^{1,2}, Sydnei Magno da Silva², Raigna Augusta da Silva Zadra Armond¹

¹*Institute of Physics from Federal University of Uberlândia - Brazil*

² *Institute of Biomedical Sciences from Federal University of Uberlândia - Brazil*

Non ionizing applications

Introduction

Raman Optical Activity (ROA) provides information about of chirality in molecules with high relevance for health area. In the present work, we implemented new technique to measure the ROA spectra of chiral molecules per Raman Spectroscopy by Ellipsometry (RaSE). ROA quantifies the small difference in the intensity of Raman scattering for chiral molecules in incidence of polarized circularly laser light and RaSE measures the Raman scattering by Stokes parameters, which describe the polarization state of light.

Purpose

Study of *L. infantum* parasite the etiological agent of Visceral Leishmaniasis by RaSE technique.

Materials and Methods

DNA sample of *L. infantum* was extracted of a crop from parasite in the promastigote phase in according to the manual procedure of extraction kit user NucleoSpin® Tissue – Genomic DNA from Tissue, Chapter.5: Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells. This procedure provided us a DNA concentration $S = 17,5\text{ng}/\mu\text{L}$ and $V = 50\mu\text{L}$. RaSE spectra were obtained as excitation light linear in polarization set up that can be decomposed in two circular polarization to obtain Stokes parameters that describes the signal ROA.

Results

Raman spectra showed vibration bands in the range of 400 to 1700 cm^{-1} corresponding to DNA constituents. S3 Stokes parameter indicated a chirality preponderance of LCP light over RCP light.

Conclusion

Raman spectra assigned vibration mode of DNA and indicated a chirality preponderance. We will study *L. infantum* by RaSE-ROA in order to obtain information on the structure that is lost with the use of other techniques.

Disclose: E-Poster.

DOS SANTOS, Diego Mendes et al. Raman optical activity applied to biological systems. **Physica Medica: European Journal of Medical Physics**, v. 32, p. 329, 2016.