

Universidade de Brasília
Instituto de Física

**Estudo pela técnica SERS do arranjo de
moléculas bioativas adsorvidas em nanopartículas
de óxido de ferro e de suas aplicações em sistemas
biológicos**

Camila Messias Barbosa Santos

Orientador: Prof. Dr. Sebastião William da Silva

Brasília - DF

Março de 2012

Universidade de Brasília
Instituto de Física

**Estudo pela técnica SERS do arranjo de
moléculas bioativas adsorvidas em nanopartículas
de óxido de ferro e de suas aplicações em sistemas
biológicos**

Camila Messias Barbosa Santos

Orientador: Prof. Dr. Sebastião William da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Física da Universidade de Brasília como parte
dos requisitos necessários para a obtenção do título
de Doutor em Física.

Brasília - DF

Março de 2012

“DON'T PANIC.”

*Douglas Adams em O Guia do Mochileiro das
Galáxias*

*Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Ubi-
rajara e Eluzane Messias, por serem minha ins-
piração diária, exemplos constante em minha vida.
Amo vocês.*

Agradeço de coração a todos que me ajudaram direta e indiretamente neste trabalho.

“Um homem sozinho é simplesmente um adorno vivo da solidão, mas aquele que coopera em benefício do próximo é credor do auxílio comum. Ajudando, seremos ajudados. Dando, receberemos: esta é a Lei Divina.”

Neio Lúcio por Francisco Cândido Xavier

Agradecimentos

Primeiramente, à minha enorme família, que sempre me apoiou e torceu por mim a cada conquista. Ter vocês ao meu lado fez e faz toda diferença na minha vida. Especialmente, a meus irmãos, Candice, Saulo e Samuel, meus melhores amigos, e a meus sobrinhos, Júlio e Miguel, meus amores. Agradeço particularmente à Candice, por ter me auxiliado no esclarecimento das dúvidas de biologia;

A Mateus, meu namorado, agradeço imensamente por ter sido minha família em Brasília, meu porto seguro. Obrigada pelo apoio, pela paciência, pelo carinho. Acredite, parte desta conquista é sua;

Ao professor Sebastião pelos anos de convívio, pela paciência, pela amizade. Muito obrigada pela dedicação e por ter apostado em mim. Tenho-o como exemplo de pessoa e pesquisador;

Ao professor Paulo César pelas orientações e discussões sobre este trabalho;

À Luciana Guilherme, minha amiga e colaboradora, por ceder as amostras de fluido magnético e pelas discussões acerca do trabalho;

À Débora Cintra, minha companheira de viagem, grande amiga e colaboradora, por ceder as amostras do cérebro e sangue de camundongos e por compartilhar idéias para futuros trabalhos;

À Camila Arruda e Mariana Campos por cederem as amostras dos pulmões de camundongos e do fluido conjugado com proteína, respectivamente;

A Marcelo pela solicitude, pelas orientações no laboratório de química e pela demonstração de carinho e afeto;

A Edilson, da oficina mecânica do Instituto de Física da UnB, por sempre me receber com alegria e fazer com muito zelo os aparatos experimentais que precisei durante os anos de doutorado;

A seu Wilson, do Laboratório de Criogenia do Instituto de Física da UnB, por me atender prontamente todas as vezes que precisei de nitrogênio líquido;

A Ingrid, Felipe e Lauro, do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da UnB, pela solicitude;

Aos professores Kalil, Garg, Aderbal, Aparecida, Paulo Souza, Júnio, Coaquira pelo feliz convívio no laboratório do Cnano, pela solicitude e pelos esclarecimentos;

Ao meu amigo Fábio Nakagomi por sempre me ajudar e me ouvir. Ter sua amizade fez com que meus 6 anos de Brasília fossem muito mais divertidos. Obrigada pela amizade, te adoro.

Aos meus amigos do SEAE - Sociedade Espírita de Assistência e Estudo, Dona Geni, Dona Beti, Dona Zenaide, Geice, Carla, Dona Alice, Odete, meus alunos fofos... Esse foi o maior presente que ganhei em Brasília, o convívio com vocês.

À minha tia, Márcia, e minhas primas, Luna e Fernanda, por terem me acolhido com muito afeto nos meus primeiros anos em Brasília. E à Socorro pelo carinho e amizade;

Às alunas de iniciação científica Rayssa Bruzaca, que trabalhou comigo e que hoje está alçando vôos na USP e Ísis Szlachetka, que vem trabalhando comigo a dois anos e que logo estará trilhando seu próprio caminho;

A Gustavo pelo carinho, pela alegria. A Rafael, grande amigo, pela elucidação das dúvidas na área de química;

À galera do intermódulos: Alexandre, Leandro, Fermin, Lizbet;

Aos meus amigos que convivem comigo desde o mestrado e que me receberam com muito carinho quando cheguei na UnB: Mirian, Brunno, Léo, Áderson, Ednardo, Pedro, Vivi, Evandro, Alessandra, Fábio, Fernando, Serginho, Letícia, Marcos;

Às meninas do Cnano pelo feliz convívio: Queila, Aline, Camila Letti, Camila D'Ávila, Lorena, Camile, Jéssica, Ana Paula, Maísa;

Aos servidores da UnB, Daniel, Tales e Sandra que sempre me atenderam com simpatia e disponibilidade;

Ao CnPq pelo auxílio material sem o qual este trabalho não seria realizado.

Resumo

Neste trabalho, dois substratos SERS ativos (coloide e filme de prata) foram desenvolvidos e usados no estudo da interface nanopartícula(NP)/surfactante de complexos magnéticos nanoestruturados visados para aplicações biotecnológicas. O potencial uso dos substratos na análise de sistemas *in vivo* foi também investigado. Embora, o filme de prata tenha intensificação SERS muito superior ao coloide de prata, foi encontrado que o segundo demonstra ser mais estável com o tempo quando comparado com o primeiro. O uso do coloide de prata no estudo do sistema FMBL-AmB (NP/Ácido Láurico(AL)/Anfotericina B(AmB)) revelou que somente a cadeia poliênica do anel macrolactone da AmB interage efetivamente com o AL, o que permitiu propor um arranjo esquemático para o ancoramento da AmB na NP pré-funcionalizada. O estudo do sistema NP/DMSA(ácido dimercaptosuccínico)/anti-CEA, usando filme de prata como substrato, mostrou que o anti-corpo anti-CEA está efetivamente ligado à superfície das NPs por meio da ligação entre o grupo amina da proteína e o grupo carboxil do DMSA. Além do mais, uma comparação entre as energias vibracionais associadas com o anti-CEA livre e conjugado mostrou que o processo de conjugação não leva à desnaturação da proteína ligada. Por fim, do estudo do tratamento de camundongo infectado com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (PCM) usando FMBL-AmB e AmB livre (tratamento convencional) mostrou que o uso do FMBL-AmB, mesmo com dosagem 40 % menor que a AmB livre, conduz a resultados semelhantes do tratamento convencional. Em complemento, o estudo da injeção do sistema NPs/albumina na corrente sanguínea do camundongo sugere que as NPs magnéticas atravessam a barreira encefálica.

Abstract

In this work, two SERS-active substrates (silver colloid and silver film) were developed and used to study the nanoparticle (NP)/surfactant interface in complex magnetic nanostructures aiming biotechnology applications. The potential use of the substrates in the in vivo study of systems was also investigated. Although the silver film has SERS enhancement much stronger than the colloid, it was found that the first prove to be more unstable over time when compared with the second. The use of silver colloid in the study of FMBL-AmB systems (NP/lauric acid(LA)/amphotericin B(AmB)) revealed that only the polyene chain of the macrolactone ring of surface-grafted AmB interacted effectively with LA, allowing the proposal of a schematic arrangement for AmB anchoring onto the pre-functionalized NP. The study of the NP/DMSA/anti-CEA system, using silver film as substrate, showed that the anti-CEA antibody is effectively bonded onto the NP surface via the amine group of the protein and the carboxyl group of DMSA. Furthermore, a comparison between the vibrational energies associated with free and conjugated anti-CEA showed that the conjugation process does not lead to denaturation of the bounded protein. Finally, the treatment of infected mice with the *Paracoccidioides brasiliensis* fungus using FMBL-AmB and AmB free (conventional treatment) showed that the use of FMBL-AmB, even at doses 40 % smaller than AmB free, leads to results similar to conventional treatment. In addition, study of the NPs/albumin system injection into the bloodstream of mice suggests that the magnetic NPs cross the blood brain barrier.

Sumário

1	Introdução	1
2	Espectroscopia Raman	6
2.1	Efeito Raman	6
2.1.1	Raman Convencional em Fluidos Magnéticos	14
2.2	SERS	17
2.2.1	Modelo Químico	19
2.2.2	Modelo Eletromagnético	22
2.2.3	Aplicações do Efeito SERS	26
3	Procedimentos Experimentais	29
3.1	Síntese de Fluidos Magnéticos	29
3.2	SERS	30
3.2.1	Sistema coloidal	30
3.2.2	Filme por eletrodeposição	31
3.3	Absorção UV-Vis	31
3.4	MET e MEV	31
4	Resultados e Discussões	33
4.1	Estudo da estabilidade SERS de substratos a base de prata utilizando a violeta de genciana como molécula teste.	34

4.1.1	Introdução	34
4.1.2	Metodologia	36
4.1.3	Resultados e discussão	36
4.1.4	Conclusões	51
4.2	Estudo SERRS do arranjo molecular da Anfotericina B adsorvida em Nanopartículas de óxido de ferro précoberdas com bicamada de ácido láurico [95].	52
4.2.1	Introdução	52
4.2.2	Metodologia	54
4.2.3	Resultados e discussão	56
4.2.4	Conclusões	70
4.3	Estudo SERS da conjugação de nanopartículas magnéticas com o anticorpo anti-CEA	71
4.3.1	Introdução	71
4.3.2	Metodologia	73
4.3.3	Resultados e discussão	75
4.3.4	Conclusão	92
4.4	Investigação da potencialidade da técnica SERS no estudo de sistemas <i>in vivo</i>	93
4.4.1	Uso da técnica SERS no estudo do Sistema de Entrega de Drogas FMBL-AmB no tratamento da Pbmicose em Camundongos	94
4.4.2	Estudo SERS da possibilidade de nanopartículas magnéticas atravessarem a barreira hemato-encefálica de camundongos . .	108

5 Conclusões Gerais

118

Lista de Tabelas

4.1	<i>Posição dos modos vibracionais obtidos a partir dos espectros Raman Convencional e SERS para a violeta de Genciana.</i>	45
4.2	<i>Posição dos modos vibracionais observados nos espectros Raman Resonante e SERS para AmB pó e em solução, FMBL e FMBL-Amb. . .</i>	64
4.3	<i>Posição dos modos vibracionais obtidos a partir dos espectro Raman convencional das amostras FM-DMSA e FM-antiCEA, para comparação também é mostrado os dados da referência [35].</i>	79
4.4	<i>Posição dos modos vibracionais do DMSA pó (Raman convencional), da solução de DMSA e da amostra FM-DMSA (SERS).</i>	81
4.5	<i>Posição dos modos vibracionais para o anti-CEA livre e para FM-antiCEA.</i>	88
4.6	<i>Dosagens e periodicidade dos tratamentos empregados nas amostras de pulmões sadio e infectados com Pbmicose.</i>	96
4.7	<i>Posições dos modos vibracionais observados, na região de 150 a 1800 cm^{-1}, para as amostras de Pulmões infectados e sadio.</i>	99

Lista de Figuras

2.1	<i>Diagrama esquemático do fóton espalhado após interagir com uma molécula.</i>	8
2.2	<i>Estrutura espinélio cúbica apresentada pelos óxidos de ferro.</i>	15
2.3	<i>Diagrama ilustrativo para o mecanismo de intensificação SERS pelo modelo químico, figura adaptada da referência [43].</i>	20
2.4	<i>Típico diagrama de nível de energia para uma molécula adsorvida sobre uma superfície metálica. Os orbitais moleculares ocupados e desocupados, HOMO (highest occupied molecular orbital) e LUMO (lowest unoccupied molecular orbital) respectivamente, são alargados devido à interação com o metal, cuja ocupação orbital é determinada pela energia de Fermi. As setas indicam a possível excitação de transferência de carga. Figura adaptada da referência [45].</i>	21
2.5	<i>Diagrama esquemático do mecanismo eletromagnético para uma esfera metálica [51].</i>	24
2.6	<i>(a) e (b) não é possível observar espectro do tiofenol quando as nanopartículas de prata estão isoladas, diferentemente quando há a formação de dímeros em (c), hot spot. Figura adaptada da referência [52].</i>	25

2.7	<i>(a, b) são mostrados os espectros SERS obtidos na região do tumor e na região anatômica do fígado após aplicação de nanopartículas biomarcadoras (targeted) e sem aplicação dos biomarcadores (nontargeted), respectivamente. (c) As fotografias mostram o feixe de laser com foco no local das medidas: tumor e fígado (liver). Figura adaptada da referência [60].</i>	27
4.1	<i>Estrutura molecular da violeta de genciana.</i>	35
4.2	<i>Absorção UV-Vis da violeta de genciana.</i>	37
4.3	<i>Absorção UV-Vis do coloide de prata com idades de 0, 15, 30 e 60 dias.</i>	38
4.4	<i>Micrografias das nanopartículas de prata com idades de 0 (a) e 60 (b) dias e seu respectivos histogramas (c) e (d)</i>	39
4.5	<i>Espectro Raman do coloide de prata.</i>	41
4.6	<i>Absorção UV-Vis do coloide de prata puro (a) após adição do NaCl, na proporção 1:1 (b) e após a adição de violeta genciana na proporção 1:1:1 (c).</i>	42
4.7	<i>Espectro Raman ressonante da violeta de genciana à 1ppm.</i>	43
4.8	<i>Espectro SERRS da violeta de genciana à 1ppm no coloide de prata (a) com e (b) sem NaCl.</i>	44
4.9	<i>Espectros SERRS da violeta de genciana em diferentes concentrações no coloide de prata com NaCl. No inset é mostrado o fator de intensificação SERS observado.</i>	47
4.10	<i>Imagem de filmes de prata obtido por MEV, para sínteses distintas (a) e (b).</i>	49
4.11	<i>Espectros SERRS da violeta de genciana em diferentes concentrações depositado sobre filme de prata. No inset é mostrado o fator de intensificação SERS observado.</i>	50

4.12	<i>Micrografias das amostras (a) e (b) e os histogramas (c) e (d) correspondentes à FMBL e FMBL-AmB, respectivamente.</i>	57
4.13	<i>(a) Espectro de Infravermelho para (i) AL puro, (ii) AmB em pó, (iii) nanopartículas de óxido de ferro, (iv) FMBL e (v) FMBL-AmB. (b) Aproximação da região 900-1800 cm⁻¹ dos espectros de infravermelho (ii), (iv) e (v)</i>	59
4.14	<i>(i) Espectro Raman convencional do AL puro e (ii) espectro SERS da amostra FMBL-AmB.</i>	61
4.15	<i>Espectros Raman Ressonante (i) para a AmB em pó, (ii) AmB diluída em DMSO/H₂O e espectros SERS (iii) AmB diluída em DMSO/H₂O e (iv) para a amostra FMBL-AmB</i>	65
4.16	<i>Espectro Raman Ressonante para FMBL-AmB</i>	66
4.17	<i>Espectro Raman na região de 850-1110 cm⁻¹ para a amostra (i)AmB(pó) e SERS para as amostras (ii) FMBL-AmB e (iii) FMLB. Na parte inferior verifica-se a subtração (ii)-(iii).</i>	69
4.18	<i>Representação esquemática para o ancoramento da Anfotericina nas nanopartículas recobertas com ácido láurico.</i>	70
4.19	<i>Diagrama esquemático para a conjugação do anticorpo na superfície das nanopartículas. Amostras (a) FM-DMSA e (b) FM-antiCEA . . .</i>	75
4.20	<i>Espectros Raman convencional das amostras de (a) anti-CEA e (b) DMSA-pó.</i>	77
4.21	<i>Espectros Raman convencional das amostras de Fluidos magnéticos (a) FM-DMSA e (b) FM-antiCEA.</i>	78
4.22	<i>Espectro SERS da solução de DMSA (a) e da amostra FM-DMSA (b).</i>	80
4.23	<i>Espectro SERS do anti-CEA em solução (a) e da amostra FM-antiCEA (b).</i>	85

4.24	(a) Representação da estrutura da imunoglobulina (IgG) (adaptado de [147]). (b) Estrutura secundária de uma proteína do tipo β -folha (adaptado de [148])	86
4.25	Espectro SERS na região de $1450 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ das amostras (a) antiCEA em solução e (b) FM-antiCEA.	91
4.26	Espectros SERS das amostras de pulmão sadio (PS) pulmão infectado com Pbmicose e tratadas com diferentes drogas. Tratados com: PBS (PIPb-PBS), nanopartículas recobertas com bicamada de ácido láurico (PIPb-FMBL), tratado com anfotericina B (PIPb-AmB)) e tratado com nanopartículas recobertas com bicamada de ácido láurico e Anfotericina B (PIPb-FMBL-AmB))	98
4.27	Estrutura molecular da protoporfirina IX de ferro	101
4.28	(a) Subtração entre os espectros SERS de pulmões infectados e submetidas a diferentes tratamentos (PBS, FMBL, AmB livre, FMBL-AmB) e pulmão sadio. (b), (c) (d) e (e) ampliações de regiões espectrais importantes.	106
4.29	Espectros SERS das amostra de sangue de camundongo tratado com o sistema NPBSA (i) e não tratado (controle). Para comparação é mostrado em (iii) o espectro SERS da albumina bovina (BSA).	111
4.30	Espectros SERS das amostras de cerebelo concentrado (a) e sobrenadante (b), para os camundongos tratado com o sistema NPBSA (i) e não tratado (controle) (ii).	113
4.31	Espectros SERS das amostras de diencéfalo concentrado (a) e sobrenadante (b), para os camundongos tratado com o sistema NPBSA (i) e não tratado (controle) (ii).	114

4.32 *Espectros SERS das amostras de córtex concentrado (a) e sobrenadante (b), para os camundongos tratado com o sistema NPBSA (i) e não tratado (controle) (ii).* 115

Capítulo 1

Introdução

Dentre os vários propósitos da ciência, sobressai-se o de proporcionar à humanidade melhorias, buscando-se sempre renovar e desenvolver novas tecnologias. Na atualidade, a nanociência tem permitido grandes avanços nas mais diversas áreas do conhecimento. E dentro desse ramo da ciência, os fluidos magnéticos exercem papel de destaque, visto que apresentam características singulares que lhes permitem grandes aplicabilidades.

Tem-se por fluidos magnéticos a suspensão coloidal de nanopartículas magnéticas recobertas por diferentes tipos de agentes tensoativos, o que lhes garante uma grande versatilidade. Assim, esses fluidos complexos podem ser empregados nas mais diversas aplicações tecnológicas e biotecnológicas. Por se apresentarem na escala nanométrica, as nanopartículas magnéticas possuem características únicas, uma vez que suas propriedades são fortemente influenciadas por sua superfície; por isso, os fluidos magnéticos são objeto de inúmeras pesquisas. Tais fluidos têm um grande potencial nas aplicações biomédicas e, dentre essas, destacam-se sistemas de entrega de drogas, agente de contrastes em ressonância magnética, tratamento contra câncer por magnetohipertemia, separação imunomagnética, dentre outros [1–6]. Contudo, para tornar possível estas aplicações, faz-se necessário obter fluidos biocompatíveis, com sítios ativos para identificação e conjugação dos agentes biológicos, estáveis

quimicamente dentro do corpo e biodegradáveis.

Assim, é fundamental conhecer as propriedades e as características dos fluidos magnéticos voltados para as aplicações biomédicas. Várias técnicas têm sido empregadas no estudo desses materiais, de modo que é possível conhecer profundamente suas características magnéticas, sua estrutura cristalina, seu tamanho e sua carga superficial, quando em solução [7–9]. Porém, há grande dificuldade em estudar as propriedades físico-químicas da interface caroço-cobertura (nanopartículas magnéticas - moléculas adsorvidas)

A espectroscopia Raman, por fornecer informações a respeito dos modos vibracionais de moléculas e sólidos, é uma ferramenta poderosa no estudo dos mais diferentes tipos de materiais. Essa técnica, diferentemente da espectroscopia de infravermelho, requer pouca preparação de amostras e possibilita a análise de espécies em solução aquosa. Além disso, permite a identificação e a quantificação de espécies químicas, uma vez que o conjunto dos modos vibracionais das amostras está diretamente relacionado à sua identidade química.

Embora a espectroscopia Raman convencional forneça importantes informações a respeito das propriedades químicas e estruturais das nanopartículas magnéticas, ela se mostra limitada na investigação das moléculas adsorvidas na sua superfície, enquanto suspensas no líquido carreador [9]. Em parte, esta limitação está relacionada com a cor escura dos fluidos magnéticos, baixas concentrações das moléculas adsorvidas e efeitos intensos de fluorescência. Além do mais, estudar sistemas biológicos utilizando a espectroscopia Raman é geralmente dificultado pela baixíssima seção de choque desses sistemas. Outro limitante da técnica, no estudo de sistemas biológicos, é a presença de fortes fluorescências que sobressaem-se ao sinal Raman. Assim, para contornar essas limitações faz-se necessário o uso de abordagens experimentais mais avançadas. Neste contexto, o denominado efeito de Intensificação do Espalhamento Raman por Superfície - SERS (Surface Enhanced

Raman Scattering) emerge como uma ferramenta poderosa e inovadora para a detecção de um grande variedade de moléculas, inclusive na detecção de apenas uma única molécula [10, 11]. Vale relatar que a descoberta do efeito SERS tem sido comparada ao efeito Mössbauer [12].

Descoberto há aproximadamente 35 anos, o efeito SERS pode ser observado quando a molécula em estudo está adsorvida sobre sítios ativos, superfície rugosa, tipicamente metais como prata, ouro ou cobre [13]. Dentre estes, a prata tem sido amplamente usada como substratos SERS ativo baseados em filmes produzidos por eletrodeposição ou coloides, que são facilmente preparados. A grande intensificação do espalhamento Raman ($\sim 10^6$) é devido à interação da amostra com o metal, que em condições adequadas intensifica o campo elétrico local devido a efeitos de ressonância [12].

A existência do efeito SERS permite o uso da espectroscopia Raman de forma muito mais abrangente, abrindo possibilidades de aplicação da espectroscopia vibracional na análise de materiais em baixíssimas concentrações ou nos quais apresentam forte fluorescência. Várias pesquisas nas quais há apenas traços da molécula em estudo na solução têm utilizado a técnica SERS como método de detecção. Como por exemplo, na identificação de poluentes ambientais, como corantes e pesticidas [14, 15], bem como no estudo de biomoléculas como as bases do DNA, citocromo-c e hemoglobina [16–18].

Assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver e implantar a técnica SERS, no âmbito do INCT: Nanobiotecnologia, a fim de utilizá-la na caracterização da interface nanopartícula/surfactante de complexos magnéticos nanoestruturados destinados à aplicações biotecnológicas e na avaliação das modificações químicas decorrentes do uso destes complexos em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Para isso, foram desenvolvidos dois substratos SERS a base de coloides e filmes de prata, os quais foram testados quanto a sua estabilidade ao longo do tempo e intensificação

SERS. Em seguida, foram estudadas a adsorção de moléculas de Anfotericina B, bem como do anticorpo antiCEA em nanopartículas magnéticas a base de óxido de ferro. Por último, com o objetivo de verificar a potencialidade da técnica SERS no estudo de sistemas *in vivo* e sua relação com complexos nanoestruturados desenvolvidos no âmbito do INCT: Nanobiotecnologia, dois sistemas foram investigados. O primeiro trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do complexo nanopartícula/Anfotericina B no tratamento de uma infecção fúngica por Pbmicosose em camundongos. Uma comparação com o tratamento convencional também foi realizada. O segundo trabalho tem como objetivo verificar a possibilidade de nanopartículas magnéticas atravessarem a barreira hemato-encefálica de camundongos, quando injetadas na corrente sanguínea dos animais. A estratégia utilizada para isso foi encapsular nanopartículas de maguemitita em albumina bovina. É importante ressaltar que estes trabalhos ainda não estão concluídos, e necessitam de mais estudos para que sejam finalizados.

Esta tese está organizada da seguinte forma: no Capítulo 2 é apresentado uma revisão de literatura sobre o efeito Raman Convencional e o efeito SERS. No Capítulo 3, são apresentadas as metodologias experimentais empregadas nesse trabalho. No Capítulo 4 são expostos os resultados e discussões desenvolvidos ao longo do trabalho de tese. Na Seção 4.1 são expostos os resultados obtidos do estudo dos substratos SERS empregados no trabalho (colóide e filme de prata). Na Seção 4.2 e 4.3 são apresentados os resultados dos estudos SERS do sistema nanopartículas magnéticas associadas com o fármaco anfotericina B e com o anticorpo AntiCEA. Na seção 4.4 são mostrados dois estudos envolvendo o uso da técnica SERS na investigação de sistemas *in vivo*: (i) Uso do complexo nanopartícula/Anfotericina B (FMBL-AmB) no tratamento da infecção por Pbmicosose em camundongos e (ii) Uso da técnica SERS no estudo das possíveis alterações químicas, em diferentes regiões do cérebro de camundongos, provocadas pela injeção do sistema NPs/albumina na

corrente sanguínea do camundongo. Por fim, no capítulo 5 pode ser encontrado a conclusão geral deste trabalho de tese e algumas perspectivas de trabalhos futuros.

Capítulo 2

Espectroscopia Raman

2.1 Efeito Raman

Em 1928, C. V. Raman publicou um trabalho [19] no qual verificou que a luz espalhada por moléculas, em líquidos e gases, apresentava comprimentos de onda distintos: um referente à luz incidente; e outro, à radiação espalhada modificada. Associando ao efeito do espalhamento Compton, Raman concluiu que essa radiação modificada era devido a efeitos de flutuação do estado normal das moléculas. Com efeito, um novo fenômeno foi observado e, por isso, C. V. Raman foi laureado com o prêmio Nobel em 1930.

No efeito Raman o espectro da radiação observado se dá pelas transições entre níveis vibracionais da molécula, após excitação por uma radiação monocromática, conforme esquema mostrado na Figura 2.1. Quando a onda eletromagnética interage com a molécula, ela pode distorcer a nuvem de elétrons em torno do núcleo. Assim, por um instante a luz transfere energia para a molécula criando estados energéticos virtuais, que não são próprios da molécula e dependem apenas das características da onda eletromagnética incidente. Esses estados virtuais não são estáveis e, por-

tanto, têm vida curta, de modo que rapidamente a energia é liberada na forma de radiação eletromagnética. O modo como a nuvem de elétrons é distorcida depende de quanta energia é transferida pela onda eletromagnética e das propriedades da molécula. De modo que a luz pode ser espalhada por duas formas. O mais intenso, chamado de espalhamento Rayleigh, ocorre quando a nuvem de elétrons relaxa, após distorção devido à interação com a onda eletromagnética incidente, sem que haja movimento apreciável dos núcleos. Caracteriza-se por um processo essencialmente elástico e portanto não há grandes mudanças na energia entre a luz espalhada e a incidente. No segundo, muito menos eficiente, somente um entre $10^6 - 10^8$ fótons espalhados, ocorre quando o núcleo se movimenta ao mesmo tempo em que a luz incidente interage com os elétrons. Neste caso há uma mudança considerável na energia da luz espalhada, uma vez que os núcleos são muito mais pesados que os elétrons. Esse espalhamento se caracteriza por ser um espalhamento inelástico e é chamado de espalhamento Raman [20].

Pode-se entender resumidamente o efeito Raman conforme o diagrama esquemático na Figura 2.1. Os fótons incidentes $h\nu_i$ são espalhados inelasticamente pela molécula, de modo que sua frequência de oscilação é deslocada proporcionalmente às vibrações moleculares características $h\nu_M$. O deslocamento da frequência para os fótons espalhados inelasticamente podem ocorrer para um nível mais baixo ou mais alto de energia, em relação ao fóton inicial, dependendo se interagiu com a molécula no estado fundamental de vibração ou em um estado excitado. No primeiro, chamado espalhamento Stokes, é caracterizado pela excitação da molécula quando encontra-se em seu estado fundamental ($h\nu_i$) e, após excitada para o estado virtual, emite um fóton com frequência $\nu_S = \nu_i - \nu_M$, decaindo para um estado de energia maior do que o fundamental. No segundo, chamado de espalhamento Anti-Stokes, ocorre quando o fóton interage com a molécula já no estado excitado ($h\nu_M$) e que, ao retornar para o estado fundamental, emite um fóton com frequência

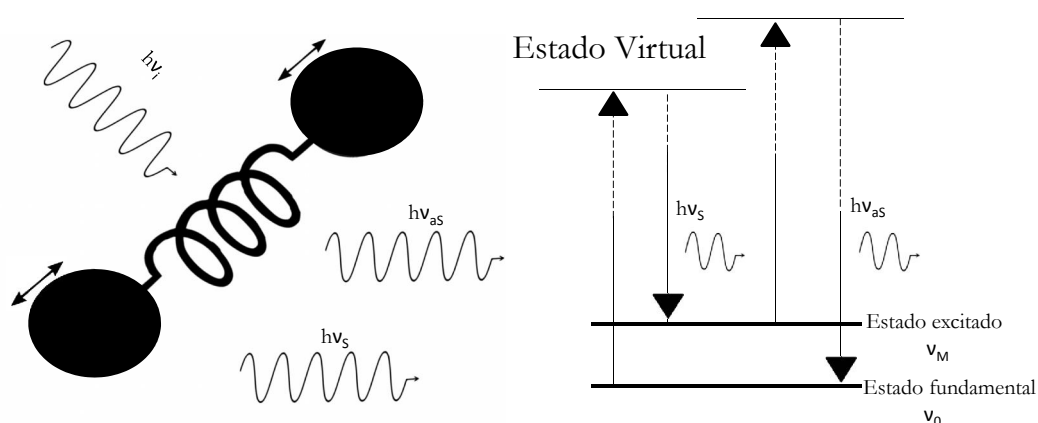


Figura 2.1: Diagrama esquemático do fóton espalhado após interagir com uma molécula.

maior que o inicial $\nu_{aS} = \nu_i + \nu_M$.

Uma vez que os fótons espalhados dependem dos modos vibracionais das moléculas, o espectro Raman é característico de cada material em estudo, uma espécie de assinatura, de forma que a análise dos espectros Raman permite obter informações sobre a estrutura química e física da substância em estudo. Além disso, a espectroscopia Raman tem sensibilidade para detectar impurezas na amostra e permitir a análise de substâncias tanto no estado gasoso como no líquido e no sólido, tanto sob aquecimento quanto resfriamento.

Entre 1930-1935 cerca de 50 trabalhos sobre a espectroscopia Raman foram publicados por ano, por diferentes grupos [21]. Contudo, essa técnica experimental

só ganhou destaque com o surgimento do laser, na década de 60, que por ser um feixe de luz monocromática e colimado otimizou a obtenção dos espectros Raman. Com isso várias empresas redesenharam o aparelho antigo e desenvolveram novos equipamentos como, por exemplo, detectores mais sensíveis como a fotomultiplicadora e a CCD (Charge Couple Device), que permite a obtenção dos espectros em segundos. Tem-se ainda a Espectroscopia Raman por transformada de Fourier (FT-Raman), Espectroscopia Raman acoplado ao microscópio confocal, à microscopia de força atômica e outros. De modo que o efeito Raman se tornou uma ferramenta poderosa e versátil no estudo de problemas físicos, químicos e biológicos.

O espalhamento inelástico da luz foi previsto teoricamente por Smekal [22], em 1923, usando a antiga teoria quântica, fundamentando-se que um quantum de luz com momento e energia pode interagir inelasticamente com uma molécula. Contudo, esse modelo não era capaz de explicar a relação entre as propriedades moleculares com o espalhamento Raman. Assim, em 1934, Placzek [23] desenvolveu a Teoria da Polarizabilidade para explicar as intensidades e os perfis de excitação Raman. Nesta, a molécula é considerada um sistema quântico, descrita por uma função de onda, e a radiação eletromagnética é tratada classicamente. Dessa forma o efeito Raman é descrito pelas transições entre estados energéticos, quantização dos modos vibracionais, promovidos pela indução de uma perturbação do estado inicial da molécula devido à interação da molécula com o campo eletromagnético. Heisenberg, Kramers, Dirac [24,25] descreveram de forma completa a teoria para o espalhamento Raman utilizando a teoria de perturbação de segunda ordem dependente do tempo e a quantização do campo eletromagnético. De modo que todo o estudo teórico do espalhamento desde então é baseado na equação KHD (Kramers, Heisenberg e Dirac). Pode-se então descrever o efeito Raman conforme descrição abaixo, [26,27].

Os princípios da espectroscopia Raman podem ser compreendidos em termos da relação entre um campo elétrico dinâmico \mathbf{E} e o momento de dipolo elétrico

induzido na molécula por aquele. Assim, o campo elétrico induz uma transição na molécula de um estado inicial i para outro final f .

O vetor momento de dipolo induzido, dependente do tempo, para a molécula pode ser escrito como uma soma de uma série de vetores de momento de dipolo induzidos no tempo $\mathbf{p}^{(1)}, \mathbf{p}^{(2)}, \mathbf{p}^{(3)} \dots$:

$$\mathbf{p}_{fi} = (\mathbf{p}^{(1)})_{fi} + (\mathbf{p}^{(2)})_{fi} + (\mathbf{p}^{(3)})_{fi} \dots, \quad (2.1)$$

onde $(\mathbf{p}^{(1)})_{fi}$ é linear com \mathbf{E} , $\mathbf{p}^{(1)} = \alpha \cdot \mathbf{E}$, $(\mathbf{p}^{(2)})_{fi}$ é quadrático com \mathbf{E} , $\mathbf{p}^{(2)} = \frac{1}{2} \beta \cdot \mathbf{E}^2$, $(\mathbf{p}^{(3)})_{fi}$ é cúbico com \mathbf{E} , $\mathbf{p}^{(3)} = \frac{1}{6} \gamma \cdot \mathbf{E}^3$, e assim por diante. Onde α é o tensor polarizabilidade, β é o tensor hyperpolarizabilidade e γ é o segundo tensor hyperpolarizabilidade.

A transição total do dipolo elétrico \mathbf{p}_{fi} é dado por:

$$\mathbf{p}_{fi} = \langle \Psi'_f | \hat{\mathbf{p}} | \Psi'_i \rangle, \quad (2.2)$$

onde Ψ'_f e Ψ'_i são as funções de onda perturbadas dependentes do tempo para os estados inicial e final da molécula e $\hat{\mathbf{p}}$ é o operador momento de dipolo elétrico.

As funções de onda Ψ'_f e Ψ'_i podem ser expressas como uma expansão em série:

$$\Psi'_i = \Psi_i^{(0)} + \Psi_i^{(1)} + \Psi_i^{(2)} + \dots + \Psi_i^{(n)} \quad (2.3)$$

$$\Psi'_f = \Psi_f^{(0)} + \Psi_f^{(1)} + \Psi_f^{(2)} + \dots + \Psi_f^{(n)} \quad (2.4)$$

onde $\Psi_i^{(0)}$ representa o estado não perturbado, $\Psi_i^{(1)}$ é a modificação de $\Psi_i^{(0)}$ como resultado da perturbação de primeira ordem, $\Psi_i^{(2)}$ é a modificação de $\Psi_i^{(0)}$ como resultado da perturbação de segunda ordem e assim por diante.

Introduzindo as expansões Equações 2.3 e 2.4 na Equação 2.2 e comparando com os termos correspondentes na Equação 2.1, têm-se que:

$$(\mathbf{p}^{(1)})_{fi} = \langle \Psi_f^{(0)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(1)} \rangle + \langle \Psi_f^{(1)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(0)} \rangle, \quad (2.5)$$

$$(\mathbf{p}^{(2)})_{fi} = \langle \Psi_f^{(0)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(2)} \rangle + \langle \Psi_f^{(2)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(0)} \rangle + \langle \Psi_f^{(1)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(1)} \rangle, \quad (2.6)$$

$$(\mathbf{p}^{(3)})_{fi} = \langle \Psi_f^{(0)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(3)} \rangle + \langle \Psi_f^{(3)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(0)} \rangle + \langle \Psi_f^{(1)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(2)} \rangle + \langle \Psi_f^{(2)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(1)} \rangle, \quad (2.7)$$

Além disso, surge a mais uma transição do momento que é independente de \mathbf{E} e que envolve somente as funções de ondas não perturbadas:

$$(\mathbf{p}^{(0)})_{fi} = \langle \Psi_f^{(0)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i^{(0)} \rangle. \quad (2.8)$$

A Equação 2.8 trata-se de uma transição direta entre os estados finais e iniciais não perturbados, portanto não há espalhamento da luz. Assim, não precisa ser considerada.

Os termos para o espalhamento Raman e o Rayleigh podem ser obtidos da aproximação de primeira ordem, conforme descritos na Equação 2.5. Uma vez que a amplitude do campo eletromagnético é complexa, o momento de dipolo também tem natureza complexa, assim pode-se reescrever a Equação 2.5 como:

$$(\tilde{\mathbf{p}}^{(1)})_{fi} = \langle \Psi_f^{(1)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(0)} \rangle + \langle \Psi_f^{(0)} | \hat{\mathbf{p}} | \Psi_i f^{(1)} \rangle, \quad (2.9)$$

e pode-se definir a transição de momento de dipolo elétrico real como:

$$(\mathbf{p}^{(1)})_{fi} = (\tilde{\mathbf{p}}^{(1)})_{fi} + (\tilde{\mathbf{p}}^{(1)})_{fi}^*, \quad (2.10)$$

onde $(\tilde{\mathbf{p}}^{(1)})_{fi}^*$ é o complexo conjugado de $(\tilde{\mathbf{p}}^{(1)})_{fi}$.

O que nos leva à seguinte expressão para a componente ρ de $(\mathbf{p}^{(1)})_{fi}$:

$$(p_\rho^{(1)})_{fi} = \frac{1}{2\hbar} \sum_{r \neq i, f} \left\{ \frac{\langle \psi_f | \hat{p}_\rho | \psi_r \rangle \langle \psi_r | \hat{p}_\sigma | \psi_i \rangle}{\omega_{ri} - \omega_1 - i\Gamma_r} + \frac{\langle \psi_f | \hat{p}_\sigma | \psi_r \rangle \langle \psi_r | \hat{p}_\rho | \psi_i \rangle}{\omega_{rf} + \omega_1 + i\Gamma_r} \right\} \quad (2.11)$$

$$\tilde{E}_{\sigma 0} \exp[-i(\omega_1 - \omega_{fi})t] + \text{complexo conjugado}$$

ψ_i , ψ_r e ψ_f descrevem funções de onda não perturbadas independentes do tempo para os estados i , r e f , respectivamente. A relação entre ψ_r e sua função de onda dependente do tempo é:

$$\Psi_r = \psi_r \exp[-i(\omega_r - i\Gamma_r)t], \quad (2.12)$$

onde

$$\omega_r = \frac{E_r}{\hbar}, \quad (2.13)$$

E_r é a energia do estado r e $2\Gamma_r$ é a largura do nível r .

Para os estados inicial i e final f admiti-se que o tempo de vida é infinito, assim $\Gamma_i = \Gamma_f = 0$. De forma que:

$$\Psi_i = \psi_i \exp[-i(\omega_i t)], \quad (2.14)$$

e similarmente para Ψ_f e ψ_f . Além disso, $\omega_{ri} = \omega_r - \omega_i$, e, \hat{p}_ρ e \hat{p}_σ são as componentes ρ e σ do operador momento de dipolo elétrico. $\tilde{E}_{\sigma 0}$ é a componente complexa σ da amplitude da onda plana eletromagnética de frequência ω_1 associada à luz incidente.

O termo $\omega_1 - \omega_{fi}$ refere-se à geração do espalhamento Rayleigh e Raman. Quando ω_{fi} é negativo, o estado final é menor em energia do que o inicial como

no espalhamento anti-Stokes. Se $\omega_{fi} = 0$ o estado final e inicial têm a mesma energia, o que caracteriza o espalhamento Rayleigh e quando ω_{fi} é positivo tem-se o espalhamento Stokes uma vez que o estado final é mais energético do que o inicial.

A intensidade observada para o espalhamento Raman $\omega_s = \omega_1 - \omega_{rf}$ é:

$$I_{fi} = \text{constante } I_0(\omega_1 - \omega_{rf})^4 \sum_{\rho\sigma} |(\alpha_{\rho\sigma})_{fi}|^2, \quad (2.15)$$

onde I_0 é a intensidade do feixe incidente e é proporcional ao quadrado do campo elétrico incidente \mathbf{E} . Pode-se então introduzir a transição de polarizabilidade geral $(\alpha)_{fi}$ nas componentes $(\alpha_{\rho\sigma})_{fi}$

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{fi} = \frac{1}{\hbar} \sum_{r \neq i, f} \left\{ \frac{\langle \psi_f | \hat{p}_\rho | \psi_r \rangle \langle \psi_r | \hat{p}_\sigma | \psi_i \rangle}{\omega_{ri} - \omega_1 - i\Gamma_r} + \frac{\langle \psi_f | \hat{p}_\sigma | \psi_r \rangle \langle \psi_r | \hat{p}_\rho | \psi_i \rangle}{\omega_{rf} + \omega_1 + i\Gamma_r} \right\} \quad (2.16)$$

Vale acrescentar o espalhamento quando a frequência de oscilação da luz incidente é próxima da frequência de uma transição eletrônica da molécula. Nesse caso o denominador do primeiro termo na equação 2.16, termo ressonante, se torna pequeno e então a intensidade do espalhamento Raman aumenta enormemente, em um fator de $10^3 - 10^5$ [28]. Este fenômeno é chamado de espalhamento Raman Ressonante.

A relação entre a intensidade de espalhamento Raman e Rayleigh por uma única molécula e a irradiância \mathfrak{J} da radiação incidente, soma sobre toda energia da radiação que passa sobre uma superfície perpendicular à direção de propagação da onda eletromagnética durante um segundo, é dada por:

$$I = \sigma' \mathfrak{J} \quad (2.17)$$

onde σ' é o diferencial de primeira ordem da seção de choque do espalhamento da luz,

cuja unidade é $m^2 sr^{-1} molecula^{-1}$. A seção de choque é utilizada na comparação da eficiência do espalhamento para diferentes moléculas, uma vez que depende somente das propriedades moleculares. Assim, a seção de choque total para o espalhamento é:

$$\sigma = \int_0^{4\pi} \sigma' d\Omega \quad (2.18)$$

onde $d\Omega$ é o ângulo sólido elementar. A seção de choque para o espalhamento Raman é da ordem de $10^{-31} cm^2 molecula^{-1}$, para a absorção no infra-vermelho é da ordem de $10^{-18} cm^2 molecula^{-1}$ e para a fluorescência é da ordem de $10^{-15} cm^2 molecula^{-1}$.

2.1.1 Raman Convencional em Fluidos Magnéticos

Nanopartículas magnéticas são estruturas cristalinas que se apresentam na escala nanométrica. Sua estrutura química é chamada de óxido de ferro, cuja fórmula é MFe_2O_4 onde M é o cátion bivalente e pode ser Co, Fe, Ni e outros. Contudo, as que apresentam biocompatibilidade são a magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma - Fe_2O_4$).

A estrutura cristalina desses materiais é conhecida como espinélio inverso cúbica, Figura 2.2. Nessa estrutura os íons de oxigênio acomodam-se formando uma estrutura cúbica de face centrada e, nos interstício, os cátions se distribuem formando os sítios tetraédricos (sítio A) e octaédricos (sítio B). Nessa figura em especial é apresentada a estrutura da magnetita e maguemita, que apresentam estrutura espinélio inversa, devido à distribuição dos cátions nos sítios.

O interessante nessas estruturas é que os cátions apresentam momento magnético não nulo (devido ao desemparelhamento dos elétrons na camada d) e na estrutura cristalina se organizam nas subredes, sítio A e B, com seus momentos magnéticos opostamente orientados. Como os cátions possuem diferentes momen-

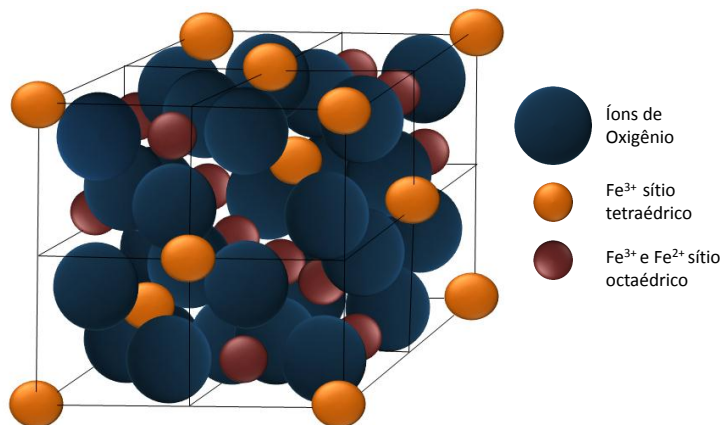


Figura 2.2: *Estrutura espinélio cúbica apresentada pelos óxidos de ferro.*

tos magnéticos há uma resultante não nula no momento magnético líquido, o que caracteriza esses materiais como ferrimagnéticos.

O fluido magnético é obtido pela suspensão coloidal das nanopartículas magnéticas. Para isso, têm-se que contrapor as forças atrativas, que levam à agregação e à decantação, modificando a superfície das nanopartículas. Dessa forma, os fluidos podem ser surfactado ou iônico. No primeiro faz-se o uso de uma molécula surfactante, normalmente pertencente ao grupo alquil de cadeia longa com hetero-átomos e com cabeças polares que se ligam na superfície dos nanocristais via ligação covalente, eletrostática ou por coordenação, de modo a impedir a agregação das nanopartículas por repulsão estérica [29]. No segundo, cargas elétricas são colocadas na superfície das nanopartículas, de forma que há repulsão elétrica entre elas, impedindo-as de agregarem.

Esses fluidos complexos abrem um leque de aplicações. Contudo, para que essas aplicações se tornem plausíveis é importante conhecer suas características físico-químicas. Assim, várias técnicas são empregadas para estudá-las, dentre elas

a espectroscopia Raman se destaca por ser considerada uma técnica poderosa e de fácil implementação.

É sabido que ferritas com estrutura espinélio pertencem ao grupo espacial $Fd3m$ (O_h^7). Para esse grupo prediz-se teoricamente cinco modos vibracionais Raman (A_{1g} , E_g e três T_{2g}), segundo White and Angelis [30]. Esses modos são observados e já há uma anuência na literatura quanto as suas posições [31]. O uso da espectroscopia Raman para estudar as ferritas, sejam elas bulk ou nanoparticuladas, é amplamente consolidado [32].

A análise de fluidos magnéticos utilizando a técnica de espectroscopia Raman é de grande interesse, já que tal técnica permite a análise das estruturas moleculares, assim como das ligações químicas existentes entre elas. No caso dos fluidos magnéticos, almeja-se conhecer o comportamento das coberturas das nanopartículas nos fluidos magnéticos, visto ser tal informação de grande valia para as diversas aplicações. Como, por exemplo, na área de biomedicina, na qual deseja-se utilizar fluidos magnéticos como carreadores de fármacos, tratamento de cancer por hiperteemia entre outros. Nesse caso, as moléculas responsáveis pela estabilidade do fluido devem ser compatíveis com o meio biológico e devem conter grupos funcionais livres para se ligarem aos agentes biológicos específicos para cada finalidade dos fluidos magnéticos. E o que determina se a superfície das nanopartículas irá se ligar aos agentes biológicos é, em parte, a distribuição espacial dos grupos funcionais e a orientação dos surfactantes.

Contudo, a espectroscopia Raman Convencional permite a análise da fase sólida dos fluidos dando informações quanto à estrutura cristalina das nanopartículas magnéticas, porém pouca informação sobre as moléculas que estão adsorvidas na sua superfície são obtidas.

Ying-Sing Li *et al.* [33], em um recente trabalho, mostraram o uso da técnica espectroscopia Raman na caracterização de nanopartículas magnéticas com diferen-

tes coberturas. Por meio desta, foi possível identificar a estrutura cristalina do material analisado e verificar que a cobertura na superfície das nanopartículas promove uma proteção contra o aquecimento, impedindo a transformação de fase da maguemita para hematita.

Soler *et al.* [34,35] analisaram fluidos magnético utilizando Raman Convencional associados a outras técnicas de caracterização. No primeiro, pôde-se verificar, ao estudar nanopartículas de maguemita recobertas com diferentes concentrações de ácido oleico, que este está associado às nanopartículas via ponte de hidrogênio e que espécies de oleatos ligam-se covalentemente com o ferro sob diferentes tipos de coordenação. No segundo, pôde-se monitorar a presença do modo *stretching* associados à ponte de enxofre $S - S$ formada pelas moléculas de DMSA em diferentes concentrações na superfície de nanopartículas de maguemita.

Igor Chourpa *et al.* [36] verificaram, usando Raman confocal, a conformação da magnetita e maghemita em fluido magnético iônico sintetizado por coprecipitação. Nesse trabalho proporam um método quantitativo e qualitativo no estudo da nanofase de óxido de ferro.

Joel Rubim *et al.* [37] estudaram fluidos magnéticos baseados na síntese de nanopartículas magnéticas recobertas por dupla camada elétrica utilizando a espectroscopia Raman. Verificou-se a formação de diferentes fases químicas na superfície das nanopartículas.

2.2 SERS

O efeito SERS consiste no aumento em várias ordens de grandeza da intensidade do espalhamento Raman por moléculas adsorvidas em uma superfície metálica devidamente preparada. Esse efeito foi observado por Fleischmann e seus colaboradores [38] ao estudarem, pela primeira vez, amostra de piridina adsorvida em

eletrodos de prata utilizando espectroscopia Raman. Uma vez que a espectroscopia Raman convencional não apresenta sensibilidade para analisar amostras distribuídas em monocamadas, a motivação deste trabalho estava em adsorver um maior número de moléculas, aumentando a área superficial da prata eletroquimicamente através da aplicação de vários processos de ciclo redução-oxidação. Como resultado Fleischmann e seus colaboradores observaram um espectro da piridina com a relação sinal/ruído muito boa. Contudo, a intensificação do espalhamento Raman da ordem de 10^6 não podia ser explicada apenas pelo aumento da área efetiva do eletrodo.

Assim, Jeanmaire e Van Duyne [39] e Albrecht e Creighton [40], em trabalhos independentes e baseando-se em diferentes fenômenos, especularam sobre os efeitos da interação entre a molécula e a superfície do eletrodo como responsáveis pela intensificação do espalhamento Raman. De fato, um novo fenômeno foi descoberto: SERS - espalhamento Raman intensificado por superfície.

Nos quase 40 anos de descoberta do fenômeno SERS diferentes tipos de substratos têm sido empregados:

- ↔ Coloides metálicos - síntese química ou por laser ablation;
- ↔ Deposição de metais em vidro, silício e outros, por evaporação, *sputtering* à vácuo, *spin-coating* e outros;
- ↔ Eletrodos metálicos - formados por processos de oxi-redução.

O efeito SERS é registrado com maior intensidade em metais como prata, ouro e cobre, mas também metais alcalinos têm sido usados. Dentre todos os metais registrados na literatura, a prata tem sido a mais empregada e a mais eficiente [41]. E as maiores intensificações são observadas em filmes metálicos que apresentam rugosidade na escala nanométrica (10-100nm) [42].

Além dos diferentes substratos, há uma grande versatilidade no campo da espectroscopia intensificada por superfície que permite investigações mais apuradas sobre as moléculas, como por exemplo:

SM-SERS \leftrightarrow single-molecule SERS - Raman de apenas uma molécula;
SEHRS \leftrightarrow Hiper Raman Intensificado por superfície;
TERS \leftrightarrow Tip-SERS - SERS conjugado com Microscopia de Força Atômica;
UV-SERS \leftrightarrow SERS excitado com Ultravioleta.

Vale lembrar que as características da molécula a ser estudada pode tornar o efeito SERS mais sensível, já que quanto mais polarizável for a molécula maior será sua sensibilidade ao campo elétrico intensificado pela superfície e, some-se a isso, o fato de possíveis afinidades química entre a superfície e o adsorbato [43].

Há dois modelos principais e independentes que tentam elucidar o efeito SERS, o modelo químico ou molecular e o modelo eletromagnético. Conforme a Equação 2.15, que descreve a intensidade da luz espalhada por uma molécula na espectroscopia Raman convencional, vemos que há uma dependência com o quadrado da polarizabilidade molecular (α) e da radiação incidente \mathbf{E} . Assim, o modelo químico é baseado na alteração das propriedades elétricas da molécula, interferindo na sua polarizabilidade, e o modelo eletromagnético nas modificações do campo elétrico incidente, provocadas pelo metal ao qual a molécula está adsorvida.

Há muita discussão na literatura sobre qual mecanismo efetivamente está envolvido no efeito SERS. No mais, os modelos químico e eletromagnético são multiplicativos.

2.2.1 Modelo Químico

Sob o entendimento do modelo químico a intensificação do espalhamento Raman ocorre devido ao aumento da polarizabilidade da molécula, como consequência de sua interação com os elétrons do metal [20]. Essa interação pode ser devido à ligações químicas convencionais ou interação eletrostática, de modo que pode haver mudanças nos espectros como alargamento de bandas, variações nas intensidades relativas, deslocamento de picos e mesmo surgimento de novas bandas [43]. Para

esse modelo verifica-se uma intensificação do sinal Raman de uma a duas ordens de grandeza e uma vez que necessita-se de contato metal-adsorbato para se obter a intensificação, o modelo químico é dito ser intensificação de curto alcance (*short range enhancement*).

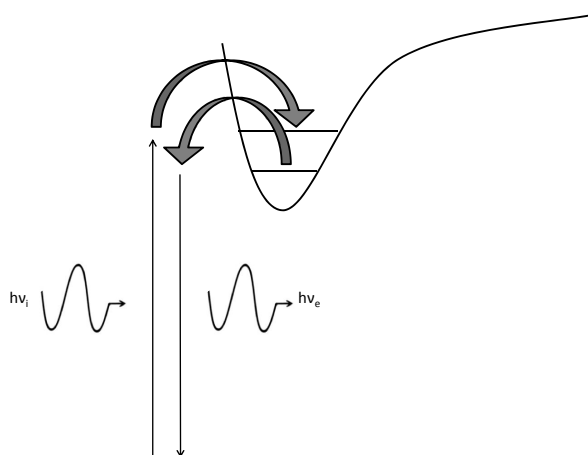


Figura 2.3: Diagrama ilustrativo para o mecanismo de intensificação SERS pelo modelo químico, figura adaptada da referência [43].

Basicamente a intensificação ocorre via o surgimento de novos estados eletrônicos entre a molécula e o metal. Estes novos estados servem como intermediários ressonantes no espalhamento Raman. O mecanismo pode ser melhor entendido conforme o esquema mostrado na Figura 2.3. A radiação incidente, com energia $h\nu_i$, é absorvida pelo metal numa região ativa SERS, local onde a molécula está quimio-adsorvida. Como consequência pode haver formação de pares buraco-elétron no metal. O elétron ou buraco tunela para a molécula e se permanecerem um período suficiente no qual a molécula mude seu estado vibracional, o elétron ao retornar para o metal levará essa informação. Quando então, o par elétron buraco for aniquilado um fóton é liberado com energia diferente do inicial, $h\nu_e$. Este fóton espalhado é então o responsável pelo perfil do espectro SERS - segundo o modelo químico.

Uma análise teórica mais cuidadosa pode ser encontrado no trabalho de Lombardi *et al.* [44].

Esse processo é análogo ao efeito Raman ressonante, que ocorre quando a radiação excitante (luz incidente) tem comprimento de onda situado dentro de uma banda de absorção intensa do composto em estudo [42]. No caso do SERS, o efeito ressonante ocorre porque a energia do orbital molecular de fronteira da molécula adsorvida é próxima do nível de energia de Fermi da superfície metálica e se a luz incidente tiver frequência próxima à diferença entre esses níveis energéticos, ocorre o mecanismo de intensificação como no Raman ressonante [45], ver Figura 2.4.

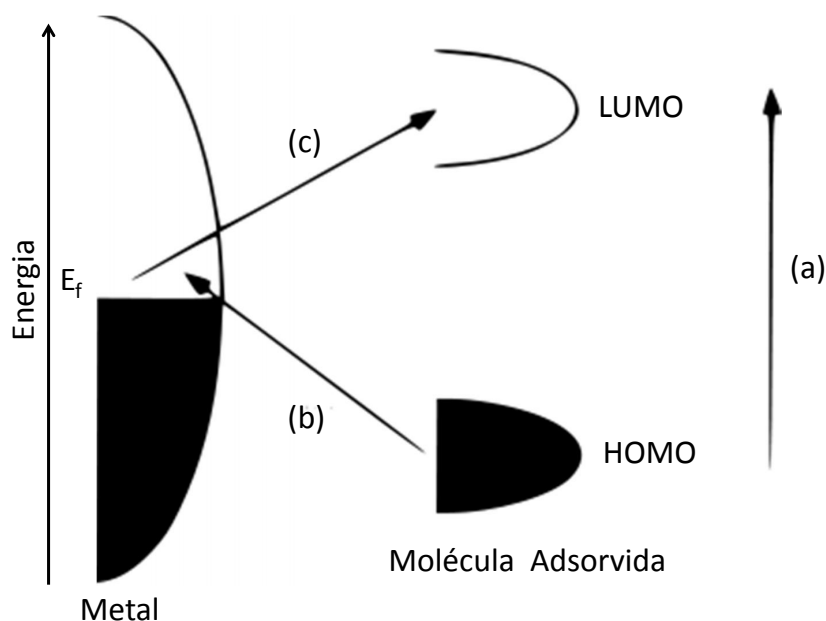


Figura 2.4: Típico diagrama de nível de energia para uma molécula adsorvida sobre uma superfície metálica. Os orbitais moleculares ocupados e desocupados, HOMO (*highest occupied molecular orbital*) e LUMO (*lowest unoccupied molecular orbital*) respectivamente, são alargados devido à interação com o metal, cuja ocupação orbital é determinada pela energia de Fermi. As setas indicam a possível excitação de transferência de carga. Figura adaptada da referência [45].

Vários trabalhos na literatura descrevem as modificações provocadas devido à interação entre a molécula e a superfície metálica, com o intuito de compreender os mecanismos que envolvem o modelo químico na intensificação do sinal Raman. Em um trabalho recente Land *et al.* [46] estudaram, por simulação computacional, o efeito do acoplamento e do tamanho de *cluster* bimetálicos (Au-Pd) nas mudanças da polarizabilidade da molécula de pirazina e portanto, na intensificação do sinal Raman. Zhao, Lin Lin *et al.* [47] estudaram também a pirazina, mas com ela quimicamente adsorvida na junção entre *cluster* de prata.

2.2.2 Modelo Eletromagnético

A intensificação do sinal Raman descrito pelo mecanismo eletromagnético ocorre devido à interação entre a luz incidente e os elétrons da superfície metálica. Os metais como a prata têm em sua superfície um grande número de elétrons, que surgem devido à organização cristalina dos metais. Nestes as cargas positivas se organizam formando uma rede cristalina e os elétrons das últimas camadas eletrônicas, elétrons de condução, são compartilhados por todo o metal de modo que possuem liberdade para se movimentarem ao longo da rede cristalina. Quando o feixe de luz incidente interage com esses elétrons, eles passam a oscilar em conjunto sobre a superfície, esta oscilação é chamada de plasmon superficial.

Para partículas metálicas pequenas ou em uma superfície na qual haja uma rugosidade periódica, o plasmon superficial tem uma frequência de ressonância para a qual o espalhamento e absorção da luz é mais eficiente. Essa frequência varia com a natureza do metal e, para a prata e ouro, ocorre na região do visível do espectro eletromagnético, por isso são mais eficientes como substratos SERS; uma vez que normalmente são utilizados lasers no visível e NIR (infra-vermelho próximo) na excitação para obtenção do espectro SERS. Em uma superfície metálica lisa, a oscilação do plasmon ocorre ao longo do plano da superfície de modo que pode

ocorrer absorção, mas não espalhamento. Para haver espalhamento é preciso ter oscilação do plasmon perpendicularmente ao plano da superfície metálica e isto é conseguido quando se tem uma rugosidade na superfície. Neste, o plasmon se localiza nos vales da superfície rugosa do metal e o espalhamento é causado quando o plasmon se move na direção dos picos [20]. De modo que a molécula próxima à região rugosa será submetida à um campo eletromagnético intensificado, proveniente do espalhamento ressonante da luz incidente ao interagir com o plasmon superficial do metal.

A descrição convencional do modelo eletromagnético é baseada na teoria clássica do espalhamento Mie, que descreve o espalhamento da luz por partículas pequenas comparadas ao comprimento de onda da luz incidente [12, 48–50]. O mecanismo eletromagnético pode ser compreendido de forma simples, ao se estudar o espalhamento da luz por uma esfera metálica com raio muito menor do que o comprimento de onda da luz incidente [20, 42]. O campo elétrico próximo à superfície do metal é:

$$E_r = E_0 \cos\theta + g \left(\frac{a^3}{r^3}\right) E_0 \cos\theta, \quad (2.19)$$

onde E_r é o campo elétrico total à uma distância r da superfície da esfera de raio a , θ é o ângulo relativo à direção do campo elétrico e g é uma constante relacionada com a função dielétrica do metal e do meio, descrita como:

$$g = \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0}\right), \quad (2.20)$$

onde ε_0 e ε são constantes dielétricas do meio que rodeia a esfera e do metal que constitui a esfera, respectivamente. Ver Figura 2.5.

Em algum ponto, g terá valor máximo quando o denominador for mínimo: ε_0 usualmente é próximo de 1 e portanto g será máximo quando $\varepsilon(\nu) = -2$. Isso

ocorre quando o plamon superficial está em ressonância com a frequência da luz incidente, de modo que o campo elétrico local experimentado pela molécula adsorvida na superfície do metal, E_r , é muito maior do que o incidente, E_0 . Pelo mecanismo eletromagnético chega-se à uma intensificação do espalhamento Raman da ordem de 10^6 .

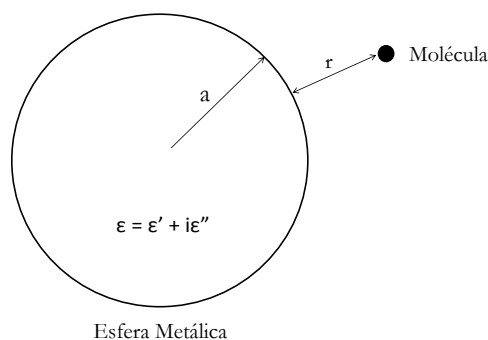


Figura 2.5: *Diagrama esquemático do mecanismo eletromagnético para uma esfera metálica [51].*

É sabido na literatura que partículas metálicas isoladas não apresentam intensificação do espalhamento Raman, contudo quando interagem entre si ocorre uma grande intensificação. De modo que há regiões, na superfície metálica e entre as partículas metálicas no colóide, nas quais a intensificação é mais efetiva que outras, essas regiões são chamadas de *hot spot* [51]. Cada partícula individual tem um plamon superficial no qual a condição de ressonância somente é satisfeita para uma pequena variação de comprimento de onda. Entretanto, devido à interação entre os elétrons livres na superfície das partículas aglomeradas, novos comprimentos de ondas da luz incidente passarão a se enquadrar na condição de ressonância, ver Figura 2.6.

Ademais, a espécie do metal envolvido e mesmo a morfologia alterarão, dentro do mecanismo eletromagnético, a intensificação do sinal Raman, já que a

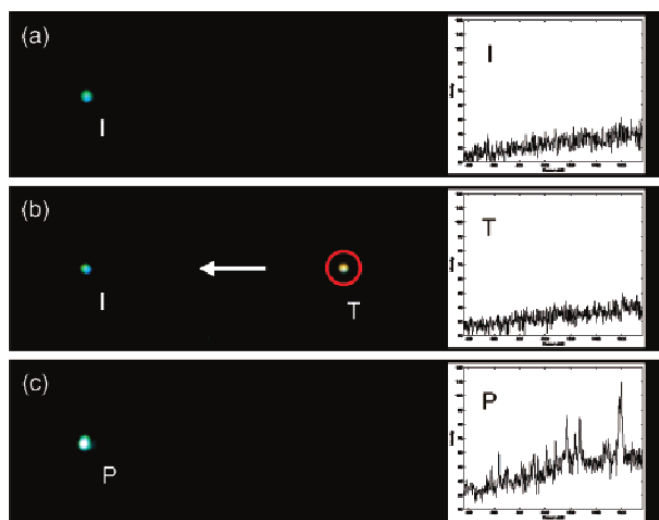


Figura 2.6: (a) e (b) não é possível observar espectro do tiofenol quando as nanopartículas de prata estão isoladas, diferentemente quando há a formação de dímeros em (c), hot spot. Figura adaptada da referência [52].

frequência de oscilação da superfície de plasma depende da constante dielétrica do metal. O entendimento sobre as propriedades do coloide e dos filmes metálicos na intensificação SERS ainda é objeto de pesquisas [53,54].

Uma comparação entre os mecanismos químico e eletromagnético pode ser observado abaixo [45]:

Mecanismo Químico:

↔ **origem:** o efeito SERS é observado mediante um processo ressonante, que envolve transferência de carga entre o metal e a molécula adsorvida;

↔ **rugosidade da superfície:** escala atômica;

↔ **dependência com a distância:** as espécies têm de estar adsorvidas diretamente sobre a superfície.

Mecanismo Eletromagnético:

- ↔ **origem:** o efeito SERS ocorre devido á intensificação do campo elétrico proveniente da interação entre os fótons incidente e a superfície de plasma dos metais;
- ↔ **rugosidade da superfície:** a rugosidade varia entre 10–100nm;
- ↔ **dependência com a distância:** as espécies têm de estar à alguns nm da superfície, já que o campo elétrico decai com a distância.

2.2.3 Aplicações do Efeito SERS

O efeito SERS renovou o interesse na técnica de espectroscopia Raman. Com sua versatilidade abriu um leque de aplicações. Assim, segue abaixo algumas exemplos interessantes do uso da técnica SERS.

↔ **Sistemas biológicos:**

As primeiras pesquisas ao utilizar SERS em biosistemas começaram nos anos 80, como o trabalho de Séquaris e Kogling [55]. Nesse trabalho foi investigada interação entre *cis* – $Pt(NH_3)_2Cl_2$ e $[Pt - (dien)Cl]Cl$ com DNA em eletrodo de prata, com o intuito de compreender a estereoquímica da ligação entre esses complexos e o DNA.

A técnica SERS tornou-se um biossensor de alta qualidade. Trabalhos recentes reafirmam essa especial peculiariedade do efeito SERS:

No trabalho de Sukhwinder Kaur *et al.* [56] foi enfatizado o uso da técnica SERS no diagnóstico do câncer por meio de sondas ativas-SERS conjugadas com anticorpo específico. Na mesma linha de pesquisa no desenvolvimento de imunomarcadores, também ativos no SERS, pode-se observar os trabalhos de Max Schütz *et al* [57] e de Chunyuan Song [58].

No *review* publicado por X.-M. Qian and S. M. Nie [59] pode ser observado as possíveis aplicações do SM-SERS (*single molecule*) na detecção molecular *in vivo*

por meio da imagem por espectroscopia Raman.

Ximei Qian *et al.* [60] descreveram sondas biocompatíveis baseadas em nanopartículas de ouro para marcação de tumor. Além disso, proporam aperfeiçoamentos ópticos para se obter o diagnóstico *in vivo* por meio do SERS, o resultado pode ser observado na Figura 2.7.

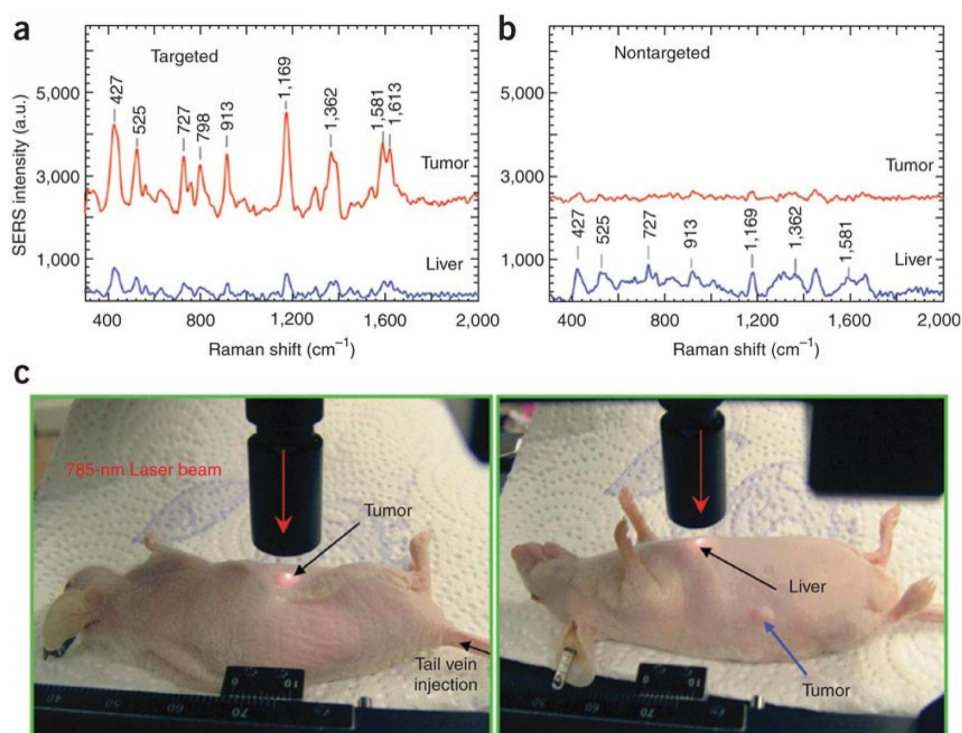


Figura 2.7: (a, b) são mostrados os espectros SERS obtidos na região do tumor e na região anatômica do fígado após aplicação de nanopartículas biomarcadoras (targeted) e sem aplicação dos biomarcadores (nontargeted), respectivamente. (c) As fotografias mostram o feixe de laser com foco no local das medidas: tumor e fígado (liver). Figura adaptada da referência [60].

Katherine [61] analisou células vivas via a técnica SERS, de modo que foi possível obter informações sobre sua estrutura interna e sobre processos dinâmicos que ocorrem dentro da célula, em particular mudanças associadas à introdução de nanopartículas metálicas. Janina Kneipp *et al.* [62] também estudaram células vivas por meio da técnica SERS, neste trabalho foi possível investigar o processo de

incubação de nanopartículas magnéticas de ouro pelos macrófagos.

↔ **Análise de Materiais - Molécula:**

O efeito SERS foi descoberto ao estudar moléculas de piridina adsorvidas numa superfície de eletrodo de prata. Desde então o estudo de diferentes moléculas adsorvidas nos mais diversos substratos SERS tem sido publicado devido à sensibilidade dessa técnica.

Castro *et al.* [63] publicou um trabalho no qual a técnica SERS foi aplicada para três diferentes ácidos hidroxibenzóicos adsorvidos em colóides de prata diluído em H_2O e em D_2O . Assim, os resultados observados foram analisados tomando-se por base os modelos que descrevem o efeito SERS: tanto o químico quanto o eletromagnético.

Têm-se investigado as possíveis aplicações do SERS na detecção de substâncias tóxicas ao organismo e que se encontram em baixas concentrações. Como, por exemplo, corantes em comida, como estudado por Peica *et al.* [64] ou poluentes do meio ambiente como estudado por Haibin Tang [65]. Kwan Kim *et al.* [66] propõem um substrato SERS barato e de fácil preparação baseado em filme de prata como uma ferramenta na identificação de substâncias químicas e biológicas danosas ao homem.

Jacinto *et al.* [67] utilizaram SERS e voltametria cíclica para investigar fluidos magnéticos recobertos com diferentes surfactantes.

Há, ainda, outras aplicações, como no estudo da cinética e dos mecanismos de uma reação química, caracterização de filmes passivantes, estudo de moléculas isoladas, entre outros [68].

Francesca Casadio *et al.* [69] ressaltaram o uso do SERS na identificação de corantes em obras de arte antigas. Nesse trabalho é proposto um protocolo que permite analisar as obras, sem danificá-las, de forma rápida e eficaz. De modo que foi possível observar pigmentos usados desde o Egito antigo.

Capítulo 3

Procedimentos Experimentais

Fluidos magnéticos biocompatíveis foram estudados pela técnica SERS. Na implementação dessa técnica dois procedimentos experimentais foram adotados: sistema coloidal de prata e filme de prata por eletrodeposição. Na caracterização desses sistemas foram utilizados absorção UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão e varredura, TEM e SEM respectivamente.

Abaixo segue detalhes dos procedimentos experimentais.

3.1 Síntese de Fluidos Magnéticos

As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação conforme literatura [70]. Para obtenção das nanopartículas de magnetita soluções de cloreto de ferro II, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, e cloreto de ferro III, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, foram adicionadas à base hidróxido de amônio, NH_4OH . Imediatamente forma-se um precipitado preto de nanopartículas de magnetita, o qual é submetido à processos de lavagem e centrifugação para retirada do sobrenadante.

A maguemitita é obtida a partir da oxidação da magnetita. Para isso dois processos são utilizados: fluxo intenso de oxigênio ou pela adição de ácido nítrico,

HNO e nitrato de ferro III, $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, sob aquecimento. Após o término da reação de oxidação, as nanopartículas de maguemita são decantadas magneticamente para a remoção do sobrenadante e lavadas várias vezes.

Por fim, as nanopartículas são devidamente preparadas para a preparação do fluido magnético com o surfactante biocompatível desejado.

3.2 SERS

Para aquisição dos espectros SERS, utilizando colóide de prata como substrato, as medidas foram realizadas na configuração micro Raman usando como suporte um porta amostra de aço, cujo volume total é de $50\mu L$.

Já as medidas SERS com substratos baseados em filme de prata, a configuração empregada foi o macro Raman, utilizando lente cilíndrica para focar o laser cuja potência na amostra é de $0,1W/cm^2$.

Para a obtenção dos espectros Raman foi utilizado um espectrômetro triplo Jobin-Yvon modelo T64000, equipado com grades de 1800 linhas/mm e com uma CCD (Charged Couple Device) de 2048x512 pixels resfriada à nitrogênio líquido. Um laser de íon argônio sintonizado na linha 514,5 nm foi utilizado na excitação das moléculas em estudo. Todos os espectros foram obtidos à temperatura ambiente.

3.2.1 Sistema coloidal

O colóide de prata foi preparado pela redução do nitrato de prata $AgNO_3$ com o citrato de sódio, de acordo com trabalho de Lee-Meisel *et al.* [71]. Inicialmente toda a vidraria foi cuidadosamente lavada com HCl para evitar qualquer tipo de contaminação. Em seguida, 34mg de $AgNO_3$ foi adicionado, sob agitação, à 100ml de água destilada previamente aquecida até o ponto de ebulição. Imediatamente após acrescentar o nitrato de prata, 2,5ml da solução de citrato à 1% foi acrescentado

rapidamente. Essa solução ficou em aquecimento e agitação por 15 minutos, quando a solução passa a apresentar cor amarelada. Findado esse período, 150ml de água foram acrescentados e o aquecimento foi desligado. A solução permaneceu por mais 10 minutos sob agitação, para o completo resfriamento da solução. O colóide então foi armazenado em uma vidraria escura e sob refrigeração.

O pH da solução final é em média de 6,8.

3.2.2 Filme por eletrodeposição

Filmes de prata foram obtidos pela deposição de íons de prata em eletrodos também de prata por eletrodeposição. Inicialmente os eletrodos de prata foram cuidadosamente polidos e limpos e em seguida submersos no eletrólito, constituído de uma solução de nitrato de prata à $6 \times 10^{-4} M$. Para conseguir a deposição da prata, uma diferença de potencial de 3V foi aplicada entre os eletrodos, de modo que uma corrente média de $750 \mu A$ eram mantidos durante 60 minutos. Findado esse período os eletrodos negativos foram secos em fluxo de nitrogênio, para imediatamente serem utilizados como substrato.

3.3 Absorção UV-Vis

As medidas de absorção UV-Vis foram realizadas em um equipamento da Molecular Devices modelo Spectramax M2 utilizando uma cubeta de quartzo de 1cm de caminho óptico à temperatura ambiente.

3.4 MET e MEV

As medidas de microscopia foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia - Universidade de Brasília.

Para as micrografias foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) da JEOL modelo 1011, com 100KV de potência máxima. As imagens foram obtidas a partir de uma gota da amostra em estudo sob tela de cobre de 300 mesh, devidamente preparado com uma película de um polímero, Formvar.

As medidas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram obtidas em um equipamento também da JEOL JEM, modelo 840 A.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos durante o trabalho de doutorado serão apresentados neste capítulo. Inicialmente serão expostos o estudo da estabilidade dos substratos colóide e filme de prata, assim como, o efeito da intensificação do espalhamento Raman para ambos. Para isso, utilizou-se a violeta de genciana como molécula teste.

Em seguida são apresentados resultados dos estudos SERS dos sistemas nanopartículas magnéticas associadas com o fármaco anfotericina B e com anticorpo anti-CEA. Por fim, são apresentados dois estudos envolvendo o uso da técnica SERS na investigação de sistemas *in vivo*: (i) Uso do complexo nanopartícula/Anfotericina B (FMBL-AmB) no tratamento da infecção por *Pbmicose* em camundongos e (ii) Uso da técnica SERS no estudo das possíveis alterações químicas, em diferentes regiões do cérebro de camundongos, provocadas pela injeção do sistema NPs/albumina na corrente sanguínea do camundongo.

4.1 Estudo da estabilidade SERS de substratos a base de prata utilizando a violeta de genciana como molécula teste.

4.1.1 Introdução

Desde que o efeito SERS foi descoberto, a violeta de genciana (CV - crystal violet) tem sido amplamente utilizada, por vários grupos de pesquisa, como molécula teste para o desenvolvimento dos mais diversos tipos de substrato SERS. Liu *et al.* [72] verificaram a possibilidade da utilização do SERS como método de detecção e identificação de moléculas em tempo-real, para isso estudaram a violeta de genciana em baixíssimas concentrações adsorvidas em coloide de prata e como resultado verificaram que o limite de detecção de CV está na concentração de $10^{-4} ppb$. Lile He *et al.* [73] estudaram o efeito SERS produzidos por filme fractal de ouro para detectar e caracterizar traços de CV em solução, com o intuito de utilizar a técnica SERS na detecção de contaminantes em comida. Alexandre Merlen *et al.* [74] estudaram a violeta de genciana e outros corantes depositados em nanoestruturas de ouro fabricadas sobre dois tipos de substratos: pastilhas de silício e vidro. A intenção desse estudo estava na observação da importância do substrato no melhoramento da eficiência do efeito SERS. Henrique *et al.* [75] estudaram a adsorção da violeta de genciana sobre filme de prata, produzido pela deposição de coloide de prata sobre uma lâmina de vidro por *spin coating*. Utilizando a violeta como teste molecular, Maria Knauer *et al.* [76] estudaram a viabilidade de utilizar coloide de prata no estudo *in situ* de microorganismos por SERS. Samuel *et al.* [77] utilizaram a violeta de genciana com diferentes composições isotópicas (CV - d_0 e CV - d_{12}) para estabelecer um método estatístico no SMSERS - SERS de uma única molécula.

A violeta de genciana é um corante trifenilmetano utilizado como agente quimioprolático, eficiente em tratamento de infecções provocadas por fungos e parasitas [72]. A estrutura química da violeta de genciana é mostrada na Fig. 4.1.

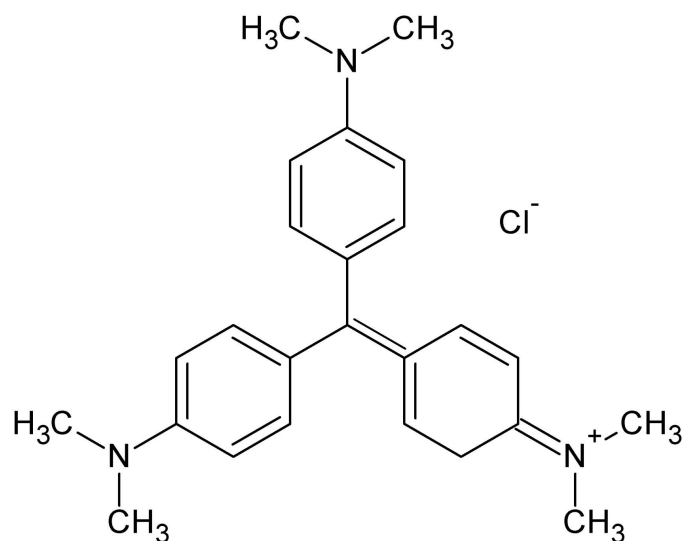


Figura 4.1: *Estrutura molecular da violeta de genciana.*

É bem conhecido na literatura que a eficiência e a reprodutibilidade dos resultados obtidos pela técnica SERS depende fortemente das propriedades do substrato. A base para a produção de um substrato SERS ativo eficaz é a fabricação de uma superfície metálica rugosa, o qual pode ser obtida das mais diferentes maneiras [78–83].

Assim, com o objetivo de utilizar a técnica SERS no estudo de sistemas nanoestruturados biologicamente ativos, verificou-se inicialmente a eficiência dos substratos SERS utilizados neste trabalho de doutorado: coloides de prata, produzido pela redução do nitrato de prata, e filmes de prata, produzidos pelo método de eletrólise. Dessa forma, esta seção tem por finalidade estudar os substratos SERS utilizando a violeta de genciana como molécula teste, conforme os trabalhos anteri-

ormente descritos.

4.1.2 Metodologia

Preparação dos Substratos

a) Coloide de Prata

O coloide de prata utilizado neste trabalho foi sintetizado, por redução do $AgNO_3$ na presença de $Na_3C_6H_5O_7$, como descrito na seção 3.2.1. Para a obtenção do espectro SERS, a violeta de genciana diluída em água em diferentes proporções, foi misturada ao coloide de prata. Este foi analisado por 60 dias, durante os quais foi mantido em geladeira e ao abrigo da luz. Durante este período foram realizadas medidas de espectroscopia Raman, absorção UV-Vis e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

b) Filme de Prata

Filmes nanoestruturados de prata foram preparados pela deposição de nanopartículas de prata sob substrato de prata, pelo método de eletrólise como descrito na seção 3.2.2. Para a obtenção do espectro SERS, a violeta de genciana foi diluída em água em diferentes concentrações e depositada sobre o filme de prata, que em seguida foi seco com fluxo de nitrogênio. Nos filmes de prata, foram realizadas medidas de espectroscopia Raman e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

4.1.3 Resultados e discussão

O espectro de absorção da violeta de genciana é apresentado na Figura 4.2. Observa-se neste espectro a superposição de duas bandas com máximos em torno de

549 e 588 nm. É também mostrado na Figura 4.2 o comprimento de onda da linha do laser utilizada para obtenção dos espectros SERS (514,5 nm). Como pode ser observado, a energia de excitação utilizada no experimento, encontra-se dentro da banda de absorção do corante, ou seja, dentro da condição ressonante para a violeta de genciana. Portanto, é correto afirmar que tem-se, neste caso, o efeito SERRS (Espalhamento Raman Ressonante Intensificado por Superfície).

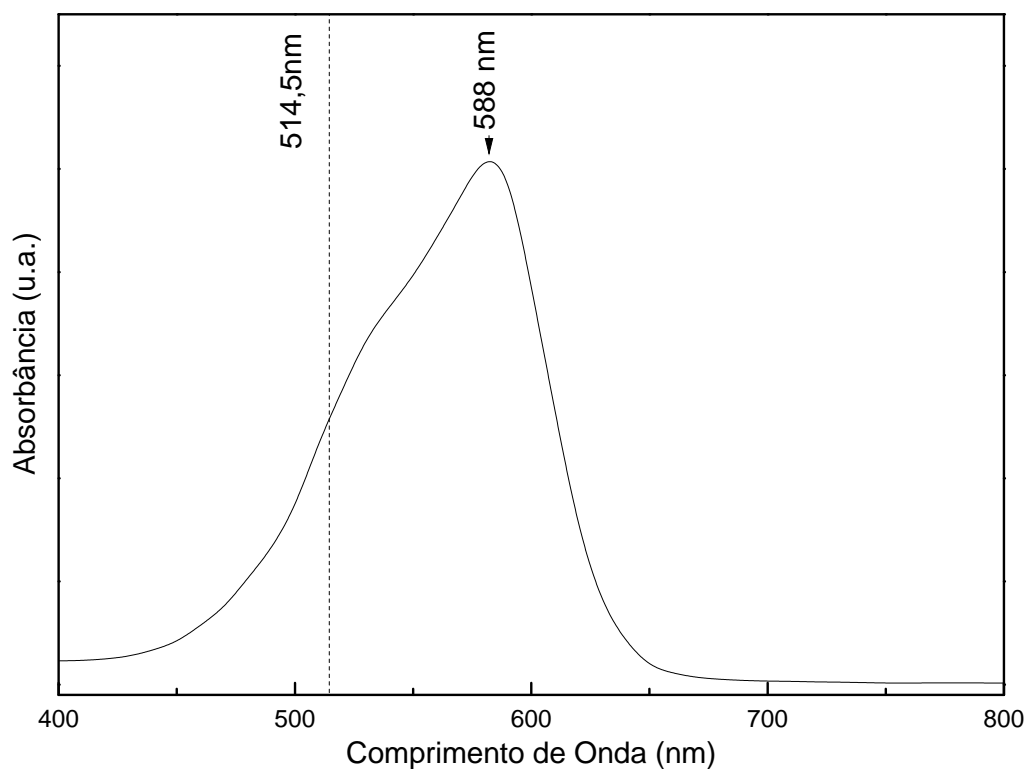


Figura 4.2: Absorção UV-Vis da violeta de genciana.

Com o objetivo de estudar a estabilidade do colóide de prata com o tempo (idade), espectros de absorção UV-Vis foram realizados nos tempos de 0, 7, 15, 21, 30 e 60 dias. Foi verificado que nos primeiros 21 dias, a energia de absorção, centrada torno 419 nm, praticamente não variou. Contudo, como mostrado na Figura 4.3,

após este período verifica-se um *red shift* na energia de absorção do colóide de prata. A estabilidade do colóide nos primeiros 21 dias, também pôde ser confirmada por SERS, onde não se verificou qualquer alteração nos espectros no período de 21 dias. Knauer *et al.* [76] ao estudarem sistema similar, também concluíram que o colóide de prata permanece estável neste período. A variação da energia de absorção após o período de 30 dias é esperada, uma vez que neste período vários fenômenos envolvendo a estabilidade do colóide são possíveis. Como por exemplo, a variação do tamanho das nanopartículas por coalescência ou agregação [84], adsorção de moléculas na superfície das nanopartículas [85], a dissolução das nanopartículas devido ao meio carreador [86] etc.

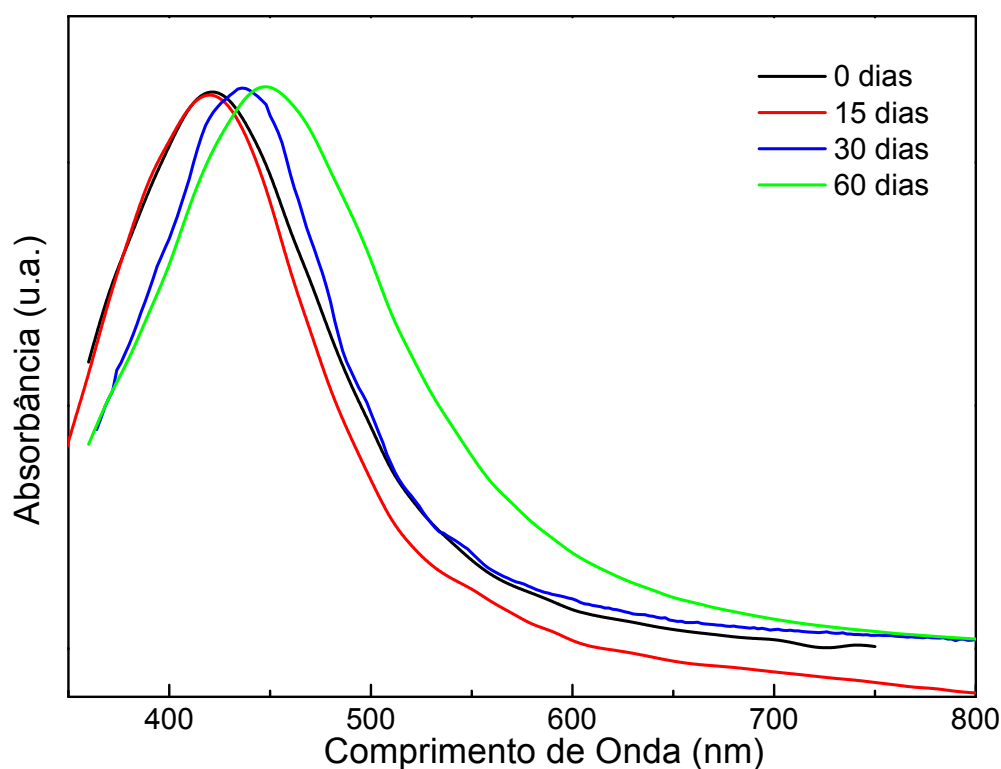


Figura 4.3: Absorção UV-Vis do colóide de prata com idades de 0, 15, 30 e 60 dias.

Os resultados de microscopia eletrônica de transmissão sugerem que é justamente a dissolução das nanopartículas a responsável pela variação da energia de absorção aqui observada. Na Figura 4.4 verificam-se as micrografias das nanopartículas de prata, provenientes do coloide, e seus respectivos histogramas, obtidos nas idades de 0 e 60 dias. Observa-se que durante o período analisado, o diâmetro médio das nanopartículas de prata variaram de 24.9 nm (0 dias) para 7.6 nm (60 dias).

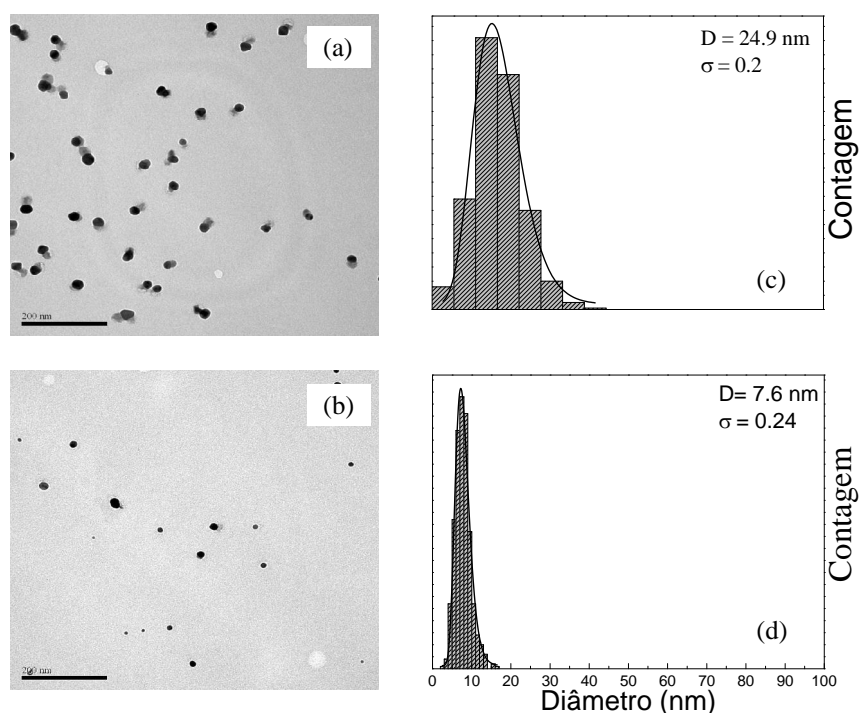


Figura 4.4: Micrografias das nanopartículas de prata com idades de 0 (a) e 60 (b) dias e seu respectivos histogramas (c) e (d)

A estabilidade do coloide observada nos primeiros 30 dias após a síntese provavelmente está relacionada com a presença da camada de citrato em torno das nanopartículas [87]. O espectro Raman do coloide de prata puro (com idade de 0 dia) é mostrado na Figura 4.5. E como também observado em outros trabalhos na

literatura [87,88], baseados na síntese de colóide de prata pelo método de Lee e Meisel [71], são observados no espectro as bandas vibracionais associadas ao citrato de sódio. A presença dessas bandas está associada à formação de uma camada de citrato em torno das nanopartículas de prata durante o processo de redução do $AgNO_3$ na presença do $Na_3C_6H_5O_7$. No espectro (Figura 4.5) podem ser identificados os modos $\nu(Ag-COO^-)$ em 245 cm^{-1} , $\nu(CCCC-O)$ em 836 cm^{-1} , $\nu(C-COO^-)$ em 900 , 930 e 956 cm^{-1} , $\delta(COO^-)$ em 1277 e 1370 cm^{-1} , $\nu_s(COO^-)$ e $\nu_{as}(COO^-)$ em 1391 e 1544 cm^{-1} . Também podem ser observadas as bandas da água em 1650 e em 1630 cm^{-1} e do modo $\nu(C=O)$ em 1707 cm^{-1} . A banda mais intensa, observada em 1391 cm^{-1} , indica que o citrato forma quelatos bidentados na superfície das nanopartículas de prata, conforme observado por Siiman *et al.* [89].

É de conhecimento na literatura que tanto a absorção quanto o espalhamento da luz em sistemas coloidais são modificados pelas alterações nas características do colóide, como, por exemplo, a forma ou a agregação das partículas. No trabalho de Jin Zang *et al.* [90] foi mostrado que a energia de absorção para nanopartículas na forma de elipsóides desloca-se para menor energia, quando comparadas com nanopartículas esféricas. A agregação, por outro lado, induz a formação de ombros nos espectros de absorção [91]. Como a agregação de nanopartículas em um colóide pode ser induzida pela simples adição de um aditivo [71], é mostrado na Figura 4.6 os espectros da absorção do colóide puro (a), após adição de solução de NaCl à 0.1 M , na proporção 1:1 (b) e, após a adição da solução de violeta de genciana à 1 ppm , na proporção 1:1:1, (c). Verifica-se que quando o NaCl é adicionado ao colóide de prata (Figura 4.6 (b)), há o surgimento de uma nova banda de absorção e o deslocamento da banda pré-existente. Esse comportamento é atribuído à absorção ressonante da superfície de plasma das partículas de prata agregadas ou coalescidas [84]. No caso do espectro na Figura 4.6 (c), verifica-se a presença das bandas de absorção da violeta de genciana em 530 nm e 578 nm e do colóide de

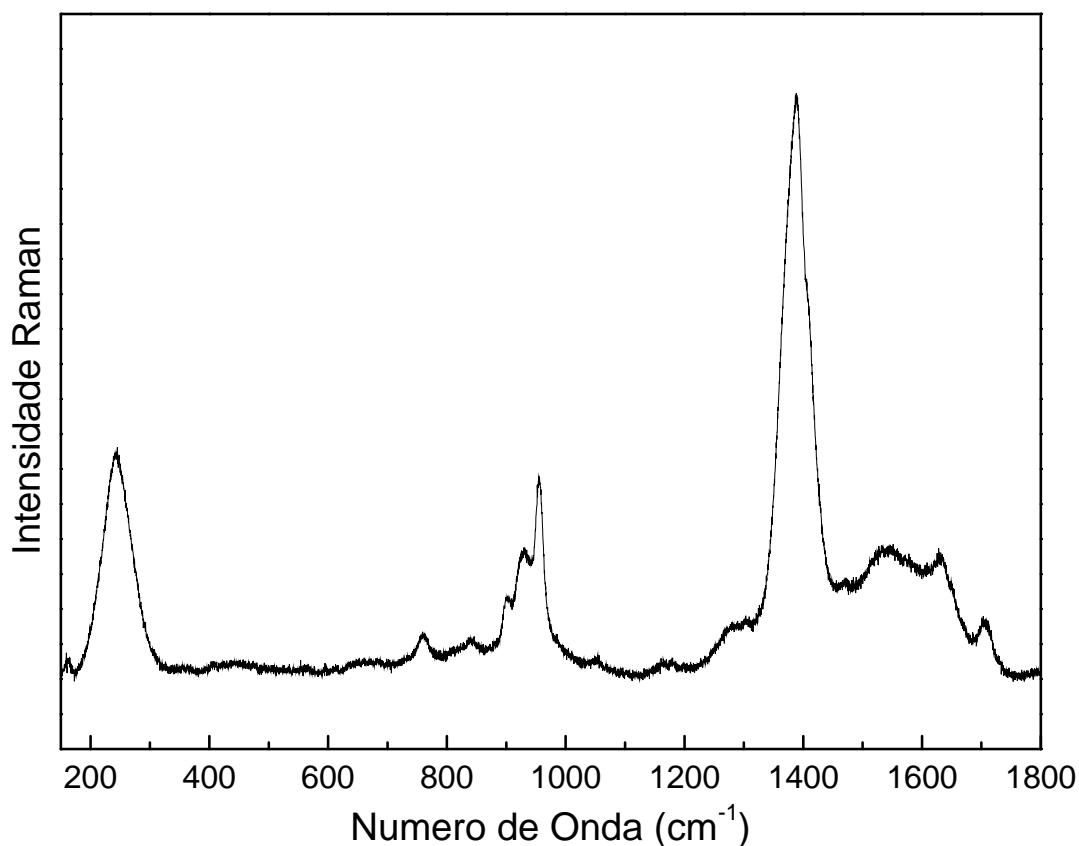


Figura 4.5: *Espectro Raman do coloide de prata.*

prata, com máximo em 421 nm. O *red shift* no máximo de absorção, observado neste espectro com relação ao espectro na Figura 4.6 (a) pode ser explicado pela interação química entre o adsorbato e as partículas coloidais de prata, que promovem transições eletrônicas devido à transferência de carga [85] ou adsorção da violeta de genciana nas nanopartículas de prata. Uma vez que a violeta de genciana é um composto catiônico e pode facilmente se ligar na superfície negativamente carregada da prata.

Com o objetivo de determinar a magnitude da intensificação do sinal Raman da violeta de genciana na condição SERRS, foi obtido inicialmente o espectro Raman ressonante (usando a linha 514 nm) de uma solução à 1 ppm da violeta de genciana.

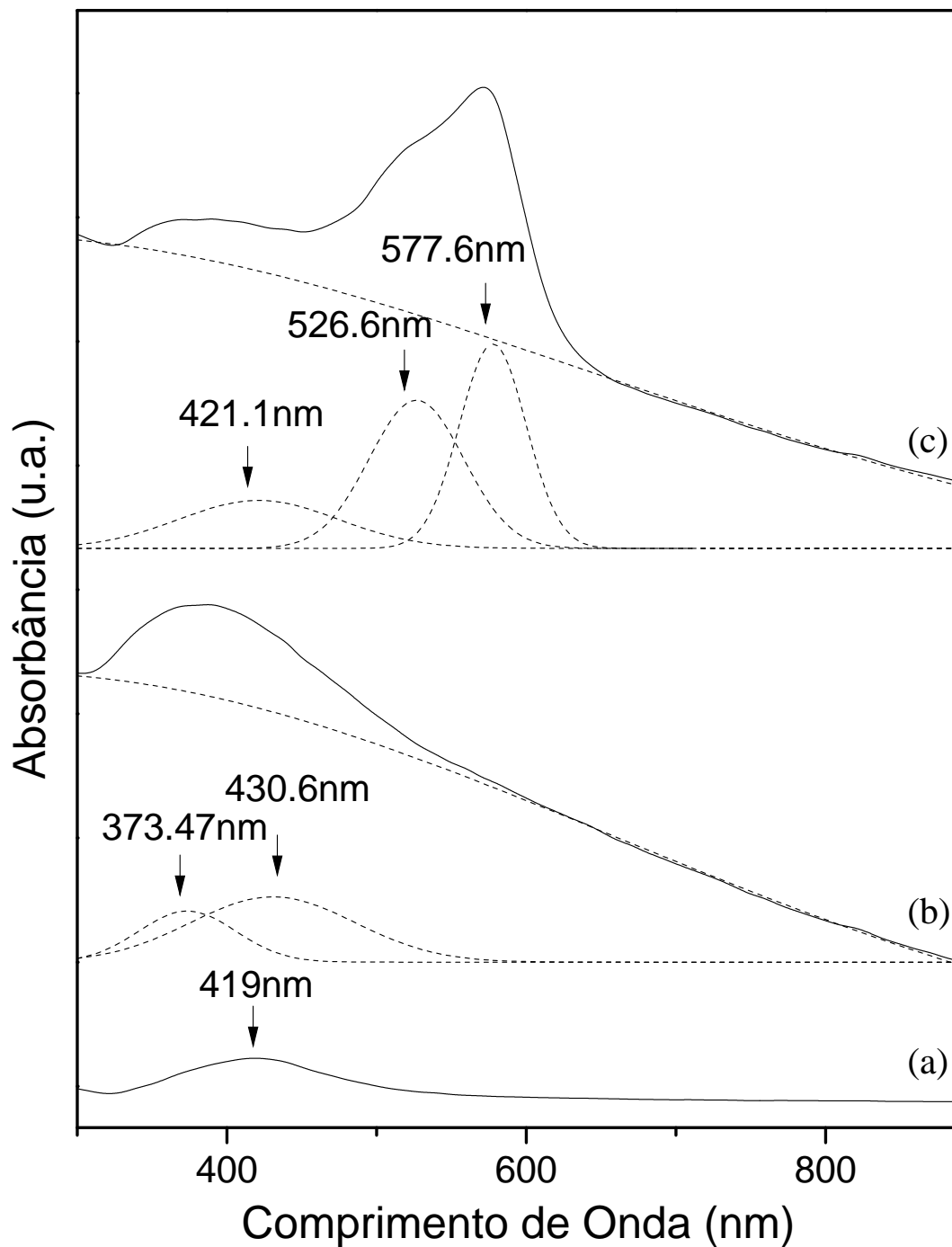


Figura 4.6: Absorção UV-Vis do colóide de prata puro (a) após adição do NaCl, na proporção 1:1 (b) e após a adição de violeta genciana na proporção 1:1:1 (c).

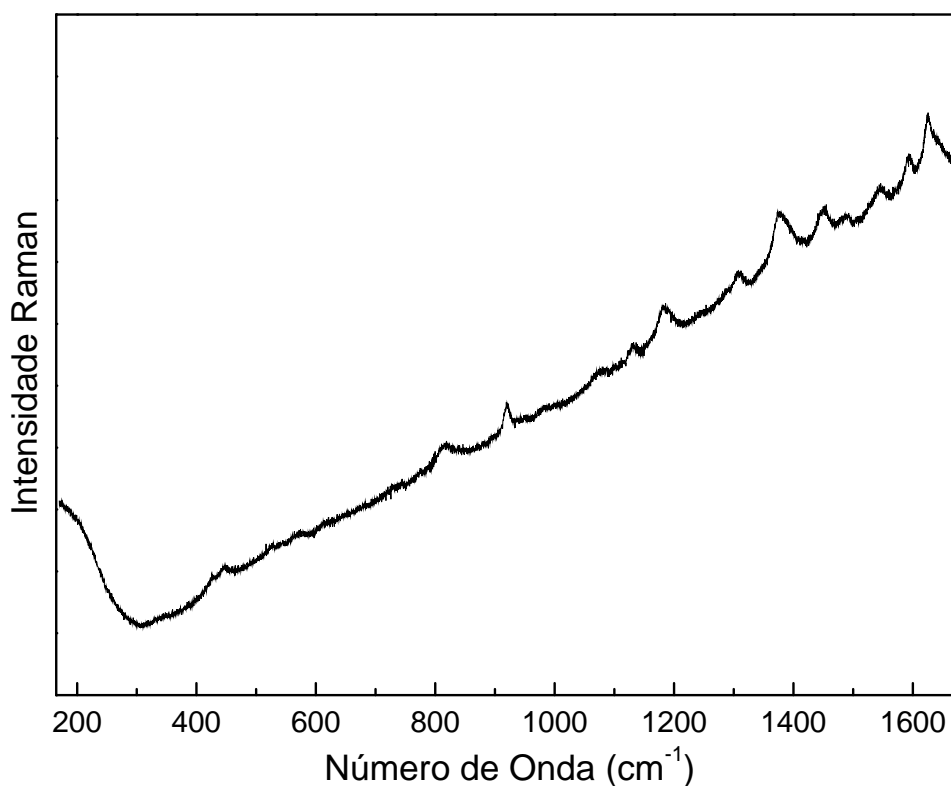


Figura 4.7: *Espectro Raman ressonante da violeta de genciana à 1ppm.*

Como pode ser observado na Figura 4.7, espectro Raman ressonante da violeta de genciana, sobreposta a uma forte fluorescência é possível identificar as bandas características do corante, que só foram observadas devido ao espalhamento Raman ressonante, que intensifica o sinal Raman em até 10^5 vezes [28]. Um resumo destes modos vibracionais pode ser encontrado na Tabela 4.1. Espectros SERRS da solução de violeta de genciana à 1 ppm, diluída na proporção 1:1 em coloide de prata, com e sem a adição de NaCl 0.1 M, podem ser encontrados na Figura 4.8 (a) e (b), respectivamente. Note, que os modos associados ao citrato presente na superfície das nanopartículas de prata, conforme observado na Figura 4.5, não são observados nos espectros SERS da violeta de genciana. A ausência dos modos do citrato pode ser explicada pela substituição da camada de citrato, formada no

processo de síntese, pela violeta de genciana e/ou pelo Cl^- , que por sua vez, ativa os sítios SERS, tornando mais eficiente a adsorção da molécula em estudo. É verificado na Figura 4.8 somente a presença de modos vibracionais associados à violeta de genciana e modos de estiramento provenientes da prata ligada a ametais, $Ag - O$ e $Ag - Cl$. Além do mais, é verificado que a presença do NaCl, intensifica o sinal Raman em até 4 vezes, quando comparado com o espectro SERRS obtido com o coloide puro (como referência foi tomado o pico em 1594 cm^{-1}). Essa intensificação pode ser entendida levando-se em conta a formação de agregados de nanopartículas de prata, promovida pelo NaCl, os quais geram regiões denominadas *hot spot*. Nessas regiões há uma grande intensificação do campo elétrico local, que por sua vez, será responsável pela intensificação do espalhamento Raman.

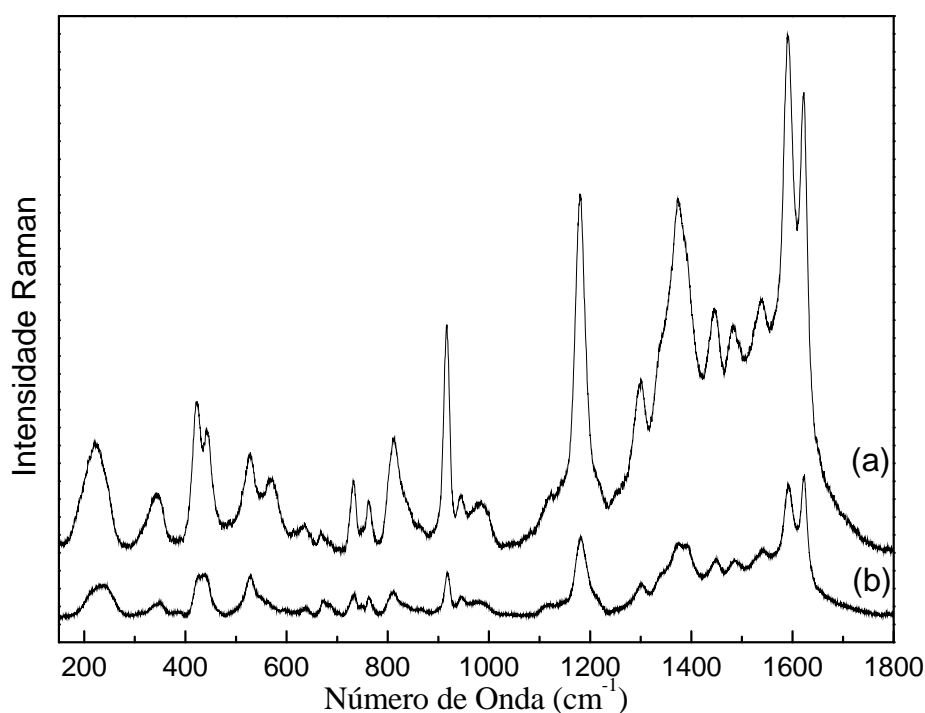


Figura 4.8: Espectro SERRS da violeta de genciana à 1ppm no coloide de prata (a) com e (b) sem NaCl.

Tabela 4.1: *Posição dos modos vibracionais obtidos a partir dos espectros Raman Convencional e SERS para a violeta de Genciana.*

Amostras					Tentativa de atribuições
Raman (cm^{-1})		SERS (cm^{-1})			
Solução [92]	CV (1ppm)	Coloide [92]	Coloide	Filme	
		224	225	235	respiração-ligação central
334	326	344	342		δ $Ph - C^+ - Ph(\perp)$
426	425	432	421	418	$\delta(\perp)$ $Ph - C^+ - Ph(\perp)$
	446		442	440	
	476				
532	527	536	526	527	vibração da estrutura do anel
579	568	572	571	570	vibração da estrutura do anel
616	613	621	634		vibração da estrutura do anel
	651		673	689	
729	731	738	733	732	δ (C-H) do anel (\perp)
770		773	762	762	δ (C-H) do anel (\perp)
810	815	817	811	820	δ (C-H) do anel (\perp)
918	920	922	916	917	vibração da estrutura do anel
942		953	948	949	vibração da estrutura do anel
982	982	986	981	995	vibração da estrutura do anel
	1075			1056	
1142	1130	1142	1123	1130	δ (C-H) do anel (\parallel)
1182	1184	1188	1180	1179	δ (C-H) do anel (\parallel)
1192					δ (C-H) do anel (\parallel)
	1288		1297	1258	C-H rocking
1306	1307	1305	1339	1299	ν (C-C) do anel
1377	1375	1364	1373	1377	ν N-fenil
1390	1391	1395	1394	1408	ν N-fenil
1454	1449	1446	1445	1444	ν (C-C) do anel
1489	1486	1480	1483	1487	deformação do anel
1542	1543	1547	1537	1539	ν (C-C) do anel
1550					ν (C-C) do anel
1594	1592	1592	1591	1591	ν (C-C) do anel
1624	1625	1629	1622	1621	ν (C-C) do anel
	1639				

Ph-fenil, ν *stretching* e δ *bending*, fora do plano \perp e no plano \parallel .

Para verificar o limite de detecção do sistema coloidal de prata, medidas SERRS da violeta de genciana em diferentes concentrações foram realizadas (ver Figura 4.9). Para isso, uma mistura 1:1 da solução de colóide de prata e NaCl à 0.1 M foram preparadas e, em seguida, soluções de violeta de genciana com diferentes concentrações foram acrescentadas. Como resultado foram obtidas amostras de CV com concentrações finais variando de 0.5 à 0.00001 ppm. Como pode ser observado na Figura 4.9 o limite de detecção encontrado para o sistema coloidal foi a concentração de 0.001 ppm. Na inserção da Figura 4.9 é mostrado o fator de intensificação (FI) SERRS observado para as diferentes concentrações, calculados pela razão $FI = \frac{I_{SERS}C_{RR}}{I_{RR}C_{SERS}}$ [73, 84], onde I_{SERS} e C_{SERS} são a intensidade do pico e a concentração do material em estudo e I_{RR} e C_{RR} são a intensidade e concentração medidos por Raman Ressonante. Foi verificado que a intensificação máxima obtida pelo efeito SERS promovido pelo colóide de prata foi da ordem de 10^3 . No cálculo foi utilizando o pico centrado em 1591 cm^{-1} como referência. As pequenas variações nas intensidades relativas em função da concentração de CV, observado na Figura 4.9, podem ser explicadas de acordo com o trabalho de Henrique *et al.* [75]. Neste trabalho, ao estudar a CV em filmes de prata, os autores relataram que enquanto os espectros em concentrações maiores eram semelhantes aos espectros do Raman Ressonante, os obtidos em baixa concentração de CV apresentavam características distintas. De acordo com esse trabalho, as modificações espectrais relacionam-se principalmente às moléculas de violeta de genciana adsorvidas diretamente na superfície da prata.

Conhecida as características do colóide de prata, passa-se a seguir uma exposição dos resultados alcançados utilizando-se filmes de prata, formados pela eletrodeposição de partículas de prata sobre substrato também de prata. Inicialmente foram preparados substratos SERS eletrodepositados com diferentes tensões (3, 5 e 10 V), aplicadas por uma hora, e diferentes tempo de deposição (20, 40 e

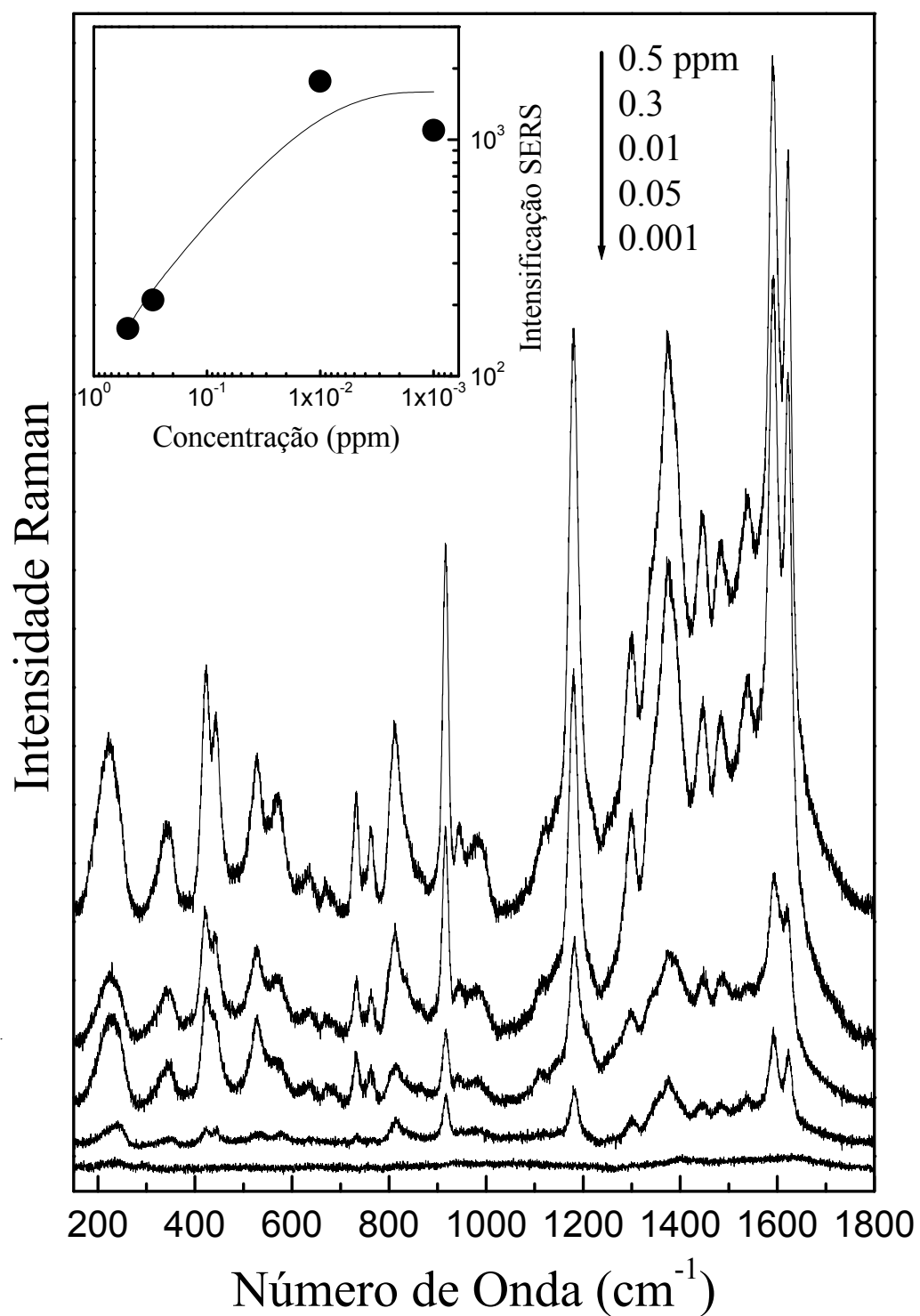


Figura 4.9: Espectros SERRS da violeta de genciana em diferentes concentrações no coloide de prata com NaCl. No inset é mostrado o fator de intensificação SERS observado.

60 *min*), mantendo-se a tensão constante de 3 V. Os dados de intensificação SERS revelaram que os melhores resultados foram obtidos utilizando-se os filmes de prata preparados com tensão aplicada de 3 Volts e tempo de deposição de 60 minutos. Outro fator relevante, a ser relatado, é sobre a estabilidade dos filmes de prata após sua preparação. Foi verificado que o efeito SERS praticamente desaparece após 24 horas. Portanto, todos espectros obtidos ao longo deste trabalho foram realizados logo após a produção dos filmes de prata, sendo que estes foram preparados na condição de tensão de 3 V por 60 minutos.

O espectro Raman do substrato de prata revelaram a presença de bandas localizados em torno de 240, 1050 e 1380 e 1600 cm^{-1} . A banda em 240 cm^{-1} é atribuída a ligações *Ag - N*. As demais bandas estão relacionadas à presença de nitratos na superfície do filme [28]. É importante relatar que a intensidade relativa destas bandas são cerca de 10^3 vezes menos intensa que o sinal SERS da violeta de genciana à 1 ppm.

Na Figura 4.10 são apresentadas imagens de microscopia eletrônica de varredura de dois filme, crescidos em ocasiões distintas. Nas micrografias são mostradas as topologias dos filmes de prata, os quais evidenciam a formação de estruturas dendríticas. No processo de formação dos dendríticos criam-se aberturas espaçadas entre si por uma distância média de 100 *nm*, as quais proporcionam a formação dos *hot spots* necessários para obtenção do efeito eletromagnético intensificado, característico do efeito SERS [93].

Para se verificar o efeito de intensificação SERS nos filmes de prata, espectros de violeta de genciana com concentrações variando de 0.5 à 0.00001 ppm foram obtidos. Para isso 20 μL da solução de violeta genciana foi depositado sobre o filme de prata e em seguida seco sob fluxo de nitrogênio. Na Figura 4.11 são mostrados os espectros obtidos. Verifica-se que foi possível identificar a presença de moléculas de violeta de genciana até a concentração 0.00001 ppm. Neste caso o fator máximo de

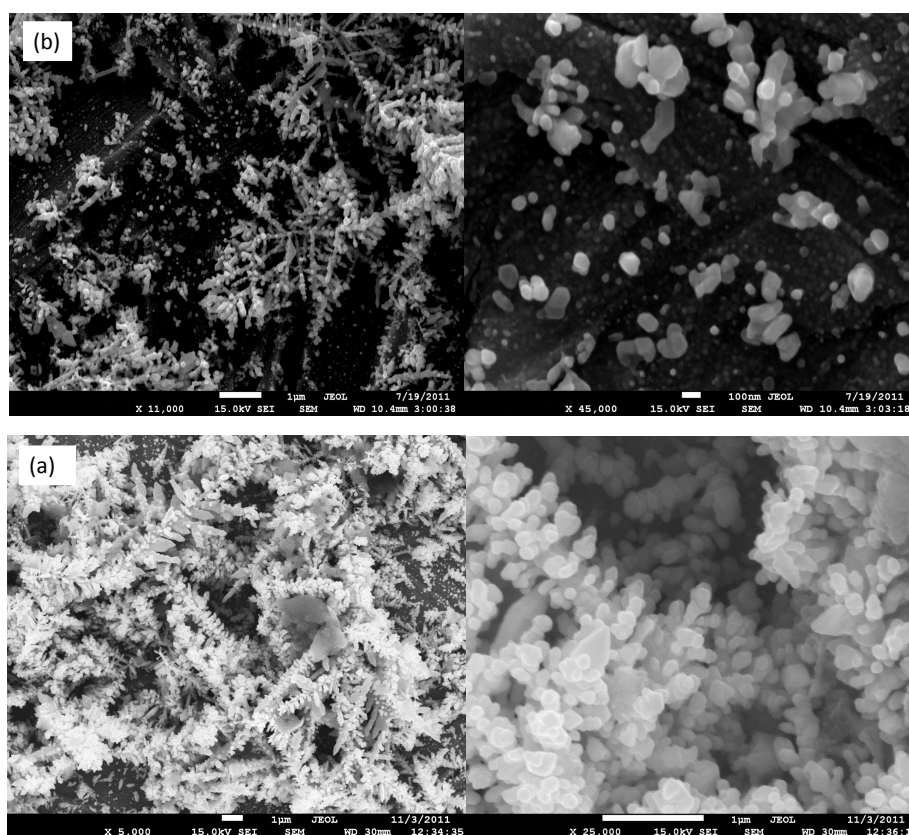


Figura 4.10: Imagem de filmes de prata obtido por MEV, para sínteses distintas (a) e (b).

intensificação foi de 10^7 vezes, calculado como descrito acima. A maior intensificação obtida pelo filme de prata quando comparada com sistemas coloidais também foi observado em outros trabalhos na literatura, como referenciados em [74,94]. Note na Figura 4.11 que mesmo na concentração de 0.00001 ppm não foi observado qualquer evidência da presença de nitratos provenientes da preparação do substrato.

Assim, como observado nos espectros SERRS obtidos com o coloide de prata, os espectros SERRS realizados no filme de prata apresentaram pequenas variações na intensidade relativa de alguns modos vibracionais da violeta de genciana em baixas concentrações. A variação na intensidade relativa das bandas em 418, 440,

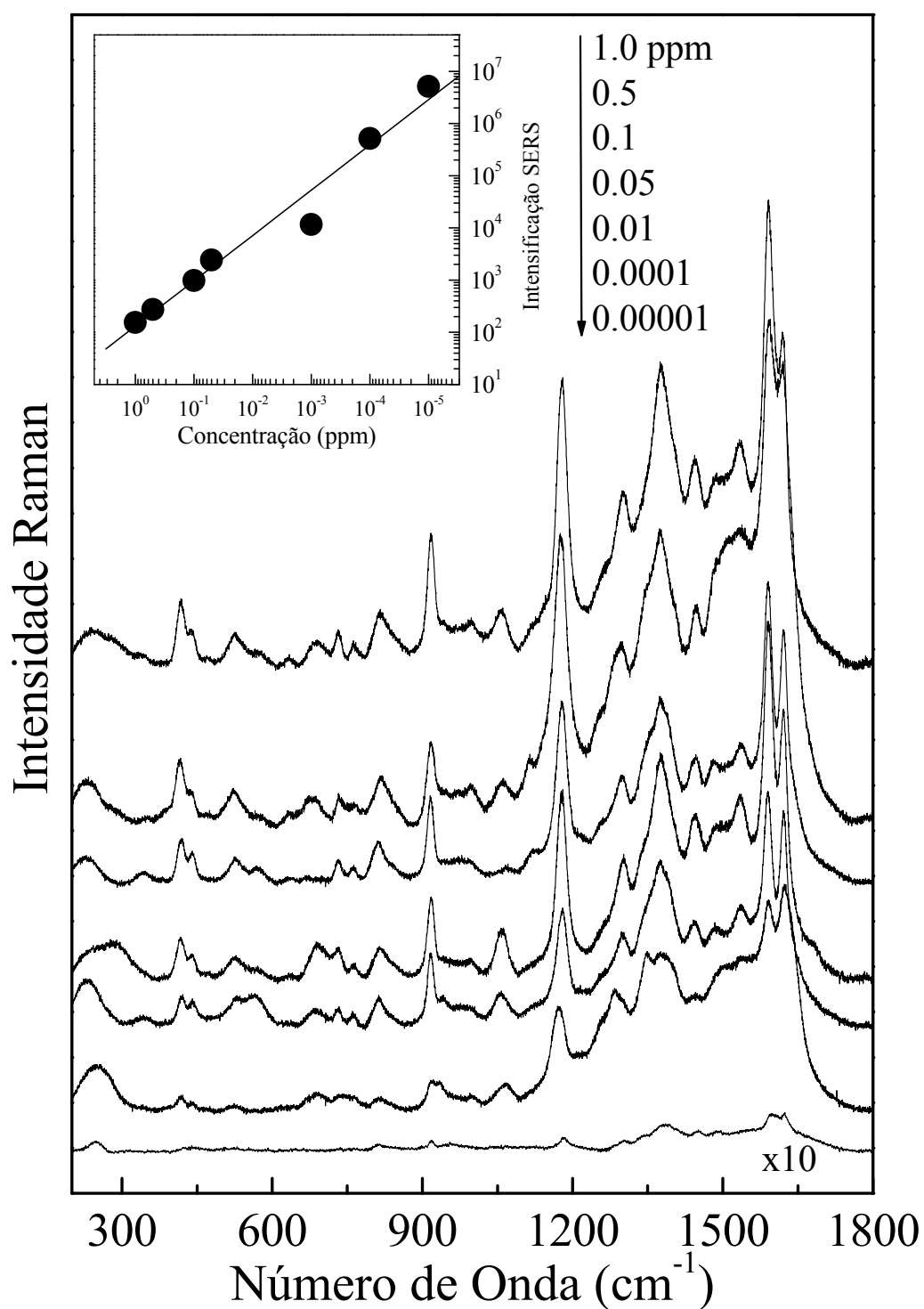


Figura 4.11: Espectros SERRS da violeta de genciana em diferentes concentrações depositado sobre filme de prata. No inset é mostrado o fator de intensificação SERS observado.

1591 e 1622 cm^{-1} , pode ser explicada pela perda de simetria da molécula de CV quando adsorvida sobre o filme de prata [94]. No trabalho de Andrzej [93] relata-se que apenas 0.01% das moléculas de violeta de genciana contribuem com o sinal SERS e que a observação de espectros intensos sugere que a violeta de genciana adsorve fortemente nos sítios ativos dos filmes de prata em estudo.

4.1.4 Conclusões

Foi apresentado nesta seção um estudo sobre a influência de diferentes substratos SERS nos espectros de intensificação do sinal Raman por superfície da molécula de violeta genciana. Foi encontrado que o substrato SERS a base de coloide de prata apresenta grande estabilidade nos primeiros 30 dias após sua síntese, apresentando intensificação máxima de até três ordens de grandeza. Ainda, foi verificado que mesmo 60 dias após sua produção o efeito de intensificação do sinal Raman permanece presente. Esta notável estabilidade do coloide de prata não foi verificado para o caso dos substrato SERS a base de filme de prata. Neste caso, os resultados mostraram que 24 horas após sua produção já não se verificava efeito SERS apreciável. Contudo, foi constatado que o fator de intensificação obtido para o filme de prata é da ordem de 10^7 vezes, portanto dez mil vezes mais intenso que o observado no coloide de prata.

4.2 Estudo SERRS do arranjo molecular da Anfotericina B adorvida em Nanopartículas de óxido de ferro précoberdas com bicamada de ácido láurico [95].

4.2.1 Introdução

A anfotericina B (AmB) é uma agente antifúngico poliênico que tem sido amplamente usado, por mais de cinco décadas, no tratamento clínico de infecções fúngicas sistêmicas [96, 97]. Contudo, o uso clínico do fármaco AmB é limitado, devido aos intensos efeitos tóxicos ao organismo [98]. Esses efeitos ocorrem devido à característica anfífilica da AmB, o que a torna pouco solúvel tanto em meios aquosos como orgânicos. Contudo essa característica também é responsável pela sua fácil interação com as membranas das células, fato este que a torna um remédio antifúngico. Após atravessar a parede celular e entrar na membrana, as moléculas de AmB agregam e formam um canal transmembrana, neste a cabeça hidrofílica da molécula AmB aponta para a parte interior do canal, enquanto o domínio hidrofóbico aponta para os lipídios da membrana celular. A formação desses canais levam ao vazamento dos cátions das células, que, eventualmente, levam a sua morte. Infelizmente os vários efeitos colaterais e a baixa solubilidade da AmB limitam a sua utilização, o que explica o grande número de estudos com o objetivo de aumentar sua aplicação para fins terapêuticos. Uma das metas mais ambiciosas nas pesquisas atuais é o desenvolvimento de sistemas de administração orientada de drogas (*drug delivery system*) na cura, por exemplo, de doenças causadas por fungos. Nesse sistema seria possível um tratamento localmente eficiente utilizando menor dose do fármaco, o que levaria à redução dos efeitos tóxicos.

Um caminho promissor para o desenvolvimento de sistemas para admi-

nistração orientada de drogas é baseado na associação do fármaco com materiais magnéticos nanoparticulados [99]. Esses sistemas complexos permitem, pela aplicação de um gradiente de campo magnético, concentrar o fármaco no local desejado e controlar a liberação da droga. Estudos anteriores mostraram que partículas com diâmetros na escala nanométrica funcionalizadas com ácido dimercaptosuccínio (DMSA) tendem a se acumular nos pulmões dos camundongos [100]. Assim, a associação de AmB com nanopartículas magnéticas funcionalizadas podem representar um excelente sistema no tratamento de formas crônicas de doenças provocadas por fungos, como por exemplo, a *paracoccidiodomicose*, que afeta inicialmente os pulmões [101]. Contudo, uma vez que a organização espacial da AmB é essencial para a formação dos canais na membrana celular, o modo como essa molécula estiver adsorvida na superfície das nanopartículas é essencial no desempenho terapêutico desses sistemas de entrega de drogas. Nesse contexto, a técnica SERS surge como uma poderosa e inovadora ferramenta no estudo da conformação da AmB nesse sistema em particular.

Recentemente, o efeito SERS tem sido intensamente usado no estudo de diferentes sistemas biológicos [102–104], inclusive no estudo *in vivo* da interação da AmB com lipoproteínas [105]. Ademais, sabe-se que a presença das ligações duplas conjugadas (-C=C-C=C-) na AmB leva à intensificação por Raman Ressonante, uma vez que essa molécula apresenta bandas de absorção bem definidas na faixa de 300 a 450 nm, relacionada à transição $\pi - \pi^*$ da sua subunidade cromófora [106]. É sabido também, que a absorção eletrônica depende da configuração espacial da molécula AmB, uma vez que o padrão de absorção muda à medida que a droga aparece na forma monomérica ou agregada [107]. Independentemente disso, a estrutura eletrônica do esqueleto poliênico da AmB pode levar ao efeito Raman Ressonante, o que possibilita a observação dessa molécula em baixa concentração por exemplo em regiões com muitos lipídios [108, 109]. Assim, a associação do efeito SERS com o

efeito Raman Ressonante dá um adicional na intensificação do espalhamento Raman, efeito esse chamado SERRS - Espalhamento Raman Ressonante Intensificado por Superfície.

Portanto, esse estudo relata a aplicação com sucesso da técnica SERRS na investigação de moléculas AmB adsorvidas na superfície de nanopartículas de magnetita prefuncionalizadas com bicamada de ácido láurico.

4.2.2 Metodologia

Preparação das amostras e dos substratos

a) Amostras

Nanopartículas de Magnetita foram sintetizadas por coprecipitação, conforme descrito na seção 3.1. O ácido láurico (AL) foi acrescentado ao precipitado negro para a funcionalização da superfície das nanopartículas. A mistura foi aquecida à 90°C , sob agitação enquanto a água foi adicionada para ajustar o volume. As nanopartículas de magnetita surfactadas com bicamada de AL espontaneamente se mantêm em suspensão no meio aquoso, produzindo o fluido magnético denominado FMBL. Finalmente, a amostra foi purificada, autoclavada para esterilização à 121°C , por 20 *min*. A concentração de nanopartículas na amostra FMBL foi estimada em $2,3 \times 10^{15}$ partículas/mL. A associação da AmB sobre as nanopartículas de magnetita revestidas com LA foi realizada utilizando um protocolo semelhante ao descrito por Rutnakornpituk *et al.* [110], no qual a AmB dispersa em DMSO(Dimetilsulfóxido)/ H_2O foi adicionado à amostra FMBL sob agitação. As nanopartículas de magnetita contendo a AmB adsorvida foi separada do fármaco em suspensão (S-AmB), por separação magnética (ímã 4000G e palha de aço), e

novamente dispersas em água esterilizada, produzindo a suspensão magnética nomeada FMBL-AmB. A concentração de nanopartículas na amostra FMBL-AmB foi estimada em $2,6 \times 10^{15}$ partículas/mL. A quantidade de fármaco adsorvida nas nanopartículas foi indiretamente determinada pelo excesso da droga em suspensão (S-AmB), utilizando medidas de UV-Vis (Spectra Max M2) para a banda com máximo em 411 nm. Assim, a quantidade de AmB na amostra FMBL-AmB foi de 1,02 mg/mL. A composição química (quantidade total de íons) nas nanopartículas de óxido de ferro das amostras FMBL e FMBL-AmB foram determinados por espectrometria de absorção atômica, usando um modelo comercial Perkin-Elmer sistema 5000. O teor de ferro total encontrado foi de 1,52 e 1,74 mg/mL para as amostras FMBL e FMBL-AmB, respectivamente.

Essas amostras foram caracterizadas pelo *Zetasizer*, microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração de Raios-X (DRX) e espectroscopia no infra-vermelho (FT-IR) conforme segue a descrição. O diâmetro hidrodinâmico e potencial ζ das nanopartículas em suspensão das amostras FMBL e FMBL-AmB foram determinados utilizando o Instrumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). A distribuição de tamanho do caroço das nanopartículas foi obtida por microscopia eletrônica de transmissão usando o microscópio JEOL 1011. Os parâmetros para descrever o perfil de distribuição do tamanho das nanopartículas para ambas amostras (FMBL e FMBL-AMB) foram obtidos usando a abordagem padrão [111]. O espectro de DRX do pó, obtido a partir da secagem de amostras FMBL e FMBL-AmB foram obtidos na faixa de $10 - 80^\circ(2\theta)$, utilizando o equipamento da marca Shimadzu (SRD-6000) fonte de radiação $Cu - K\alpha$. Os dados foram refinados utilizando o software PowderX e os parâmetros da rede foram calculados usando o software Unitcell aplicado à posição do pico máximo de reflexão dentro da região aferida. O diâmetro médio de domínio nanocristalino foi determinada a partir do valor da largura à meia altura (FWHM) do pico mais forte de reflexão (311) usando

a equação Scherrer [112]. Medidas de FT-IR foram registrados em um espectrômetro modelo MB 100, com amostras dispersas em KBr (1%).

b) Preparação do Substrato SERS ativo.

Para obter os espectros SERS utilizou-se coloide de prata como substrato, sintetizado como descrito na Seção 3.2.1. Para o estudo SERRS, $25\mu L$ da amostra FMBL-AmB foi diluído em alíquotas de $25\mu L$ de coloide de prata. Espectros Raman foram registrados imediatamente, em um porta amostra de aço. Para efeito de comparação, $25\mu L$ da amostra FMBL-AmB foi diluído em $25\mu L$ de água destilada e espectros Raman Convencional foram registrados. Para investigar o efeito da interação entre as partículas de prata e a molécula livre de AmB (não adsorvida nas nanopartículas recobertas com LA), uma solução $0,7\text{ mol/L}$ de AmB em DMSO/água (02/03, relação de volume) foi preparado. Então, $25\mu L$ da solução AmB livre foi diluída em $25\mu L$ de prata coloidal, para o estudo SERRS. Além disso, $25\mu L$ da solução AmB livre foi diluído em $25\mu L$ de água destilada para a medidas de Raman Convencional. A luz espalhada foi coletada na configuração de *backscattering* e analisadas utilizando um espectrômetro triplo (Jobin Yvon Modelo T64000) equipado com um detector CCD. A linha utilizada para excitação molecular foi a linha $514,5\text{ nm}$ do laser de íon argônio com potência óptica na amostra de 20 mW .

4.2.3 Resultados e discussão

Nas Figuras 4.12 (a) e (b) observam-se as micrografias típicas das amostras FMBL e FMBL-AmB, assim como seus histogramas referentes à distribuição do tamanho das nanopartículas ((c) e (d)), respectivamente. Os histogramas foram ajustados com a função de distribuição log-normal, a qual revelou o diâmetro médio e a dispersão para as amostras estudadas, valor entre parênteses: FMBL $6,0\text{ nm}$ (0,36) e FMBL-AmB $7,1\text{ nm}$ (0,28). A diferença do diâmetro médio do núcleo

observado entre as amostras FMBL e FMBL-AmB é consistente com os valores obtidos para os seus respectivos raios hidrodinâmicos 77,7 e 84,8 nm. Valores estes estimados a partir das medições do espalhamento dinâmico da luz pelas partículas em suspensão. O aumento no raio hidrodinâmico observado para a amostra FMBL-AmB é devido à adsorção da AmB na bicamada de ácido láurico, que recobre as partículas suspensas na amostra FMBL. Resultados semelhantes foram relatados na literatura, como por exemplo o aumento do raio hidrodinâmico comparado ao obtido pela microscopia eletrônica de transmissão quando as nanopartículas estão revestidas por polímeros [113, 114]. Possivelmente, esses resultados ocorrem devido à agregação das partículas impulsionadas pela interação dipolar magnética entre as unidades suspensas, mesmo na ausência de qualquer campo magnético aplicado.

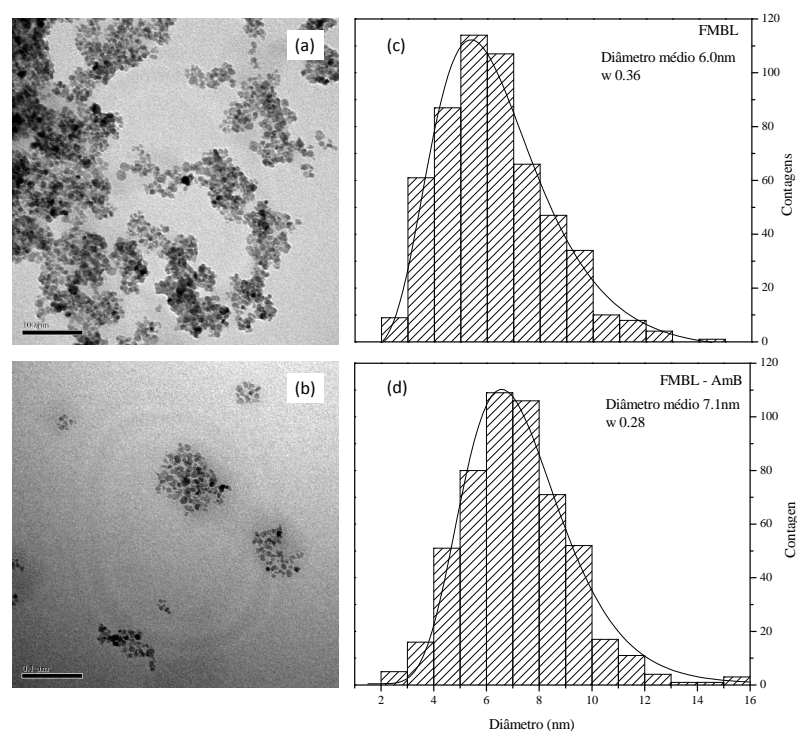


Figura 4.12: Micrografias das amostras (a) e (b) e os histogramas (c) e (d) correspondentes à FMBL e FMBL-AmB, respectivamente.

Os valores obtidos para o diâmetro médio por meio do MET são menores do que os valores estimados pela análise dos dados de DRX. Neste o tamanho das nanopartículas foi obtido a partir da largura à meia altura do pico de difração mais intensos, a reflexão (311), usando a equação de Debye-Scherrer. Verifica-se que o diâmetro médio dos nanocristalitos das partículas em suspensão para as amostras FMBL e FMBL-AmB são aproximadamente iguais à $9,1 \text{ nm}$. Além disso, os dados de DRX confirmam que as nanopartículas magnéticas apresentam uma única fase, possuem estruturas do tipo espinélio cúbico, característico para a magnetita.

A estabilidade coloidal das amostras foi avaliada com base na determinação do potencial ζ . Observa-se que o valor ζ médio para as partículas em suspensão da amostra FMBL é de cerca de $-15mV$, enquanto o valor médio encontrado para a amostra FMBL-AmB é aproximadamente $-22mV$. Esses resultados são consistentes com a hipótese de que a AmB contribui com o aumento da carga negativa líquida das unidades suspensas, provavelmente decorrentes do grande número de grupos hidroxilas introduzidas pela molécula de AmB, em comparação com a bicamada de ácido láurico.

Os espectros FT-IR das nanopartículas de óxido de ferro pura e recobertas com bicamada de ácido oleico (FMBL), assim como as conjugadas com a Anfotericina B (FMBL-AMB) são mostrados na Figura 4.13 (a) (iii), (iv) e (v), respectivamente. Para comparação também foram obtidos os espectros de FTIR do AL e AmB pó conforme mostrados na Figura 4.13 (a), (i) e (ii). O espectro FTIR do AL puro (Figura 4.13 (a) (i)) apresenta bandas intensas em torno de 900 cm^{-1} e na região de $1300-1500 \text{ cm}^{-1}$. Na primeira atribuí-se à modos *rocking* da ligação CH_3 , enquanto que para o segundo modos *bending* (δ) do CH_2 . Na região de $1300-1500 \text{ cm}^{-1}$, há também a contribuição do modo *stretching* (ν) COO^- (1400 cm^{-1}). Picos atribuídos à modos *stretching* assimétrico ($C - C$) e simétrico ($C - C$) podem ser observados em 1063 e 1127 cm^{-1} , respectivamente. Um pico de absorção forte em

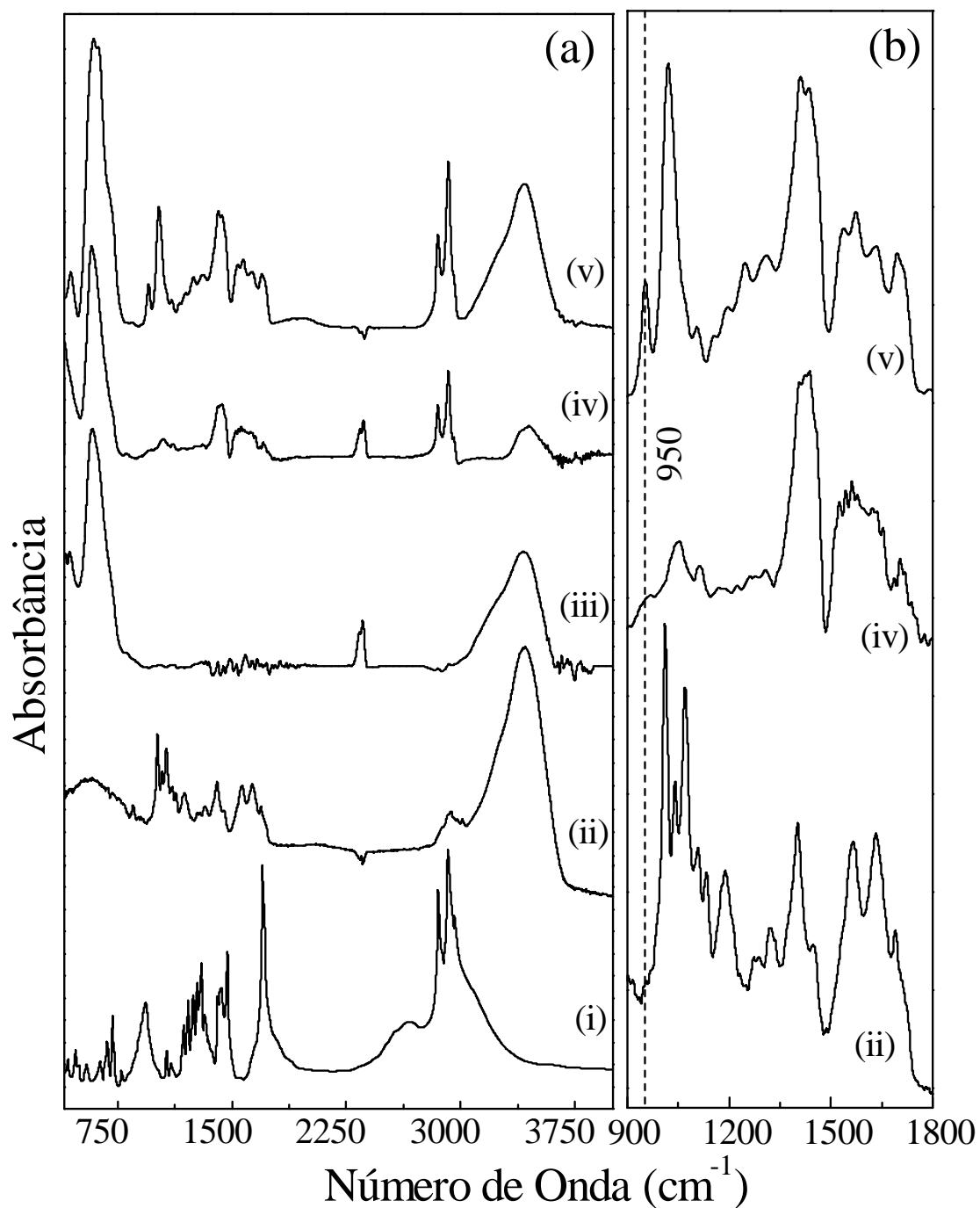


Figura 4.13: (a) Espectro de Infravermelho para (i) AL puro, (ii) AmB em pó, (iii) nanopartículas de óxido de ferro, (iv) FMBL e (v) FMBL-AmB. (b) Aproximação da região 900-1800 cm^{-1} dos espectros de infravermelho (ii), (iv) e (v)

1701 cm^{-1} , devido ao *stretching* $C = O$ do grupo carboxil também é observado. Finalmente, o pico largo em torno de 3000 cm^{-1} é devido ao estiramento $O - H$, enquanto os picos em 2850 e 2920 cm^{-1} correspondem à modos *stretching* simétrico e assimétrico do CH_2 . Na Figura 4.13 (a) (ii) é mostrado o espectro FTIR da AmB pó, em disco de KBr. Picos Raman na região de energias mais baixas (800, 1040, e 1070 cm^{-1}) estão relacionados a vibrações das ligações $\delta(CH)$ ou $\delta(COO)$, $\gamma(NH_2)$ ou $\nu_s(C-O-C)$ e $\nu_{as}(C-O)$, respectivamente. O pico em torno de 1690 cm^{-1} pode ser atribuído ao modo $\nu_{as}(COO)$. Ademais, a banda de maior energia, próximo à 3400 cm^{-1} , pode ser atribuída a vibrações $\nu(O-H)$ e $\nu(N-H)$. As demais regiões observadas no espectro de FTIR da AMB são as mesmas observadas no espectro Raman e suas atribuições podem ser encontradas na Tabela 4.2. O espectro de FTIR das nanopartículas de óxido de ferro (Figura 4.13 (a) (iii)) mostra apenas duas bandas intensas em torno de 600 cm^{-1} e 3400 cm^{-1} , atribuída, respectivamente, à ligação $Fe - O$ da fase magnetita e à vibrações do OH adsorvida na superfície das nanopartículas. O espectro da amostra FMBL (Figura 4.13 (a) (iv)) indica uma forte redução do pico de absorção referente ao $C = O$ em 1701 cm^{-1} , sugerindo que AL liga-se pelo grupo carboxílico nas nanopartículas de óxido de ferro. Os modos assimétricos (ν_{as}) e simétrico (ν_s) do grupo carboxilato (COO^-) aparecem na região de 1350-1690 cm^{-1} , onde há também uma contribuição do modo δCH_2 em 1464 cm^{-1} . A presença dessas bandas são indícios de que há formação da bicamada de AL na superfície das nanopartículas. Em contraste, se apenas uma única camada de AL fosse formada na superfície das nanopartícula o grupo carboxílico do ácido estaria preso nas nanopartículas e, portanto, os dois modos *stretching* (assimétrico e simétrico) para o carboxilato estariam ausente no espectro.

O espectro de FTIR da amostra FMBL-AmB tem características semelhantes a todos os espectros acima discutidos. Essas características podem ser melhor observadas na Figura 4.13 (b). Estas semelhanças mostram que estão presentes na

amostra FMBL-AmB todas as moléculas utilizadas na sua preparação. Vale relatar que a partir de uma análise cuidadosa verifica-se no espectro o surgimento de um pico intenso e estreito em 950 cm^{-1} . Contudo, devido à presença de bandas largas, característica dos espectros de FTIR, não foi possível propor a origem deste pico.

A espectroscopia Raman não é apenas uma excelente ferramenta utilizada na química analítica para identificar grupos funcionais em compostos orgânicos, mas também fornece informações sobre conformação das moléculas, enquanto adsorvidas em superfícies [115]. Para realizar o estudo conformacional das moléculas na superfície das nanopartículas, comparamos os espectros SERS das amostras FMBL e Raman Convencional do AL puro.

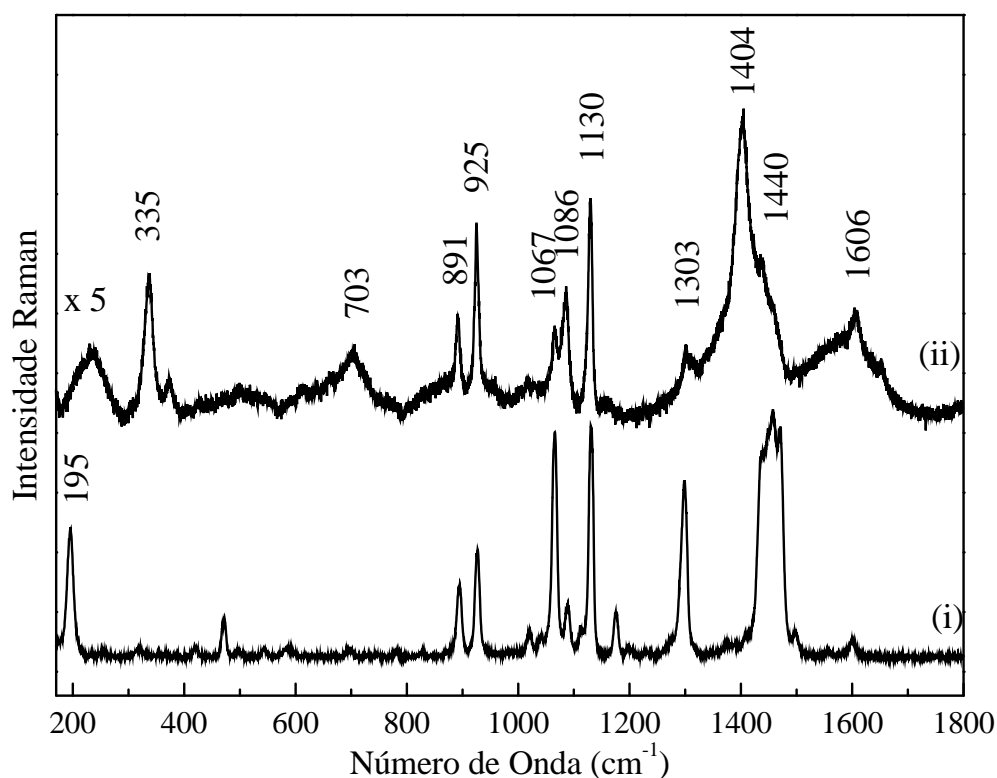


Figura 4.14: (i) Espectro Raman convencional do AL puro e (ii) espectro SERS da amostra FMBL-AmB.

O espectro SERS do AL puro (Figura 4.14 (i)) mostra características típicas de cadeias bem ordenada de hidrocarbonetos [116]. No entanto, quando adsorvida, em bicamada, na superfície das nanopartículas (Figura 4.14 (ii)) verificam-se uma série de mudanças no espectro Raman, quando comparado com o Al puro. A modificação mais evidente é a presença do modo *stretching* simétrico COO^- , em 1404 cm^{-1} . Observa-se que o modo *stretching* assimétrico para COO^- , esperado em 1690 cm^{-1} , está ausente. Como discutido anteriormente, a presença da banda em 1404 cm^{-1} mostra que o grupo carboxílico da segunda camada AL está voltada para o meio aquoso. Outras mudanças importantes no espectro são o aparecimento de bandas Raman em 335 cm^{-1} e 703 cm^{-1} (associado à vibrações $C - C$ do esqueleto do ácido láurico), a redução na intensidade para o modo torção do CH_2 (1303 cm^{-1}) e o modo *scissoring* CH_2 (1440 cm^{-1}) (também relacionados com o esqueleto do ácido). Depreende-se dessas observações que a formação da bicamada de AL se dá pela interação entre os grupos alquila da cadeia desse ácido. Provavelmente, a formação da bicamada de AL modifica a configuração espacial das cadeias (aumento da razão de *gauche/trans* do grupo alquila nas cadeias), resultando em uma mudança na intensidade do sinal Raman.

Na Figura 4.15 são mostrados os espectros Raman Ressonante de (i) AmB pó e (ii) AmB diluído em DMSO/água. Ainda na Figura 4.15 pode-se observar os espectros SERRS (iii) para a AmB diluída em DMSO/água, e (iv) para a amostra FMBL-AmB. No espectro Raman ressonante da AmB sobressai os picos em 1002 (ombro em 1010), 1157 (ombro em 1138) e 1562 cm^{-1} , como visto na Figura 4.15 (i). Outros picos, menos intensos, são observados em 986 , 1200 , 1295 , 1607 , 1634 , e 1645 cm^{-1} . Uma descrição das bandas Raman para AmB em solução pode ser verificada na Tabela 4.2. A banda intensa em 1562 cm^{-1} é atribuída á vibração *stretching* $C = C$, enquanto que as bandas em 1157 e 1002 cm^{-1} foram atribuídas, respectivamente, à vibração *stretching* $C - C$ da estrutura da cadeia acoplado com

bending $C-C-H$ no plano ($\nu_s (C-C) + \delta (C-C-H)$) e modo *bending* do $C-C-H$ no plano acoplado com *bending* $C-C-C$ ($\delta (C-C-H) + \delta (C-C-C)$). Os espectros Raman mostrados na Figura 4.15 (ii) (Raman ressonante) e (iii) (SERRS) apresentam picos típicos tanto da AmB como do DMSO. Picos Raman em 310, 343, 389, 678, 710, 957, 1026, e 1422 cm^{-1} , observados na Figura 4.15 (ii) e (iii), são características do DMSO. Nota-se da Figura 4.15 (iii) que o efeito SERRS contribui para a amplificação do sinal Raman de AmB de cerca de 1 ordem de grandeza, enquanto o modo vibracional em 1002 cm^{-1} praticamente desapareceu. Esse fato pode ser explicado pela perda da planaridade da fração $C-C-H$ na estrutura da cadeia, o que resulta na redução da intensidade Raman, de acordo com o trabalho de Bunow e Levin [108].

Os modos Raman associados ao DMSO podem ser observados nos espectros Raman ressonante e SERRS, respectivamente, na Figura 4.15 (ii) e (iii). Imediatamente, verifica-se que não há mudanças nas energias vibracionais nesses espectros. No entanto, uma avaliação mais cuidadosa mostra que esses espectros, quando comparados com o espectro Raman do DMSO puro, apresentam *blue-shift* para os picos em 343, 389, 678, 710 cm^{-1} e *red-shift* para o pico 1026 cm^{-1} . Embora, as energias vibracionais nas posições em 310, 1422 e 957 cm^{-1} permanecem inalterados. As bandas Raman do DMSO em 310, 1422 e 957 cm^{-1} são, respectivamente, atribuídos aos modos *bend* simétricos de $C-S-C$ e $H-C-H$ e modos *rocking* do $H-C-H$ e as bandas em 343, 389, 678 e 710 cm^{-1} são atribuídos à modos *stretching* simétrico $C-S=O (C-S)$ (343 cm^{-1} (678 cm^{-1})) e assimétrico (389 cm^{-1} (710 cm^{-1})), este comportamento observado se dá pela formação de complexo entre o grupo $O-H$ da AmB com o grupo $S=O$ do DMSO. Embora o espectro SERRS da AmB diluído em DMSO/água (Figura 4.15 (iii)) não tenha apresentado nenhum deslocamento na energia vibracional dos modos $C=C$ (1562 cm^{-1}) e $C-C$ (1157 cm^{-1}), o modo Raman de maior energia se tornou muito mais largo. Isto pode estar associado à

Tabela 4.2: Posição dos modos vibracionais observados nos espectros Raman Ressonante e SERS para AmB pó e em solução, FMBL e FMBL-Amb.

Raman Ressonante cm^{-1}		Amostras			Tentativa de atribuições
AmB pó	AmB*	AmB*	FMBL	FMBL-Amb	
	310	310			$\delta(C - S - C)$
	345	345			$\nu_{as}(C - S = O)$
	389	389			$\nu_s(C - S = C)$
			703		$\sigma(C - C)$
	678	678			$\nu_{as}(C - S)$
	712	713			$\nu_s(C - S)$
	957	956			$\sigma(H - C - H)$
			891		$\sigma(CH_3)$
			925		$\nu(C - C)$
1002				930	$\delta(C - C - H) +$ $\delta(C = C - C)$
1010 sh		1009		955	
	1026				$S = O$
			1067		$\nu_{as}(C - C)$
			1086	1086	$\nu(C - OH)$
1138sh	1140	1140		1144	$\delta(C - C - H) +$ $\gamma(C = C - O)$
1157	1157	1157		1157	$\nu_{ss}(C - C) +$ $\delta(C - C - H)$
			1130		$\nu_s(C - C)$
1200					$\nu_s(C - O - C)$ para ester + $\delta(OH)$
			1303		<i>twisting</i> (CH_2)
			1404	1402	$\nu_s(COO^-)$
	1422	1422			$\delta(H - C - H)$
			1420-1500		<i>scissoring</i> (CH_2)
1562	1562	1562		1560	$\nu_s(C = C)$
1607				1607	$\delta(NH_2^-)$
1634	1638			1639	$\nu_{as}(COO^-)$

* representa AmB em solução de DMSO/ H_2O , ν -stretching, σ -rocking
 γ -wagging, δ bending, s-simétrico, as-assimétrico e sh-ombro
referências [108, 116]

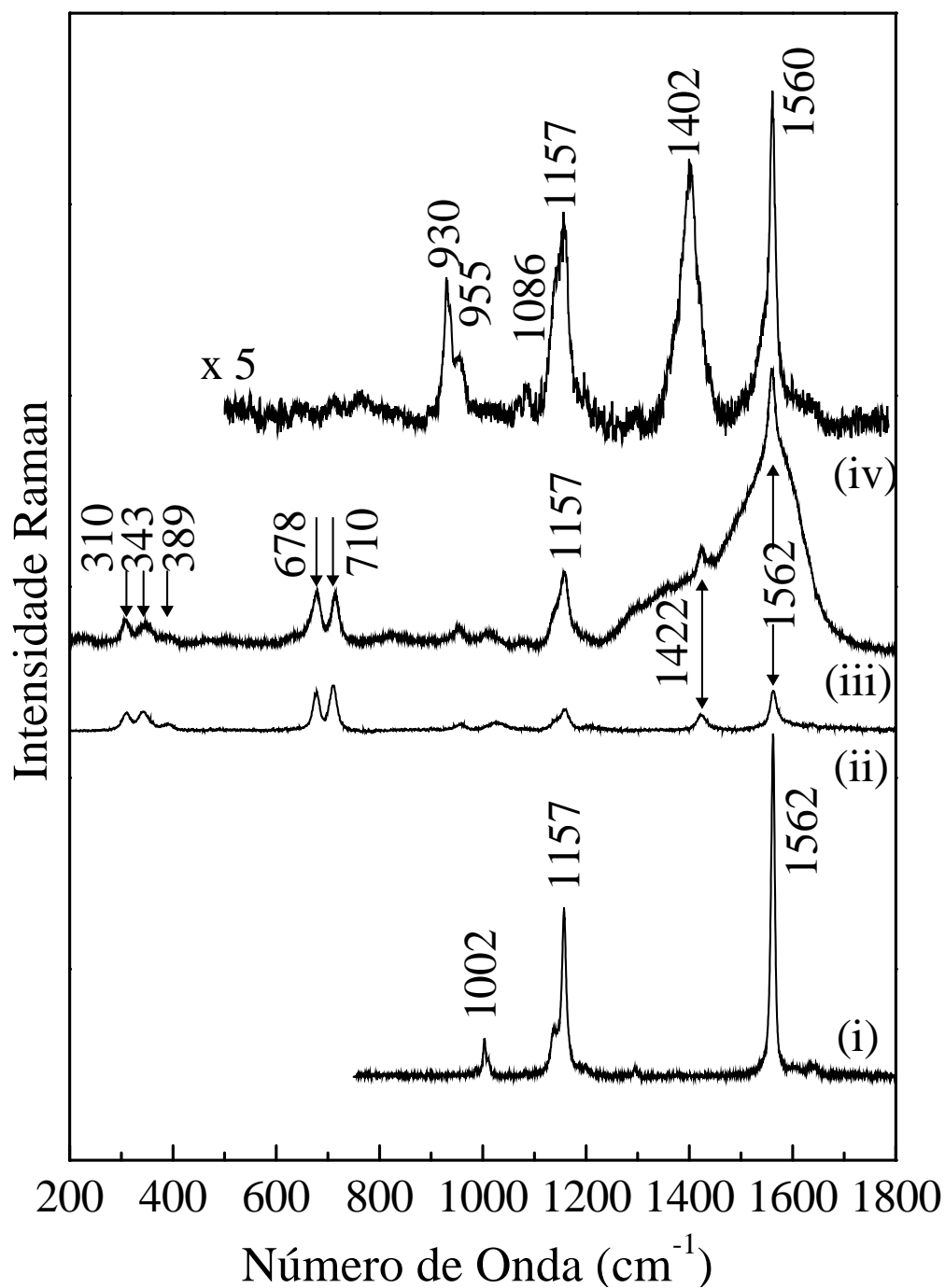


Figura 4.15: Espectros Raman Ressonante (i) para a AmB em pó, (ii) AmB diluída em DMSO/H₂O e espectros SERS (iii) AmB diluída em DMSO/H₂O e (iv) para a amostra FMBL-AmB

modificações estruturais da formação do cis-isômero da AmB, devido à liberdade de movimento da micosamina em solventes [108].

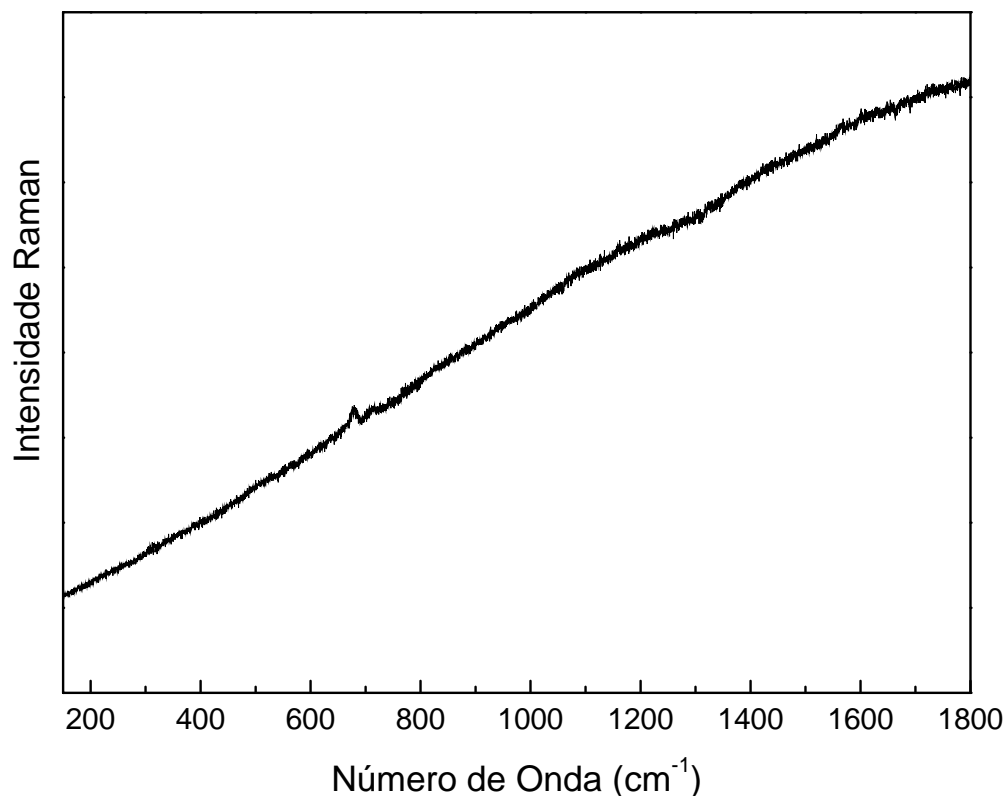


Figura 4.16: *Espectro Raman Ressonante para FMBL-AmB*

O espectro Raman ressonante para amostra FMBL-AmB, Figura 4.16, mostra uma forte fluorescência, o que torna impossível observar o espectro vibracional usando Raman Convencional. Em contraste com o espectro SERRS obtido para a amostra FMBL-AmB, como mostrado na Figura 4.15 (iv), que apresenta bandas bem definidas. Nota-se que, com relação ao espectro Raman do pó da AmB (Figura 4.15 (i)) e os AmB diluída em DMSO/água (4.15 (ii)), o espectro SERRS da FMBL-AmB (4.15 (iv)) é notavelmente diferente. Embora a energia vibracional associada à ligação $C - C$ (1157 cm^{-1}) permaneça inalterada em comparação com os espectros Raman apresentados na Figura 4.15 (i-iii), diferenças significativas foram

observadas no espectro mostrado na Figura 4.15 (iv), como o aparecimento de novos picos Raman, deslocamentos e variações na intensidade relativa. As bandas Raman na faixa de 1330-1400 cm^{-1} são atribuídas à modos *stretching* e deformação das ligações $C - O$ e $C - H$, fora do plano (*trans*-polieno). Pode-se sugerir que a banda centrada em 1402 cm^{-1} é atribuída ao modo *stretching* simétrico de COO^- [116], proveniente da camada de AL conforme Figura 4.14 (ii). O pico fraco em 1086 cm^{-1} , provavelmente, tem sua origem também da bicamada de AL e está associado ao modo *stretching* da ligação $C - OH$.

As mudanças mais relevantes no espectro da amostra SERRS da FMBL-AmB foi o desaparecimento do pico Raman em 1002 cm^{-1} (e ombro 1010 cm^{-1}) e o aparecimento de uma estrutura semelhante em 930 cm^{-1} (ombro em 955 cm^{-1}). Vale ressaltar que o espectro SERRS da amostra FMBL tem dois picos estreitos em 891 cm^{-1} e 925 cm^{-1} , o que sugere que a banda em 930 cm^{-1} pode ter sua origem na bicamada de AL. Para investigar esta possibilidade, uma comparação entre os espectros das amostras FMBL-AmB e FMBL são mostrados na Figura 4.17 (ii) e (iii), respectivamente. Na Figura 4.17 (i) também é mostrado o espectro da AmB em pó. Semelhanças podem ser observadas entre os espectros na Figura 4.17 (ii) e (iii), a principal delas é a presença dos picos Raman em 1066 cm^{-1} e 1085 cm^{-1} , assim como, a presença do pico em 891 cm^{-1} , para ambos espectros. No entanto, a intensidade e a largura do pico em 930 cm^{-1} (Figura 4.17 (ii)), bem como a presença do pico em 955 cm^{-1} , sugerem que essa banda não têm correlação com a bicamada de AL. A subtração entre os espectros (ii) e (iii) confirma esta afirmação (ver Figura 4.17 - diferença entre os espectros (ii) - (iii) e Figura 4.18). Além disso, o fato de que os dois picos desaparecem na região em torno de 1002 cm^{-1} (ombro em 1010 cm^{-1}), enquanto outros dois, com as mesmas características, surgem próximos à 930 cm^{-1} (ombro em 955 cm^{-1}) indica fortemente que um *red-shift* de fato aconteceu na energia vibracional desta banda. Note que além do forte *red shift* da energia

vibracional associada a modificações na energia vibracional referente ao modo *bend* ($C - C - H$) acoplado ao modo *bend* ($C = C - C$) ($1002-930 \text{ cm}^{-1}$) é também observado um pequeno *red-shift* da energia vibracional associado ao modo *stretching* da ligação $C = C$ ($1562-1560 \text{ cm}^{-1}$), assim como, o aumento na intensidade do modo em 930 cm^{-1} com relação ao modo em 1560 cm^{-1} . Enquanto na Figura 4.15 (i) a intensidade relativa entre os dois modos Raman (1002 e 1562 cm^{-1}) é cerca de $0,1$, na Figura 4.15 (iv) a intensidade relativa entre os modos Raman em 930 cm^{-1} e 1560 cm^{-1} aumenta para aproximadamente $0,5$. A intensificação em cinco vezes do sinal Raman é atribuído à preservação da conformação do anel macrolactone da anfotericina B, que interage com a bicamada de ácido láurico. Além disso, quando AmB é diluída em DMSO/água (Figura 4.15 (iii)), na amostra FMBL-AmB, os grupos $C - C - H$ da AmB mantém planaridade com a cadeia poliênica, uma vez que a distorção ao longo da cadeia contribui com as mudanças geométricas que envolvem as transição eletrônicas $\pi \rightarrow \pi^*$, aumentando assim, a magnitude do efeito ressonante e, conseqüentemente, o sinal Raman (Figura 4.14). Além disso, a constatação de que o $\delta (C - C - H) + \delta (C - C - C)$ e $\nu(C - C)$ dos modos Raman relacionadas à AmB na amostra FMBL-AmB apresentam *red-shift* e que os modos Raman $\nu_s (C - C) + \delta (C - C - H)$ permanecem inalterados, sugere que apenas a cadeia de poliênica do anel macrolactone, devido à sua alta densidade eletrônica, liga-se com a cadeia $(CH_2)_{10}$ da bicamada de ácido láurico adsorvida na superfície das nanopartículas de magnetita.

O arranjo esquemático proposto no presente estudo para a ancoramento das moléculas AmB na superfície das nanopartículas magnéticas é mostrado na Figura 4.18.

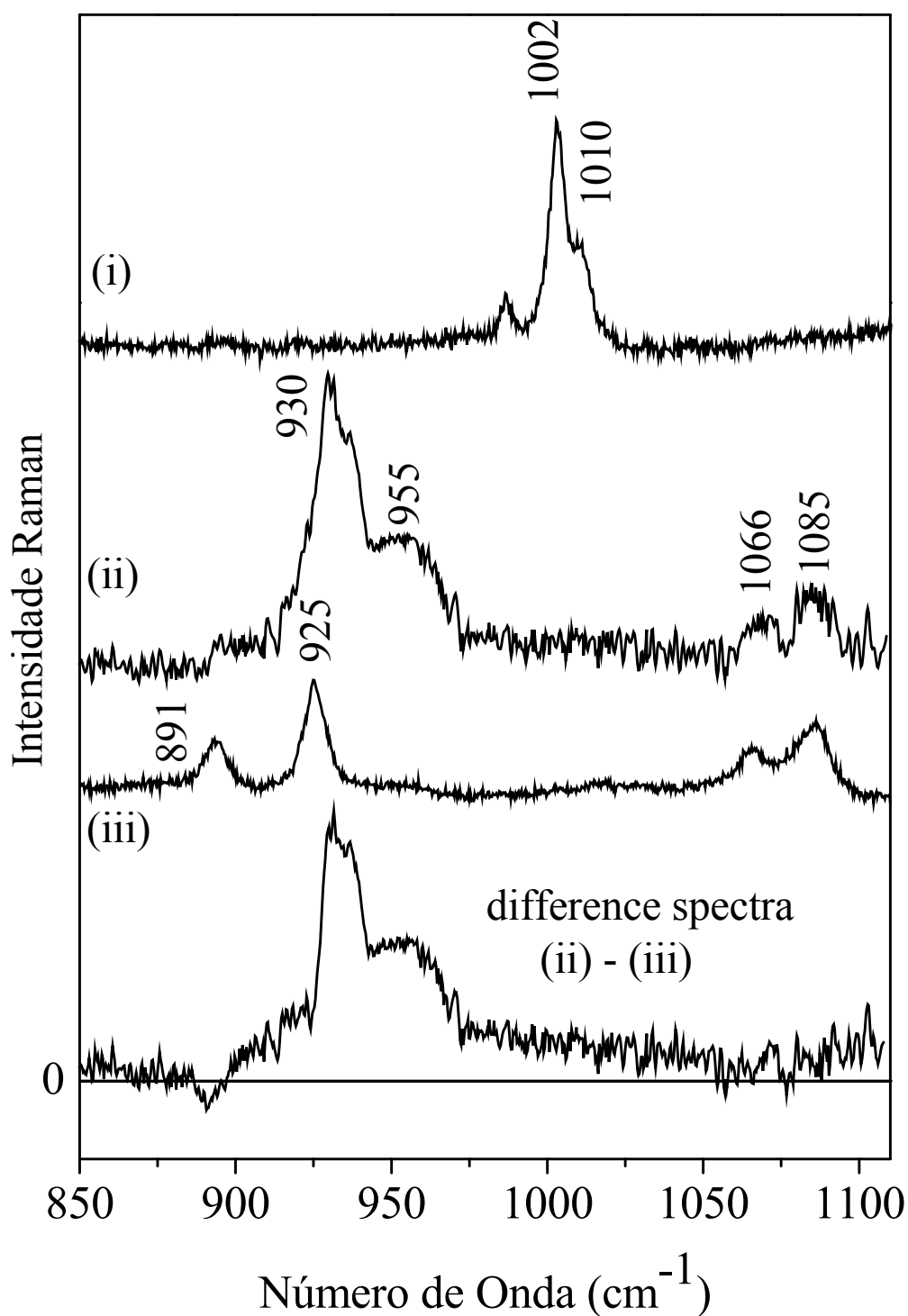


Figura 4.17: Espectro Raman na região de 850-1110 cm^{-1} para a amostra (i) AmB(pó) e SERRS para as amostras (ii) FMLB-AmB e (iii) FMLB. Na parte inferior verifica-se a subtração (ii)-(iii).

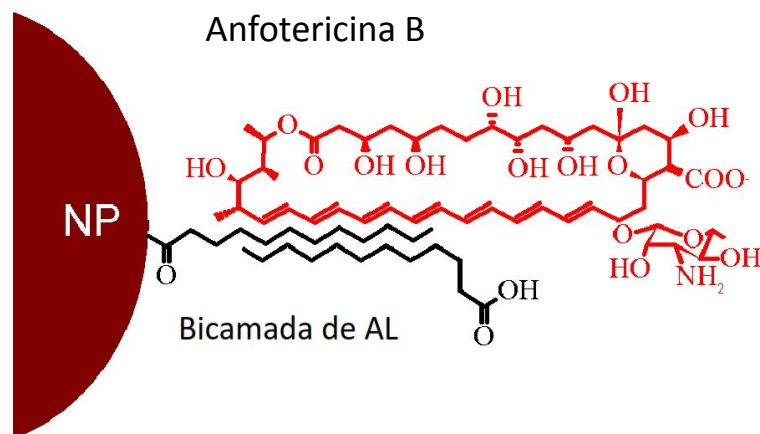


Figura 4.18: *Representação esquemática para o ancoramento da Anfotericina nas nanopartículas recobertas com ácido láurico.*

4.2.4 Conclusões

Em resumo, os resultados obtidos da análise dos espectros SERS demonstram que as nanopartículas de magnetita recobertas com um surfactante adequado (bicamada de ácido láurico) podem ser utilizadas, com sucesso, para carrear o fármaco Anfotericina B (AmB). Além disso, nesse trabalho pode-se constatar a sensibilidade e seletividade do efeito SERRS no estudo da interação das moléculas de AmB, quando na superfície das nanopartículas. E finalmente, com base nos resultados SERRS, pôde-se propor a conformação das moléculas de AmB ao se ligarem nos átomos da estrutura da cadeia do ácido láurico: a AmB ancora na bicamada de AL através de sua cadeia poliênica do anel macrolactone. Portanto, de acordo com o modelo proposto, as cabeças hidrofílicas do AmB ainda estão livres para interagir com a membrana celular para formar os canais trans-membrana.

4.3 Estudo SERS da conjugação de nanopartículas magnéticas com o anticorpo anti-CEA

4.3.1 Introdução

O aumento da expectativa de vida e os fatores de risco decorrentes da vida moderna têm provocado um crescente aumento do número de casos de câncer. Com isso, a medicina atual vem desenvolvendo esforços para o diagnóstico, tratamento e cura dos mais variados tipos de carcinomas. Para isto, têm-se recorrido a sensores biológicos, sistemas de entrega de drogas (*drug delivery*), agentes de contraste para ressonância magnética, quimioterápicos cada vez mais eficientes, entre outros. Como resultado, estão sendo alcançados enormes avanços no diagnóstico e tratamento do câncer [117].

Técnicas como o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), o radioimunoensaio (RIA) e o imunoensaio por quimioluminescência (CLIA) [118–121], todas baseadas na propriedade de reconhecimento molecular altamente específico de antígenos por anticorpos, tornaram-se os principais métodos analíticos em exames clínicos baseados na análise bioquímica. No entanto, essas técnicas envolvem os riscos da radiação, procedimentos complicados e instrumentos caros [122]. O método ELISA, por exemplo, é uma das ferramentas mais utilizadas para detectar a presença de antígenos ou seus anticorpos complementares. Contudo, a baixa concentração de biomarcadores nas amostras biológicas de pacientes com doença no estágio inicial ou no de remissão limita o uso do ELISA, uma vez que sua baixa sensibilidade só permite a detecção após os níveis de proteína atingirem concentrações acima do limiar crítico [123]. Nessas concentrações a neoplasia está, muitas vezes, em estágio avançado.

Recentemente, com o surgimento da nanotecnologia, novos horizontes estão

se abrindo para detecções altamente sensíveis de biomoléculas [124]. Neste sentido, nanopartículas metálicas têm sido amplamente utilizadas como marcadores, por causa de suas excelentes propriedades ópticas [125]. Outra promissora abordagem para o desenvolvimento de biomarcadores é a associação de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com anticorpo, os quais poderão ser usados como sonda de marcação e captura [126]. Este sistema permite, pela aplicação de campos magnéticos, separar e, portanto, detectar baixas concentrações de antígenos, assim como, concentrar a droga no local desejado e controlar a liberação do fármaco pela aplicação de um campo magnético AC. Outra promissora aplicação para esse sistema é a magnetohipertermia, a qual tem por base a hipertemia provocada pelo movimento das nanopartículas magnéticas ao se alinharem a um campo magnético alternado externo. Uma vez que as nanopartículas podem ter a especificidade necessária para se ligarem apenas às células tumorais, o aquecimento local provocado pelo movimento das nanopartículas leva à lise celular e conseqüentemente à sua morte. O sucesso desta abordagem pode ser observado no trabalho de Ito *et al.* [2], onde foram utilizadas nanopartículas magnéticas conjugadas com anticorpo monoclonal na indução da hipertemia. Nesse trabalho, o tecido foi aquecido à aproximadamente $42.5^{\circ}C$ a $46^{\circ}C$ para o tratamento de diferentes tipos de câncer.

Inquestionavelmente, a detecção precoce do câncer é um dos desafios na atualidade da medicina. Sabe-se que o diagnóstico no estado inicial do câncer ou mesmo no estado de remissão aumenta as chances para que o tratamento seja bem sucedido. Técnicas de imagem não invasivas, como por exemplo a ressonância magnética, são amplamente utilizadas na detecção e monitoramento de tumores cancerígenos. Quando associadas a agentes de contraste ganham resolução, tornando possível a observação do câncer em seu estágio inicial. Bharali *et al.* [1] relataram em seu trabalho, que agentes de contrastes baseados em nanopartículas magnéticas recobertas com surfactantes apropriados para a identificação das células cancerígenas

podem ser usados na detecção de tumores, ainda pequenos, da ordem de 2-3 *mm*. E Bahadur *et al.* [3] ratificaram o uso das nanopartículas magnéticas em aplicações médicas, destacando a utilização dessas na separação imunomagnética, agente de contraste em ressonância magnética, assim como na magnetohipertemia.

Nesse contexto, este trabalho tem como objetivo comprovar o sucesso no desenvolvimento de um sistema nanoparticulado, para ser utilizado no tratamento de câncer, como descrito anteriormente. O sistema a ser estudado consiste de nanopartículas de maguemitita conjugadas com anti-CEA, que é um anticorpo monoclonal do antígeno CEA. O Antígeno carcinoembrionário (CEA) é um tipo de glicoproteína presente no soro na maioria dos pacientes com certos tipos de câncer [127], tais como câncer de pulmão [128], câncer de mama [129], câncer do cólon [130] etc. Para se comprovar a efetiva adsorção do anticorpo anti-CEA na superfície das nanopartículas de maguemitita será utilizado a técnica SERS, utilizando como substrato filme de prata.

4.3.2 Metodologia

Preparação das amostras e dos substratos

a) Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas de maguemitita foram sintetizadas pelo método de coprecipitação química em meio alcalino, seguindo os procedimentos descritos na seção 3.1.

b) Preparação da amostra

Devido à dificuldade de adsorver eficientemente o anti-CEA diretamente sobre a superfície das nanopartículas de maguemitita, esta foi primeiramente recoberta

com DMSA (ácido dimercaptosuccínico), FM-DMSA. O DMSA foi escolhido devido a sua versatilidade quando na superfície das nanopartículas, além de apresentar boa biocompatibilidade e baixa toxicidade [131].

As nanopartículas magnéticas (FM-DMSA), agora solúveis em água devido aos grupos carboxila em suas superfícies, foram em seguida conjugados ao anticorpo anti-CEA, usando o EDC (*1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide*) e o NHS (*N-hydroxysulfosuccinimide*) como linkers. De acordo com a literatura, o EDC é um reticulador carbodiimida, solúvel em água, que ativa os grupos carboxila para reação espontânea com aminas primárias, permitindo a imobilização de peptídeos e hapteno-transportador da conjugação de proteínas. Na presença de *N-hydroxysulfosuccinimide* (sulfo-NHS) o EDC pode ser usado para converter grupos carboxilas em aminas-reativas, por intermédio do sulfo-ésteres NHS [132, 133]. No sistema aqui estudado o EDC ativa o grupo terminal $-COOH$ do DMSA na superfície das nanopartículas [127], de modo que o anticorpo se ligue ao terminal carboxilato do DMSA via ligação covalente, em uma esterificação do NHS com EDC [125]. Na Figura 4.19 pode-se observar um diagrama esquemático do processo na preparação das amostras.

c) Preparação do Substrato SERS ativo.

Filmes nanoestruturados de prata foram preparados pela deposição de nanopartículas de prata sob substrato de prata pelo método de eletrólise, como descrito na seção 3.2.2. Para a obtenção dos espectros SERS a amostra foi diluída em água e depositada sobre o filme de prata e em seguida seco com fluxo de nitrogênio.

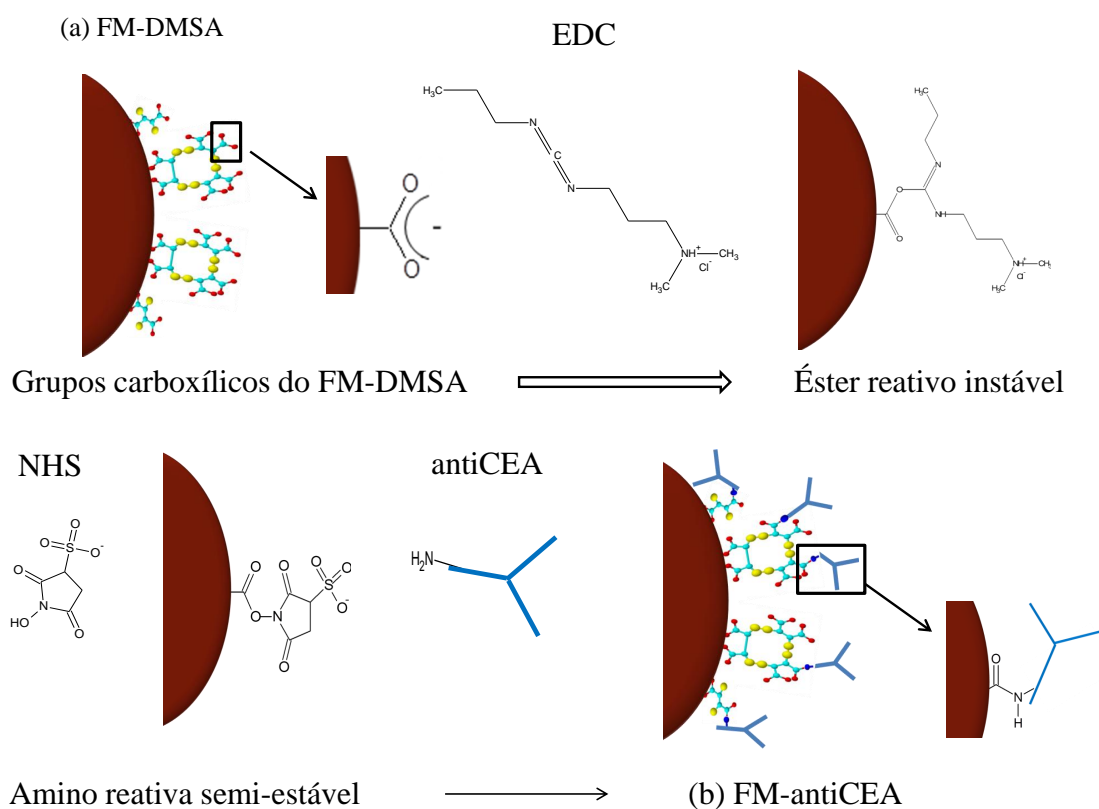


Figura 4.19: Diagrama esquemático para a conjugação do anticorpo na superfície das nanopartículas. Amostras (a) FM-DMSA e (b) FM-antiCEA

4.3.3 Resultados e discussão

Com o objetivo de obter a maior quantidade possível de informações a respeito do sistema a ser estudado, primeiramente foram obtidos os espectros Raman convencional das amostras de Fluidos Magnéticos recobertos com DMSA (FM-DMSA) e posteriormente conjugados com o anti-CEA (FM-antiCEA) e das moléculas de DMSA e anti-CEA, isoladamente. Para a obtenção dos espectros Raman convencional dos Fluidos Magnéticos e do anti-CEA, as amostras foram pipetadas sobre lâminas de vidro e posteriormente secas com fluxo de nitrogênio. Para a obtenção do espectro do DMSA, este foi mantido na forma de pó e para o anti-CEA foi obtido

em solução. Os espectros foram adquiridos na configuração micro-Raman (objetiva x50), utilizando um laser de Ar^+ , sintonizado na linha 514,5 nm, com potência de 20 mW. A Figura 4.20 mostra os espectros Raman convencional do anticorpo anti-CEA (a) e do DMSA-pó (b). Infelizmente, o espectro Raman convencional do anticorpo anti-CEA (Figura 4.20 (a)) não fornece muita informação, já que são observados apenas bandas vibracionais largas em torno de 1400 e 1600 cm^{-1} . Na Figura 4.20 (b) é mostrado o espectro Raman convencional do DMSA-pó. Esse espectro está em excelente acordo com o obtido por Nian Bing *et al.* [134]. As bandas em 1641 e 1454 cm^{-1} estão associadas à modos *stretching* assimétricos e simétricos dos grupos carboxilatos. Os picos em 968, 1287 e 1292 cm^{-1} são devido aos modos *stretching* da ligação $C - C$. As bandas em 672 (700 cm^{-1}) e 774 cm^{-1} podem ser atribuídas aos modos *stretching* simétricos e assimétricos da ligação $(C - S) - H trans$.

Os espectros Raman convencional das amostras (a) FM-DMSA (b) FM-antiCEA são mostradas na Figura 4.21. Os espectros foram ajustados com curvas lorentzinas, as quais revelaram a presença de modos vibracionais localizados em torno de 200, 340, 520, 660, 715, 1430 e 1550 cm^{-1} . Essas bandas são características de nanopartículas de maguemita. As cinco primeiras são nomeadas de acordo com os modos de simetria previsto para a estrutura espinélio cúbica do grupo espacial $Fd\bar{3}m$, A_{1g} , E_g , $3T_{2g}$. A banda em 1400 cm^{-1} está associada ao espalhamento de dois magnons [31]. Entretanto não é possível descartar a presença da fase magnetita devido à redução da maguemita induzida pela cobertura de DMSA [36]. Além destes modos, também podem ser observados nos espectros a presença de um pico estreito em 500 cm^{-1} e uma banda larga em torno de 1550 cm^{-1} . Estes picos estão associados à cobertura do fluido magnético. O primeiro pico refere-se a pontes de enxofre (S-S) formadas pelo DMSA adsorvido na superfície das nanopartículas e o segundo a fragmentos da molécula de DMSA ou do anti-CEA [35]. Um resumo dos picos presentes nos espectros e suas atribuições são apresentados na Tabela 4.3.

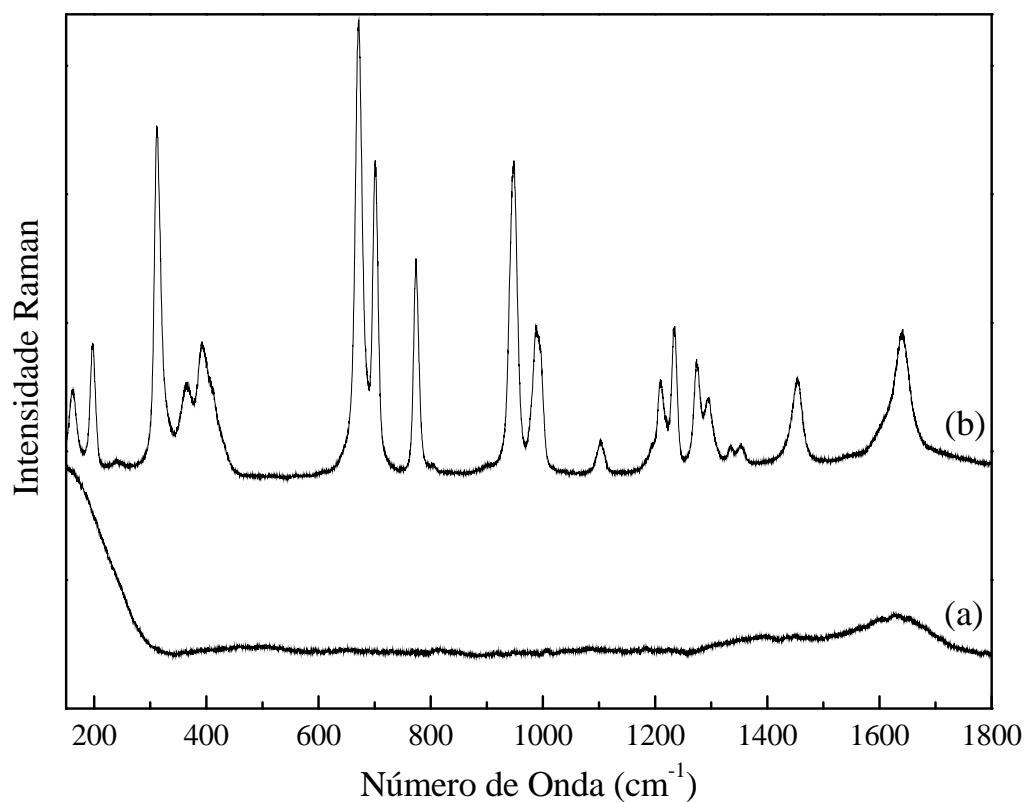


Figura 4.20: Espectros Raman convencional das amostras de (a) anti-CEA e (b) DMSA-pó.

Como pode ser observado, as informações obtidas a respeito das moléculas adsorvidas na superfície das nanopartículas, a partir da análise dos espectros adquiridos pela espectroscopia Raman convencional, são muito limitadas. De modo que, para conseguir um estudo mais aprofundado da interface nanopartícula/surfactante foram obtidos espectros SERS de todas as etapas do processo de construção da amostra FM-antiCEA e das moléculas que a compõe. Assim, para investigar a interação do DMSA e do anti-CEA, puros, com a superfície de prata, ambas amostras foram diluídas em água. Para investigar a molécula de DMSA, uma solução de 0,05 mol/L de DMSA/água foi preparada. Já as amostras de anti-CEA, FM-DMSA e FM-antiCEA foram diluídas em água na proporção 1 : 2. Para a obtenção dos es-

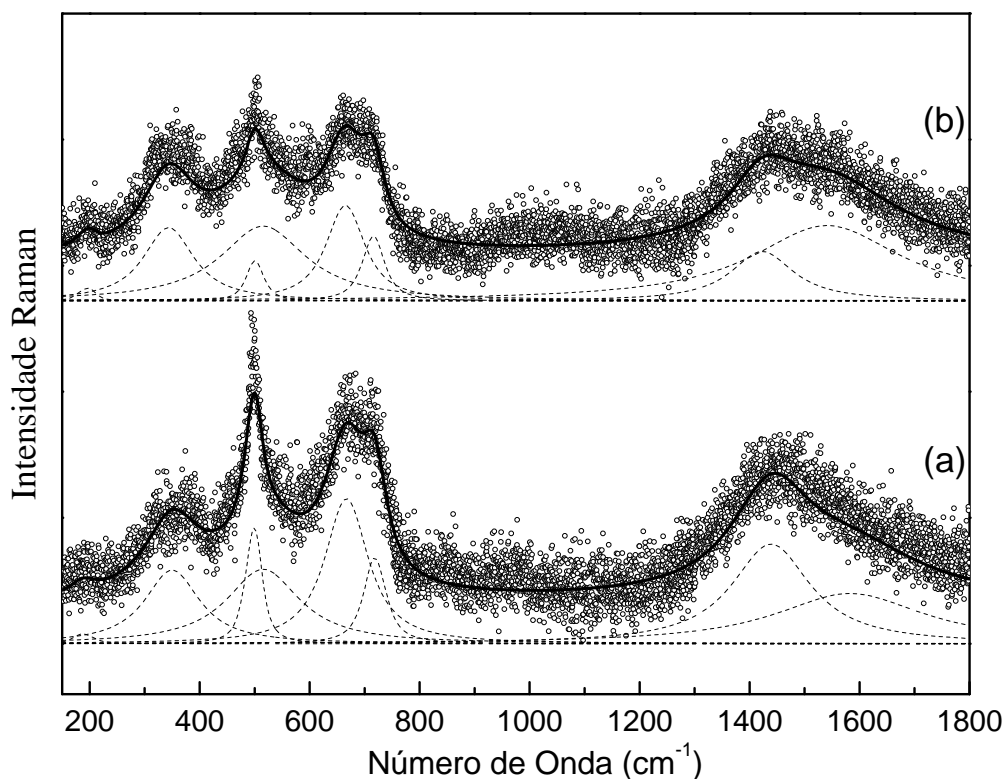


Figura 4.21: Espectros Raman convencional das amostras de Fluidos magnéticos (a) FM-DMSA e (b) FM-antiCEA.

pectros SERS $20\mu L$ dessas soluções foram depositadas sobre o substrato de prata e secas com fluxo de nitrogênio. Imediatamente após este procedimento os espectros foram obtidos na configuração macro-Raman, utilizando a linha $514,5\text{ nm}$ focalizado na amostra com uma lente cilíndrica.

Os espectros SERS das amostras DMSA e FM-DMSA são mostradas na Figura 4.22 (a) e (b), respectivamente. Vale ressaltar que o espectro SERS do DMSA sobre a superfície de prata, aqui apresentado, tem características bem distintas do observado por Zaluzhna *et al.* [135], ao estudar a adsorção do DMSA sobre eletrodo de prata. O espectro SERS obtido por Zaluzhna *et al.* apresenta uma forte fluorescência na região de $600\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, o que impossibilita a observação das ban-

Tabela 4.3: Posição dos modos vibracionais obtidos a partir dos espectro Raman convencional das amostras FM-DMSA e FM-antiCEA, para comparação também é mostrado os dados da referência [35].

Amostras			Tentativa de atribuições
Raman Convencional (cm^{-1})			
Maguemitita/DMSA [35]	FM-DMSA	FM-antiCEA	
	188	194	T_{2g}
352	345	343	E_g
500	498	501	$\nu(S - S)$
503	515	516	T_{2g}
673	667	665	T_{2g}
721	719	719	A_{1g}
	1439	1423	magnons
	1583	1541	

das vibracionais da molécula de DMSA. Somente uma banda em 390 cm^{-1} , que foi atribuído aos modos vibracionais da ligação $Ag - S$, está presente no espectro. Espectro SERS do DMSA adsorvido sobre superfície de ouro foi mostrado no trabalho de Nian Bing *et al.* [134]. Neste trabalho, sobreposto a uma forte fluorescência, foram observadas bandas em 261, 470, 1292, 1460 e 1624 cm^{-1} . A principal conclusão deste estudo foi que ligações $S - Au$ foram formadas na superfície de ouro pelos dois grupos mercaptos $S - H$ do DMSA. A presença da banda em 261 cm^{-1} é uma evidência dessa ligação.

No espectro SERS da molécula de DMSA depositada na superfície de Ag (Figura 4.22 (a)) percebe-se um número muito maior de bandas do que os obtidos nos trabalhos acima mencionados. Na faixa de $150\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ observa-se uma banda larga, constituída por três bandas centradas em 219, 247 e 280 cm^{-1} (ver montagem na Figura 4.22 (a)). A banda em 219 cm^{-1} está associada a ligações $Ag - O$ [136], essas ligações surgem da interação da prata com o grupo carboxilato do DMSA. A banda em 247 cm^{-1} está associada a modos stretching $Ag - N$ [137], provavelmente essas ligações foram formadas durante o processo de secagem com fluxo de nitrogênio. A banda em 280 cm^{-1} é devido à ligação entre o grupo tiol do DMSA e os átomos

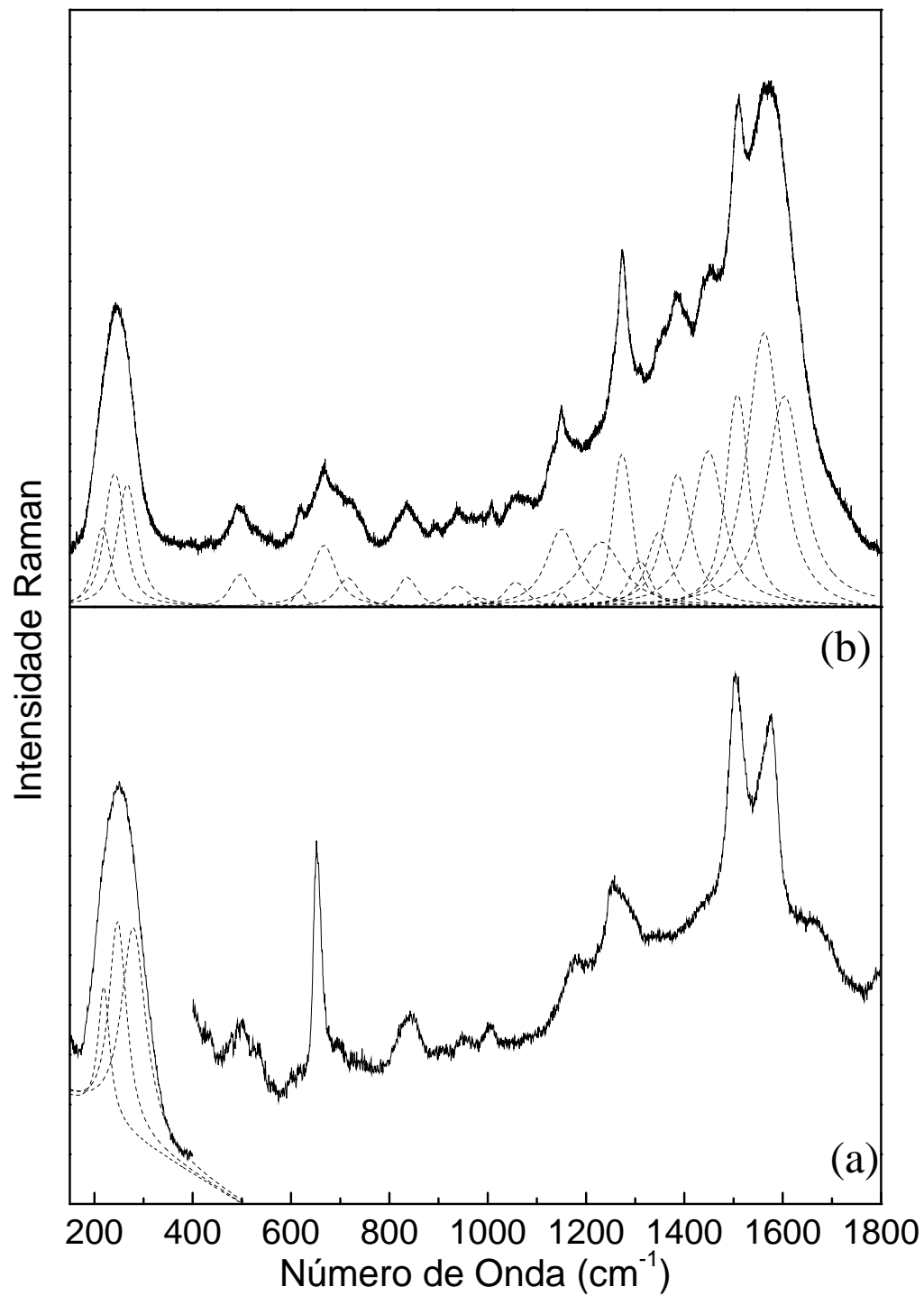


Figura 4.22: Espectro SERS da solução de DMSA (a) e da amostra FM-DMSA (b).

Tabela 4.4: Posição dos modos vibracionais do DMSA pó (Raman convencional), da solução de DMSA e da amostra FM-DMSA (SERS).

Amostras		Tentativa de atribuições	
Raman Convencional (cm^{-1})	SERS (cm^{-1})		
DMSA pó	DMSA solução	FM-DMSA	
	219	216	$Ag - O$
	247	241	$Ag - N$
	280	267	$Ag - S$
311/365/392			$-C - S - C-$
	435		$Fe - S$
	500	500	$H - C - (S - S) - C - H$
	530	530	$C - C - (S - S) - C - C$
		618	
	654		$\nu_{as}(C - S) - S$
671		667	$\nu_s(C - S) - H trans$
701	696	716	$\nu_{as}(C - S) - H gauch$
774			$\nu_s(C - S) - H$
	840	837	$\delta_s(COO^-)$
947	949	940	$\nu(C - COO^-)$
1003	1005	1007	$\nu(C - C) cadeia$
		1057	$\nu(C - C) cadeia$
		1149	$\nu(C - C) cadeia$
	1174		$\nu(C - C) cadeia$
1210		1213	
1234	1253	1231	
1275	1275	1274	$\nu(C - O) + \delta(OH)$
1295		1309	
1353		1345	
	1422	1386	$\nu(C - O)$
1453		1449	$\nu_s(COO^-)$
	1506	1509	$\nu_s(COO^-)$
	1572	1562	$\nu_{as}(COO^-)$
1601		1604	$\nu_{as}(COO^-)$
1641	1666		$C = O$

ν -stretching, δ -bending, s-simétrico e as-assimétrico
referências [136–140]

de prata do substrato, [138,140]. Assim, as moléculas de DMSA em solução, quando depositada sobre o substrato de prata interagem com os átomos de *Ag* formando ligações do tipo *Ag-S* e *Ag-O*. De acordo com o trabalho de Zaluzhna *et al.* [135] cada átomo de *S* está ligado a dois átomos de *Ag* e um átomo de *Ag* está ligado à dois ou três átomos de *S*. Conseqüentemente, as frequências de vibração das ligações *Ag-S* não são claramente definidas, de modo que o modo *stretching* da ligação *Ag-S* pode ser observada no intervalo de frequência que varia de 250 à 350 cm^{-1} . Uma importante diferença entre o espectro do DMSA pó e em solução adsorvido na superfície de prata é a ausência dos picos relacionados aos modos *stretching* (*C-S*) - *H* (672, 700 e 774 cm^{-1}), no primeiro e o surgimento das bandas em 515 e 654 cm^{-1} , no segundo. De acordo com a literatura estas bandas são característicos de modos *stretching* *C-(S-S)-C* e *C-(C-S)-S* [139]. Portanto, pode-se concluir que há formações de pontes de enxofre (*S-S*) na superfície do filme de prata.

Como podemos observar na Figura 4.22 (a), o espectro SERS da solução de DMSA adsorvido na superfície de prata exhibe uma banda relativamente intensa em 840 cm^{-1} devido à vibração δ (*COO*⁻) (deformação do tipo tesoura no plano *O=C-O-*) e bandas mais intensas em 1275, 1422, 1506-1572 e 1666 cm^{-1} , associadas respectivamente às vibrações das ligações ν (*C-O*) + δ (*O-H*), ν_s (*COO*⁻), ν_{as} (*COO*⁻) e ν_s (*C=O*) [136]. O aumento na intensidade e os deslocamentos da energia vibracional observados para essas bandas, assim como, o alargamento dessas quando comparadas com o DMSA pó, permite afirmar que o grupo carboxil do DMSA também pode está adsorvido na superfície da prata na forma protonada [141].

O espectro SERS da amostra FM-DMSA (Figura 4.22 (a)) mostra características similares àquelas observadas no espectros SERS da solução de DMSA. Ambas apresentam as mesmas três bandas na região de 150-400 cm^{-1} (216, 241 e 267 cm^{-1}), levando a crer que mesmo quando ligada à superfície das nanopartículas

o DMSA interage com a prata por meio do grupo tiol. Levando-se em conta que a intensidade integrada da linha Raman é proporcional ao número de osciladores que a produz, pode-se usar as áreas sob as curvas ajustadas na região de 150 - 400 cm^{-1} para estimar a relação entre o número de ligações $Ag - S$ com relação às ligações $Ag - O$ e $Ag - N$. Para isso utiliza-se a relação que segue abaixo [142]:

$$x(Ag - S) = \frac{aI_{AgS}}{aI_{AgS} + bI_{AgN} + cI_{AgO}} \quad (4.1)$$

onde a , b e c representam as forças de osciladores relativas aos modos vibracionais $\nu (Ag - S)$, $\nu (Ag - N)$ e $\nu (Ag - O)$, respectivamente. Em primeira aproximação foi considerado que $a = b = c$. Desta forma é possível inferir que a contribuição do modo $\nu (Ag - S)$ é 40 % maior no espectro SERS da solução de DMSA do que na amostra de FM-DMSA, quando ambas estão adsorvidas no substrato de prata. Provavelmente, este comportamento está associado ao maior número de átomos de enxofre não complexados (portanto disponível para se ligar aos átomos de Ag do substrato) presentes na solução de DMSA, quando comparado com o número de átomos de enxofre disponíveis na amostra de FM-DMSA.

Ao analisar a região espectral de 400 a 800 cm^{-1} (ver Figura 4.22 (b)) verifica-se a presença de modos vibracionais envolvendo as diferentes ligações do enxofre (ver Tabela 4.4). Já a região espectral associada ao grupo carboxílico, (1200 e 1600 cm^{-1}) apresenta modos vibracionais bem mais definidos e intensos do que os observados nos espectros Raman convencional e SERS do DMSA pó e solução, respectivamente (ver Figuras 4.22 e 4.20). Este comportamento pode ser explicado levando-se em conta que o grupo funcional COO^- do DMSA, ligado na superfície das nanopartículas de maguemita, estão voltado para o meio aquoso. Como resultado, os terminais carboxilato do DMSA tem uma maior probabilidade de interagir com a superfície do filme de prata. Que por sua vez, promove uma maior intensificação do sinal Raman para esse grupo. Além do mais, a ausência da banda em ~ 1650

cm^{-1} , associado ao modo stretching ($C = O$), observado nos espectro Raman do DMSA pó e SERS do DMSA-solução, sugere a inexistência de terminais carboxil na amostra de FM-DMSA (ver Tabela 4.4) demonstrando, assim, que este sistema (FM-DMSA) apresenta uma superfície altamente reativa.

Os resultados descritos acima permitem inferir que o DMSA está adsorvido na superfície da nanopartícula de maguemita, tomando diferentes conformações, mas sempre mantendo o grupo carboxilato voltado para o meio aquoso. Uma representação esquemática desta hipótese é mostrada na Figura 4.19 (a). Vale ressaltar que esta proposta está de acordo com outros trabalho na literatura [35, 143].

Os espectros SERS das amostras anti-CEA puro e FM-antiCEA são mostrados na Figura 4.23 (a) e (b), respectivamente. Os espectros mostram bandas bem definidas, que quando ajustadas com funções lorentzinas, permitem verificar que todas as bandas presentes no espectro do amostra anti-CEA livre estão também na amostra FM-antiCEA (ver bandas coloridas de azul na Figura 4.23 (b)). Também é verificado que as energias vibracionais associadas ao anti-CEA livre e o conjugado nas nanopartículas (FM-antiCEA) praticamente não sofrem qualquer alterações (ver Tabela 4.5). Essa observação é uma evidência de que a metodologia empregada na conjugação do anti-CEA praticamente não leva à processos de desnaturação relevantes, de modo que, em princípio, todas as funções biológicas do anticorpo são preservadas. Também pode ser verificado que os modos vibracionais típicos da molécula de DMSA adsorvido na superfície das nanopartículas (bandas coloridas de verde) e da interação da amostra com o substrato de prata (bandas coloridas em cinza) estão presentes no espectro. As atribuições destas bandas podem ser encontrada na Tabela 4.4.

Para melhor compreender as atribuições das bandas vibracionais presentes no espectro SERS da amostra de FM-antiCEA é conveniente apresentar a estrutura molecular do anti-CEA. Este anticorpo pertence à classe das imunoglobulinas (IgG)

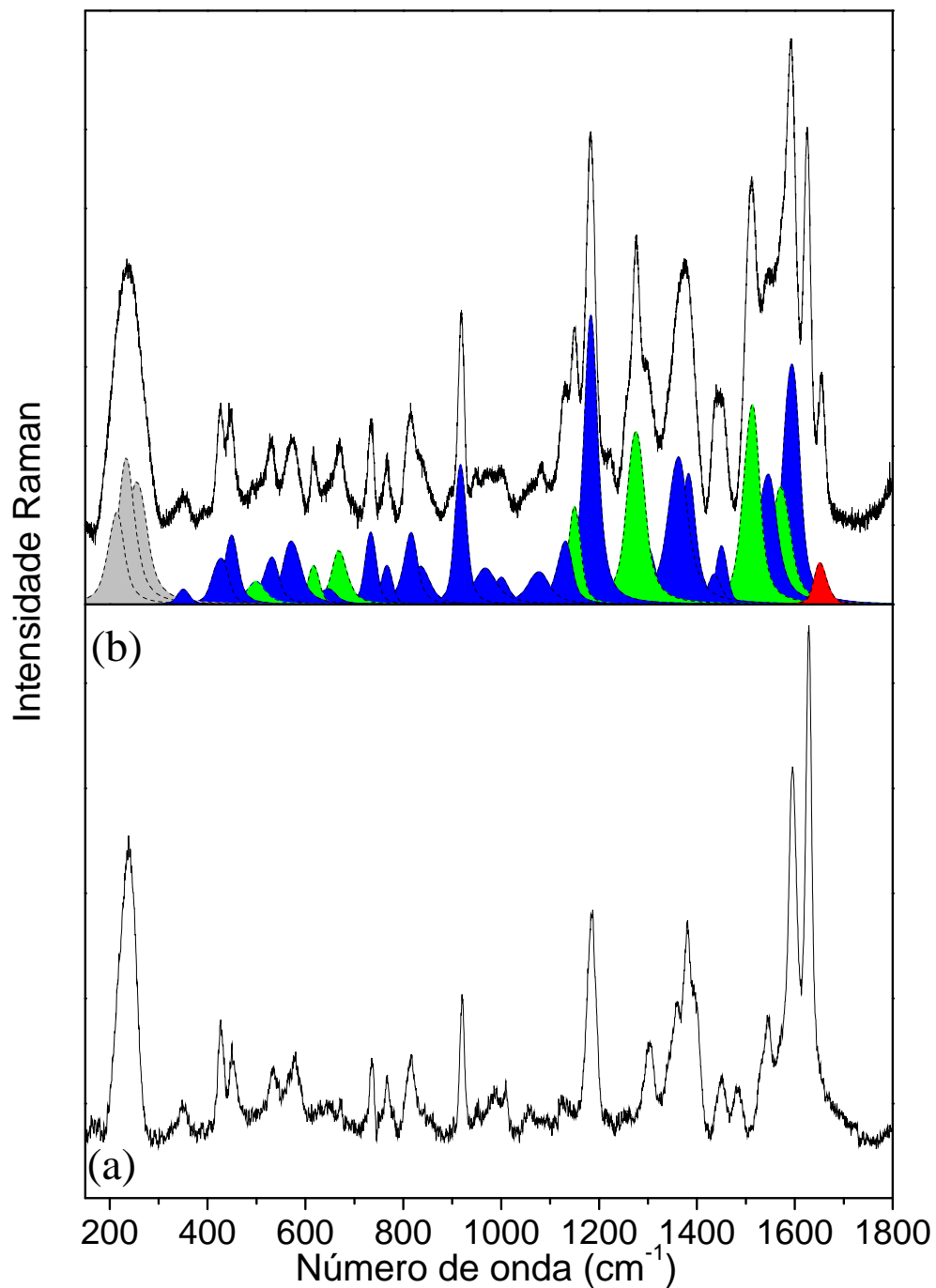


Figura 4.23: Espectro SERS do anti-CEA em solução (a) e da amostra FM-antiCEA (b).

[144], que são compostos por aminoácidos que se organizam formando uma estrutura do tipo Y (ver Figura 4.24 (a)). Esta estrutura é constituída basicamente por duas cadeias centrais comuns: duas cadeias pesadas, onde cada uma tem um domínio variável (V_H), 3 constantes (C_H1 , C_H2 , C_H3) e duas leves (V_L e C_L). Uma cadeia leve têm 110 aminoácidos em V_L e 110 aminoácidos em C_L . Já a cadeia pesada tem 110 aminoácidos em V_H e de 340 à 440 em C_H . Os aminoácidos no anti-CEA organizam-se em cadeias por ligações peptídicas de modo que formam uma estrutura chamada de β folha [145]. A sequência de aminoácidos antiCEA, cuja composição química é $C_{6398}H_{9900}N_{1714}O_{1995}S_{54}$ pode ser observada na referência [146].

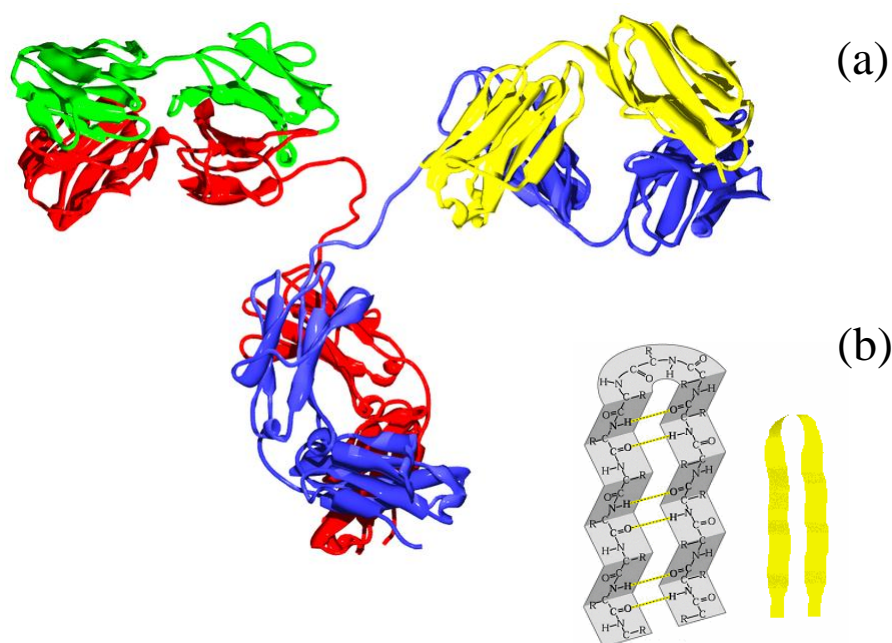


Figura 4.24: (a) Representação da estrutura da imunoglobulina (IgG) (adaptado de [147]). (b) Estrutura secundária de uma proteína do tipo β -folha (adaptado de [148])

Não foi encontrado na literatura espectros SERS específico do anticorpo anti-CEA, contudo para comparação, o espectro SERS, realizado em coloide de *Au*, da imunoglobulina (IgG) anti-rato pode ser observado no trabalho de Dou X. *et al.*

[149]. No espectro SERS mostrado, são observados os modos vibracionais referentes ao grupo amida (1645 e 1261 cm^{-1}) e a vibrações do aminoácido Triptofano (Trp) (1467 , 1112 and 880 cm^{-1}). Angela M. Ahern *et al.* [150], também utilizou a técnica SERS, com coloide de Au, para estudar o anti-IgG de coelho. Neste trabalho foi verificado bandas em 1002 cm^{-1} (Fenilalanina-Phe), 1011 cm^{-1} (Trp) e 1033 cm^{-1} (Phe) atribuídas a vibrações dos anéis aromáticos desses aminoácidos. A deformação das ligações CH (1337 cm^{-1}) e CH_2 (1450 cm^{-1}) também foram observadas. Modos vibracionais atribuídos à amida I e III foram encontrados em 1650 - 1670 , 1239 cm^{-1} , respectivamente.

Os espectros SERS obtidos para as amostras anti-CEA e FM-antiCEA, estudadas neste trabalho, apresentam um número maior de modos vibracionais do que os observados nos trabalhos acima citados. Na região entre 150 - 400 cm^{-1} (bandas em cinza na Figura 4.23 (b)) são observados modos associados à interações da amostra FM-antiCEA com o substrato de prata, ou seja, modos em 221 , 237 e 250 cm^{-1} , atribuídos respectivamente às vibrações do $Ag-O$, $Ag-N$ e $Ag-S$ ou $Ag-COO^-$, provavelmente proveniente do carboxilato do anticorpo. Nitrogênios do grupo amina do anticorpo também podem interagir com o substrato de prata, gerando modos vibracionais em torno de 350 cm^{-1} [151,152]. Assim, é possível afirmar que o anti-CEA interage com o substrato de prata tanto pelo grupo amina quanto pelo grupo carboxilato.

No espectro SERS da amostra de FM-antiCEA são identificados modos associados também ao DMSA (bandas em verde na Fig. 4.23 (b)): 499 , 617 , 670 , 1149 , 1275 , 1511 e 1572 cm^{-1} correspondentes aos seguintes modos vibracionais $H-C-(S-S)-C-H$, $\nu_s[(C-S)-S]$, $\nu_s[(C-S)-H\text{ trans}]$, $\nu(C-C)$, $\nu(C-O)+\delta(OH)$, ν_sCOO^- e $\nu_{as}COO^-$, respectivamente. Vale ressaltar que com exceção das bandas proveniente do carboxilato (1511 e 1572 cm^{-1}) do DMSA, os demais modos vibracionais têm a mesma energia dos modos do DMSA encontrados

Tabela 4.5: Posição dos modos vibracionais para o anti-CEA livre e para FM-antiCEA.

Amostras		Tentativa de atribuições
SERS (cm^{-1})		
anti-CEA	FM-antiCEA	
221	213	Ag - O
237	234	Ag - N
250	256	Ag - COO ⁻
350	352	Ag - N grupo amina
426	426	CCN rocking
452	447	CCN rocking
	499*	H - C - (S - S) - C - H
533	529	ν S - S
577	572	γ (NH ₂)
	617*	ν_s (C - S) - S
650	645	γ (COO ⁻)
	670*	ν_s (C - S) - H trans
735	734	δ (COO ⁻)
767	766	Trp
815	814	Tyr
844	837	C - CH ₃
918	920	ν (C - COO ⁻)
984	968	ν (C - N)
1009	1001	Phe
1060	1076	ν (C - C)
1126	1129	ρ NH ₂
	1149*	ν (C - C)
1184	1183	C-OH
	1223	amida III
	1275*	ν (C - O)+ δ (OH)
1301	1302	δ (CH ₂) e (CH ₃)
1356	1361	δ (CH)
1381/1398	1383	ν (COO ⁻)
1451	1439	δ (CH ₂ , CH ₃)
1482	1451	γ (CH ₂ , CH ₃)
	1511*	ν_s (COO ⁻)
1544	1544	Amida II
	1572*	ν_{as} (COO ⁻)
1595	1593	δ (NH ₂)
1629	1625	Amida I
	1655	C=O

* modos associados ao DMSA, ν -stretching, δ -bending, γ -wagging, ρ twisting

Triptofano - Trp, Tirosina - Tyr, Fenilalanina - Phe

referências [151-161]

na amostra FM-DMSA. As alterações energéticas dos modos vibracionais referentes ao carboxilato podem estar associadas ao processo de conjugação do anti-CEA com a molécula de DMSA por meio da união de um grupo amina do anticorpo com grupo carboxílico do DMSA, formando uma amida secundária. Demonstrando assim, que apenas os grupos carboxilato do DMSA têm efetiva interação com o anticorpo anti-CEA.

As demais bandas observadas (bandas em azul) são associadas aos aminoácidos que formam o anticorpo (ver Figura 4.24 (b)). Na região entre 500-600 cm^{-1} verificam-se bandas características do modo *rocking* da ligação $C - C - N$ (426 cm^{-1}) [153], modo *stretching* da ligação $S - S$ (529 cm^{-1}) [154] e *wagging* do grupo amina NH_2 (572 cm^{-1}) [155]. Entre 530 e 740 cm^{-1} são encontrados os modos *wagging* das ligações NH_2 (572 cm^{-1}), assim como a deformação do modo COO^- (645 cm^{-1}) [152, 156]. Na região entre 740 e 1400 cm^{-1} têm-se os modos associados às ligações peptídicas, entre outras: *stretching* da ligação $N - H$ do tripofano em 766 cm^{-1} , da tirosina em 814 cm^{-1} e da fenilalanina em 1001 cm^{-1} [157].

Os modos encontrados em 837, 918, 984, 1076, 1183, 1223 cm^{-1} são atribuídos às respectivas ligações: $C - CH_3$, $C - COO^-$, $C - N$, $C - C$, $C - OH$ e dobramento da ligação $N - H$ do grupo amida III. Por fim, os modos vibracionais *twisting* do grupo amina NH_2 , *wagging* do CH_2 , deformação da ligação $C - H$ e *stretching* do grupo carboxilato COO^- são encontrados em 1129, 1381, 1361 e 1383 cm^{-1} , respectivamente [143, 156, 158, 159, 162].

Na região de mais alta energia, 1400-1800 cm^{-1} , verificam-se a presença dos modos vibracionais referentes à deformação do CH_3 (1439 cm^{-1}) e ao dobramento do $C - H_2$ (1451 cm^{-1}). A banda referente ao grupo amida II (NH acoplado com *stretching* do CN) pode ser encontrada em 1544 cm^{-1} . Já em 1593 e 1625 cm^{-1} são observadas vibrações *bending* do NH e o *stretching* do $C = O$ do grupo amida I. As energias vibracionais encontradas para os grupos amida I (1625 cm^{-1}), amida II

(1544 cm^{-1}) e amida III (1223 cm^{-1}) são típicos da estrutura β -folha, confirmando que o anti-CEA se organiza nesta estrutura [154, 157, 158]. Vale ressaltar que as vibrações das estruturas tipo α -helix, típicos de outros anticorpos, apresentam modos vibracionais mais energéticos [161].

Um importante ponto a ser notado é a presença de um novo pico (1655 cm^{-1}) no espectro da amostra FM-antiCEA (ver Figura 4.25 (b) - banda em vermelho). É importante ressaltar que este modo não foi observado nos espectros SERS da amostra FM-DMSA (Figura 4.22 (a)) bem como da amostra anti-CEA (Figura 4.25 (a)). Segundo Frank S. Parker [154] este modo vibracional está associado ao modo *stretching* do $C = O$ de amidas secundárias. Assim, é razoável supor que o modo vibracional em 1655 cm^{-1} está associado à vibração da carbonila formada após a conjugação do anticorpo com a nanopartícula pré-coberta, pois o grupo amina do anticorpo ao se ligar ao DMSA forma uma amida secundária. Essa configuração pode ser observada na Figura 4.19 (b). Portanto, pode-se afirmar que a amostra produzida (FM-antiCEA) foi sintetizada com sucesso, de modo que as nanopartículas de maguemita carregam em sua superfície o anti-CEA.

A importância da estratégia empregada neste sistema reside no fato de que a maioria dos trabalhos que empregam o SERS no estudo da imunomarcação, utilizando anticorpos, usam agentes de marcação SERS, normalmente corantes, para obter informações sobre o anticorpo e o antígeno. De modo que o espectro observado não é a proteína em si e, sim o corante [125]. Portanto, o sucesso em se verificar a presença do anticorpo sem a utilização de corantes, traz novas perspectivas na avaliação de sistemas biológicos nanoparticulados utilizando o SERS.

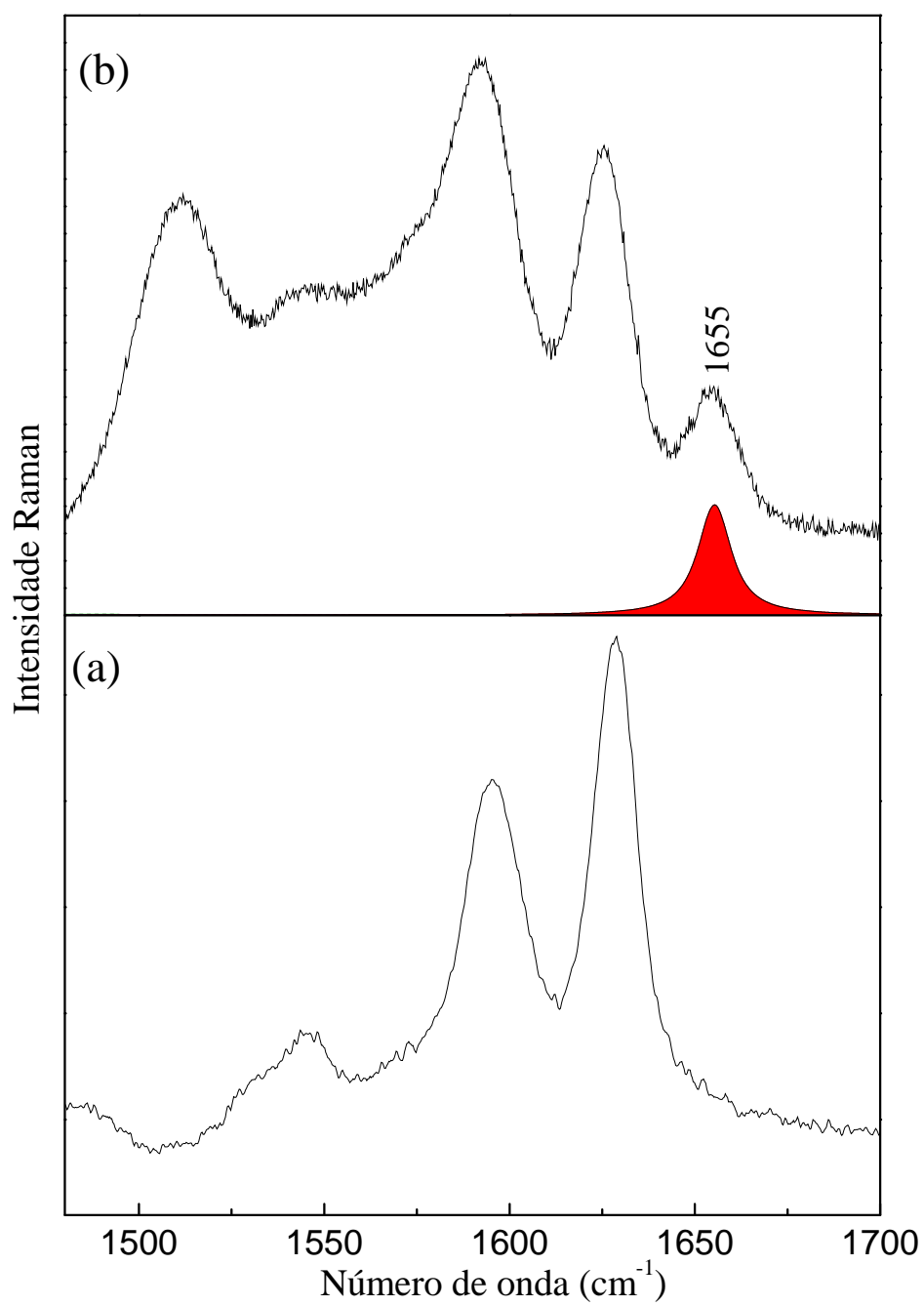


Figura 4.25: Espectro SERS na região de 1450 - 1700 cm⁻¹ das amostras (a) anti-CEA em solução e (b) FM-antiCEA.

4.3.4 Conclusão

Nesta seção a técnica SERS foi utilizada no estudo da conjugação do anticorpo antiCEA nas nanopartículas magnéticas pré-cobertas com DMSA. Os resultados experimentais evidenciaram que o DMSA está adsorvido na superfície das nanopartículas, tomando diferentes conformações, mas sempre mantendo o grupo carboxilato voltado para o meio aquoso. Além do mais, foi verificado que, devido à ausência das ligações $C = O$, o sistema FM-DMSA apresenta uma superfície altamente reativa, sendo, portanto adequada para receber uma nova camada molecular. A conjugação do anticorpo anti-CEA com as moléculas de DMSA adsorvidas na superfície das nanopartículas foi comprovada por meio das alterações energéticas dos modos vibracionais referentes ao carboxilato do DMSA adsorvido e, pelo surgimento do modo *stretching* associado à ligação $C = O$ no espectro da amostra FM-antiCEA. Esses comportamentos estão vinculados ao processo de conjugação do anti-CEA com a molécula de DMSA por meio da união de um grupo amina do anticorpo com o grupo carboxílico do DMSA, formando uma amida secundária. Outro importante resultado é o fato de que o processo de conjugação do anti-CEA ao DMSA adsorvido não leva a processos de desnaturação da proteína. O que em princípio, preserva todas as funções biológicas do anticorpo anti-CEA.

4.4 Investigação da potencialidade da técnica SERS no estudo de sistemas *in vivo*

Os resultados que serão mostrados nesta seção têm como objetivo apresentar a potencialidade da técnica SERS no estudo de sistemas *in vivo*. Para isso serão apresentados dois trabalhos em diferentes fases de conclusão e , portanto, necessitam de mais investigações.

Inicialmente serão apresentados o estudo SERS das modificações observadas nos pulmões de camundongos afetados pela Pbmicose e tratados com FMBL-AmB (fluido magnético recoberto com bicamada de laurato como carreador do fármaco anfotericina B - ver Seção 4.2). Em seguida, será realizado um estudo da possibilidade de nanopartículas magnéticas encapsuladas em albumina bovina atravessarem a barreira hemato-encefálica de camundongos, ao serem injetadas na corrente sanguínea dos mesmo.

4.4.1 Uso da técnica SERS no estudo do Sistema de Entrega de Drogas FMBL-AmB no tratamento da Pbmicose em Camundongos

Introdução

A Pbmicose é uma doença sistêmica que representa um preocupante problema de Saúde Pública no Brasil. Dentre os seus efeitos mais nocivos, destacam-se o alto potencial incapacitante e as mortes prematuras. Caracteriza-se por ser uma doença crônica que se inicia pela inalação do fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* [163]. Esse se instala nos alvéolos pulmonares provocando inicialmente lesões no pulmão e, sem o tratamento adequado, se dissemina para outros órgãos do corpo [164]. No Brasil, esta enfermidade atinge populações de segmentos sociais específicos, como os trabalhadores rurais, que por dificuldade de acesso aos serviços de saúde são diagnosticados tardiamente [165]. Normalmente quando a doença alcança níveis graves ou quando os pacientes têm deficiência imunológica, o tratamento é feito utilizando o fármaco anfotericina-B (AmB) [166], que como citado na Seção 4.2, apresenta efeitos colaterais severos tais como febre, calafrios, hemólises e nefrotoxicidade [165, 167]. Assim, de modo a minimizar os intensos efeitos tóxicos da AmB, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de desenvolver sistemas de entrega de drogas, com o qual seja possível controlar a concentração da droga no local desejado e melhorar a eficiência do tratamento de doenças fúngicas [95, 167]. No trabalho de Hiroshi Fukui *et al.* [167] foi desenvolvido um sistema de entrega do fármaco AmB baseado em nano-esferas lipídicas como agente carreador. Como resultado verificaram que o tratamento teve sucesso mesmo com baixa dosagem de AmB, o que promoveu a diminuição dos efeitos tóxicos. Assim, com o objetivo de desenvolver sistemas de entrega de drogas para o tratamento da Pbmicose, pesquisadores ligados ao Instituto Nacional de Tecnologia: Nanobiotecnologia têm imprimido esforços na

produção de um sistema de entrega de drogas baseado na associação de anfotericina B com nanopartículas magnéticas [168].

Com o surgimento de novos métodos de diagnose e terapia (tais como sistema de entrega de drogas, biomarcadores, sensores biológicos, agentes de contraste etc) para as mais diversas enfermidades, torna-se necessário o desenvolvimento e a utilização de diferentes técnicas e/ou metodologias para o estudo e acompanhamento desses novos procedimentos. Várias técnicas espectroscópicas, por serem não destrutivas e minimamente invasivas, têm sido empregadas [169]. Nesse contexto a espectroscopia Raman tem ganhado muito espaço, pois tem se mostrado uma técnica instrumental eficaz e promissora na análise de materiais biológicos. No *review* de Leonardo *et al.* [170] é relatado vários trabalhos que utilizaram a espectroscopia Raman no diagnóstico de várias doenças, como por exemplo, arteriosclerose, câncer, doenças de pele como vitiligo e outros. Vários outros trabalhos têm exemplificado a versatilidade da espectroscopia Raman em aplicações biomédicas [171–173]. Contudo, como relatado anteriormente, a espectroscopia Raman convencional apresenta limitações que podem ser superadas pela técnica SERS, a qual tem sido amplamente utilizada na caracterização de uma grande variedade de analitos relevantes na biologia e na química inorgânica [174–176].

Assim, esta seção tem como finalidade mostrar o potencial da técnica SERS no estudo do tratamento da Pbmicoose em camundongos, utilizando para isso um sistema constituído da associação de anfotericina B com nanopartículas magnéticas (FMBL-AmB), como estudado na Seção 4.2. Foram investigas amostras de pulmões de camundongos infectados com Pbmicoose e tratados com: solução de PBS, nanopartículas recobertas com bicamada de ácido láurico (FMBL), anfotericina B livre e nanopartículas recobertas com bicamada de ácido láurico e anfotericina B (FMBL-AmB). Vale ressaltar que este trabalho ainda não está finalizado e, portanto, outros estudos devem ser realizados.

Metodologia

Preparação das amostras e dos substratos

a) Amostras

Quatro amostras de pulmões de camundongos infectados com *Pbmico*se foram analisados após 60 dias de tratamento: tratado com PBS (PIPb-PBS), tratado apenas com nanopartículas recobertas com bicamda de ácido láurico (PIPb-FMBL), tratado com AmB livre (PIPb-AmB) e tratado com FMBL-AmB (PIPb-FMBL-AmB). E um pulmão sadio foi usado como referência. Para o tratamento, 80 μ L das diferentes drogas foram administradas por instilação nasal. As dosagens e periodicidade do tratamento podem ser encontrados na Tabela 4.6. Detalhes da preparação das amostras utilizadas podem ser encontradas no trabalho de Camila de Arruda Saldanha [168].

Tabela 4.6: *Dosagens e periodicidade dos tratamentos empregados nas amostras de pulmões sadio e infectados com Pbmico*se.

Amostras	Concentração AmB	Periodicidade
PS	-	-
PIPb-PBS	-	3 em 3 dias
PIPb-FMBL	40 μ g/100 μ L	3 em 3 dias
PIPb-AmB	-	diária
PIPb-FMBL-AmB	60,8 μ g/80 μ L	3 em 3 dias

b) Preparação do substrato e das Amostras.

Os substratos SERS utilizados foram obtidos pelo processo de eletrólise como descrito na seção 3.3.2. Para a obtenção dos espectros, cada amostra de pulmão foi congelada com nitrogênio líquido e macerado em um eppendorf contendo água destilada. Em seguida, 20 μ L dessa solução foi depositado sobre o substrato SERS e secos com fluxo de nitrogênio. Os espectros SERS, adquiridos imediatamente após a secagem, foram obtidos usando a linha 514.5nm do laser de íon Argônio, na

configuração de quase *backscattering* (ver seção 3.2).

Resultados e discussão

Na Figura 4.26 são mostrados os espectros SERS das cinco amostras estudadas: (i) PS, (ii) PIPb-PBS, (iii) PIPb-FMBL, (iv) PIPb-AmB e (v) PIPb-FMBL-AmB. Verifica-se da Figura 4.26 que os espectros SERS das amostras provenientes dos pulmões infectados, a exceção de alguns picos extras observados no espectro da amostra PIPb-FMBL, são muito semelhantes entre si. É observado também que, mesmo apresentando bandas em comum aos espectros dos pulmões infectados, o espectro SERS obtido a partir do pulmão sadio apresenta características distintas dos demais. Esses resultados demonstram que a técnica SERS é sensível às diferenças específicas entre as amostras obtidas a partir do tecido pulmonar infectado e sadio, confirmando o potencial da técnica na análise de materiais biológicos. Assim, com o objetivo de se fazer uma análise cuidadosa dos dados, todos os espectros SERS foram inicialmente normalizados, dividindo-os pela sua área integrada no intervalo de 300 a 2000 cm^{-1} , e posteriormente ajustados com curvas lorentzianas. As energias vibracionais das bandas Raman observadas para as amostras de pulmão saudável e infectado podem ser encontradas na Tabela 4.7.

De acordo com a literatura [179] os espectros Raman do tecido bronquial são dominados por um grande número de modos vibracionais de biomoléculas, tais como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, os quais podem ser alterados em quantidade ou forma. Contudo, uma comparação entre os espectros Raman do tecido pulmonar exibidos na literatura [162, 179, 180] e os espectros SERS aqui apresentados mostram características distintas. Assim, para se fazer uma correta identificação dos modos Raman foi necessária uma cuidadosa busca na literatura.

Partindo do princípio que o pulmão é um órgão do sistema respiratório, responsáveis pelas trocas gasosas entre o ambiente e o sangue, e este tem como

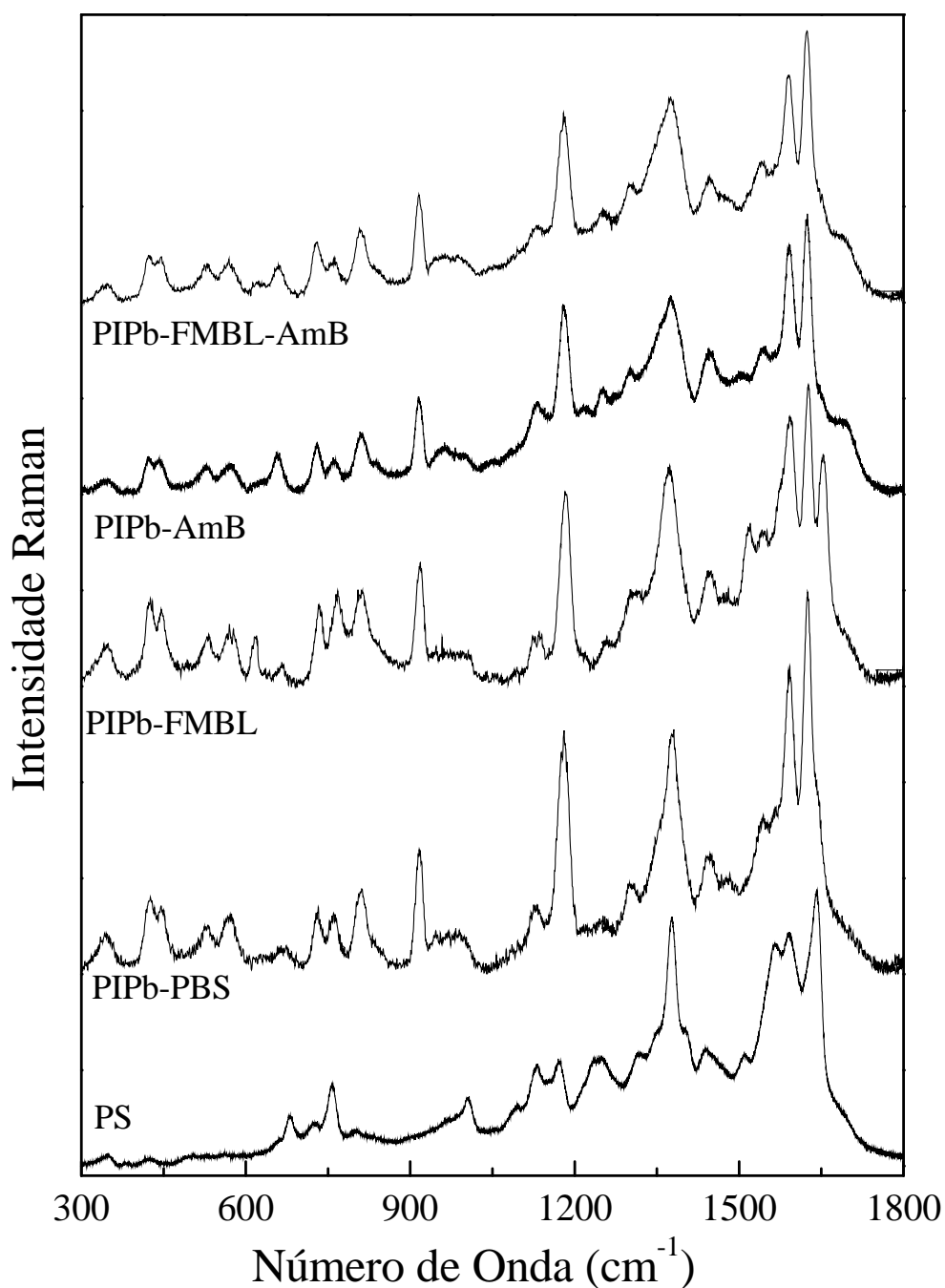


Figura 4.26: Espectros SERS das amostras de pulmão sadio (PS) pulmão infectado com Pbmicose e tratadas com diferentes drogas. Tratados com: PBS (PIPb-PBS), nanopartículas recobertas com bicamada de ácido láurico (PIPb-FMBL), tratado com anfotericina B (PIPb-AmB)) e tratado com nanopartículas recobertas com bicamada de ácido láurico e Anfotericina B (PIPb-FMBL-AmB))

Tabela 4.7: *Posições dos modos vibracionais observados, na região de 150 a 1800 cm^{-1} , para as amostras de Pulmões infectados e sadio.*

Amostras - SERS (cm^{-1})			Tentativa de atribuições
PS	PIPb-PBS	PIPb-FMBL-AmB	
227	218	221	$\nu(Ag - N)$
248	242	244	$\nu(Ag - COO^-)$
347	345	346	$\nu(Ag - N)$ grupo amina
423	424	422	$\delta(Fe - O - O)$
	446	444	
	526	527	$\delta_{as}(C_\alpha C_\beta C_{beta})$
	571	570	$\nu(FeO_2)$
	669	657	$\delta_s(C_\beta C_\alpha N)$
680			$\delta_{as}(pirrol)$
723	731	729	$\nu_s(C_\beta - vinyl)$
757	760	760	$\nu_s(C_\beta - vinyl)$
	811	809	$\delta_s C_m H$
	916	915	$\gamma(C_b H_2)$
972	987	990	$\nu_{ss}(C_\beta C_1)$
1005			Phe
1131	1125	1128	$\nu_s(C_\beta - metil)$
1171	1180	1180	$\nu_{as}(C_\beta - vinyl)$
1230			$\delta(C_m H)$
1314	1301	1300	$\delta(C_m H)$
1348	1346	1351	$\nu(anelpirrol)_{as}$
1377	1378	1379	$\nu(anelpirrol)_{as}$
1405			$\nu_{as}(C_\beta C_\alpha)$
1437	1445		CH_2/CH_3
1461			$\nu(C_\alpha C_\beta)$
1479	1481	1480	$\nu(C_\alpha - C_m), \nu(C_\alpha C_\beta)$
1507			$\nu(C_\beta C_\beta)$
1541	1540	1541	$\nu(C_\beta C_\beta)$
1562	1566	1566	$\nu(C_\beta C_\beta)$
1594	1592	1591	$\nu(C_\alpha C_m)_{as}$
	1625	1624	$\nu(C_b = C_b)$
1642	1645	1650	amida I

ν -stretching, δ -bending, γ -wagging,
s-simétrico e as-assimétrico, Phe-fenilalanina
referências [18, 177, 178]

função a manutenção da vida do organismo por meio do transporte de nutrientes, toxinas (metabólitos), oxigênio e gás carbônico, foi natural começar a busca por ele. O sangue é constituído por diversos tipos de células, que compõe sua parte “sólida”. Estas células são classificadas em leucócitos (glóbulos brancos), que são células de defesa; eritrócitos (hemácias), responsáveis pelo transporte de oxigênio e plaquetas, que promove a coagulação sanguínea. Tanto os leucócitos quanto os eritrócitos são ricos em proteínas hémicas, as quais contém grupos hemes (complexos Ferro-porfirina - ver Figura 4.27), e são justamente as vibrações moleculares deste grupo as responsáveis pelas principais características dos espectros SERS obtidos a partir das amostras de pulmões aqui estudadas. Além do mais, é conhecido da literatura que a porfirina, por apresentar uma extensa delocalização dos elétrons π favorece a interação com a superfície metálica, proporcionando assim uma grande intensificação SERS [43]. Tanto Woode e McNaughton [18] ao estudarem eritrócitos, quanto Sejtsema *et al.* [178] e Otto *et al.* [177] ao estudarem neutrófilos, observaram espectros Raman Ressonantes com características muito próximas às aqui observadas.

Para melhor entender a base molecular dos modos vibracionais Raman observadas nos espectros SERS, uma tentativa de atribuição destes modos pode ser encontrada na Tabela 4.7 [18, 177, 178]. Os espectros mostram uma mistura de bandas do macrociclo do complexo protoporfirina IX de ferro e componentes protéicas. As bandas protéicas incluem a amida I em 1642 cm^{-1} , os modos de deformação CH_2/CH_3 das cadeias de aminoácidos em 1437 cm^{-1} e a banda fenilalanina em 1005 cm^{-1} . Para a atribuição dos modos vibracionais do complexo protoporfirina IX de ferro foi utilizado como modelo a simetria planar D_{4h} da porfirina, uma vez que esta tem uma boa aproximação para a simetria idealizada do grupo heme [181]. A atribuição dos modos vibracionais do complexo protoporfirina IX de ferro pode ser encontrada na Tabela 4.7. Uma análise completa desta atribuição é extensa e tediosa, não sendo, portanto, de interesse deste trabalho. Um estudo completo da

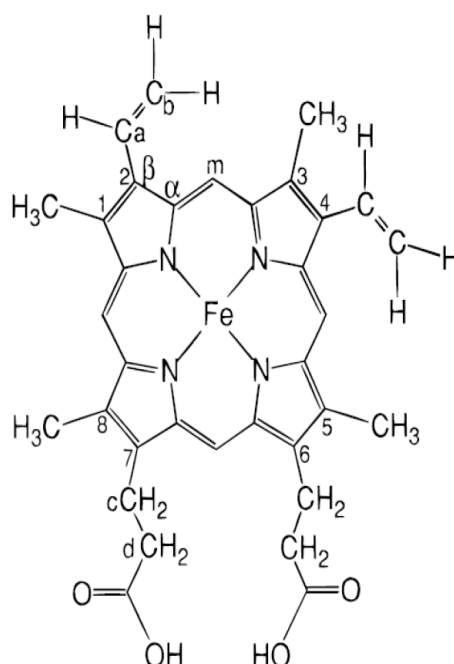


Figura 4.27: Estrutura molecular da protoporfirina IX de ferro

atribuição dos modos vibracionais do complexo protoporfirina IX de ferro pode ser encontrada na referência [182].

As bandas vibracionais situadas na região de $1500 - 1650 \text{ cm}^{-1}$ estão relacionadas às vibrações das ligações moleculares próximas ao núcleo central do complexo ferro-porfirina (ver Figura 4.27) e, portanto, estão associadas aos seus diferentes estados de oxigenação. De acordo com o trabalho de Wood *et al.* [183], ao estudar o estado de oxigenação de eritrócitos, as intensidades relativas dos picos Raman de mais altas energias estão ligadas diretamente ao estado de oxigenação da célula. Por exemplo, eles verificaram que as intensidades dos picos em 1548 e 1526 cm^{-1} (ambas $\nu(C_\beta C_\beta)$), e 1212 cm^{-1} ($\delta(C_m H)$) crescem fortemente, enquanto dos picos em 1639 ($\nu(C_\alpha C_m)_{as}$), 1620 cm^{-1} ($\nu(C_b = C_b)$), 1566 ($\nu(C_\beta C_\beta)$), e 1223 cm^{-1} ($\delta(C_m H)$) decrescem, ambas quando os eritrócitos passam do estado oxigenado para o deoxigenado. Deslocamentos nas energias vibracionais de alguns picos também foram relatados.

O grupo heme (protoporfirina IX de ferro) tem importante papel regulador em vários processos celulares e moleculares, tais como transcrição do gene, translocação e montagem de proteínas, diferenciação e proliferação celular, entre outras. Além do mais, níveis elevados de heme livre induzem efeitos pró-inflamatórios e a *stress* oxidativos, causando danos aos tecidos. O *stress* oxidativo pode agir de forma benéfica ao organismo quando usados pelo sistema imunológico no combate e na aniquilação de agentes patogênicos. Neste caso, os processos oxidativos são produzidos por células fagocíticas (granulócitos, monócitos e macrófagos) que têm como função reconhecer, engolfar e destruir corpos estranhos que invadem o organismo. Neste processo, os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) preparam potentes agentes químicos para destruir o patógeno. Os neutrófilos, são provavelmente os mais ativos granulócitos na destruição de microorganismo que invadem o corpo [177]. Para isso, os neutrófilos utilizam-se da proteína citocromo b_{558} e da enzima mieloperoxidase, as quais são ambas hemoproteínas, e são cruciais na resposta imune dos neutrófilos, em virtude de sua capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio, que contribuem para matar os agentes patogênicos. A degradação destes ocorre ao serem expostos à altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS), peptídeos microbicidas e proteases. A libertação destes agentes destrutivos na fagocitose é mediada pela enzima NADPH oxidase (*nicotinamide ademine dinucleotide phosphate*), que atua como um doador de elétrons, os quais são transferidos para os oxigênios moleculares. O ânion superóxido (O_2^-) produzido é em si um potente assassino. A fim de gerar O_2^- suficiente, os neutrófilos aumentam seu consumo de oxigênio, e o O_2^- é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hiperclórico, utilizando-se da enzima superóxido dismutase.

Com base na discussão acima, é possível concluir que a ativação dos neutrófilos pela infecção fúngica é responsável pela clara alteração nos espectros SERS obtidos a partir das amostras de pulmões infectados. Estas alterações podem ser

explicadas levando-se em conta as mudanças no estado de redox da proteína b_{558} e da enzima mieloperoxidase. Como pode ser observado na Figura 4.26 e na Tabela 4.7 as bandas em 680, 1005, 1230, 1314, 1405 cm^{-1} estão presentes somente no espectro SERS obtido a partir do pulmão sadio. Já as bandas localizadas em 424, 446, 526, 571, 811, 916 cm^{-1} só foram observadas nos espectros SERS obtidos das amostras dos pulmões infectados, tratados ou não. Foram ainda verificadas variações nas intensidades relativas de diferentes bandas, como por exemplo as bandas em 731, 1180, 1592 e 1625 cm^{-1} tiveram suas intensidades relativas aumentadas, enquanto as bandas 760, 1005, 1378, 1562 e 1644 cm^{-1} tiveram suas intensidades relativas diminuídas, ambas com relação ao espectro do pulmão sadio. Outro fato interessante a ser notado é que no espectro SERS obtido da amostra tratada apenas com as nanopartículas recobertas com a bicamada de ácido láurico (PIPb-FMBL) foram observados bandas adicionais em 617, 1519, 1654 cm^{-1} . Esses resultados, em concordância com o trabalho de Wood *et al.* [183], indicam que o processo infeccioso induz um aumento no consumo de oxigênio por parte dos neutrófilos, que como resultado leva às modificações observadas entre os espectros da amostra de pulmão sadio quando comparada com as amostras de pulmões infectados. Por exemplo, a banda assinalada $\nu(C_{\beta}C_{\beta})$, o qual aparece em 1562 cm^{-1} na amostra de pulmão sadio, tem sua intensidade diminuída nas amostras infectadas com Pbmucose. Já as bandas atribuídas às ligações $\nu(C_{\alpha}C_m)_{as}$ (1592 cm^{-1}), $\nu(C_b = C_b)$ (1625 cm^{-1}) têm suas intensidade aumentadas nas amostras infectadas. Outras evidências do processo de super-oxigenação dos neutrófilos são o aparecimento dos picos da ligação $Fe - O$, observados em 426 cm^{-1} ($\delta(Fe - O - O)$) e 571 cm^{-1} ($\nu(Fe - O_2)$), nas amostras infectadas. Além do mais, como as ligações F-O estão fora do plano formado pela complexo ferro-porfirina, elas induzem a quebras da simetria dos modos vibracionais próximos ao núcleo central do grupo heme e por esta razão há um aumento das intensidade relativas de modos anti-simétricos (731, 1180 e 1592 cm^{-1}), diminuição

da intensidade relativa de modos simétricos (760 , 1378 e 1562 cm^{-1}) e o surgimento de modos vibracionais fora do plano, como o caso das picos em 811 e 916 cm^{-1} . Uma explicação para o surgimento das bandas extras no espectro SERS da amostra tratada apenas com as nanopartículas recobertas com a bicamada de ácido láurico, ainda não é clara. Provavelmente, estas bandas podem estar associados a novos processos inflamatórios induzidos pelas nanopartículas. Para um melhor entendimento deste efeito serão necessário mais estudos.

A fim de investigar os efeitos nos espectros SERS da aplicação de diferentes drogas (tratamento com PBS (PIPb-PBS), tratado com nanopartículas recobertas com bicamada de ácido láurico (PIPb-FMBL), tratado com Anfotericina B (PIPb-AmB) e tratado com nanopartículas recobertas com bicamada de ácido láurico e anfotericina B (PIPb-FMBL-AmB)) nos pulmões infectados com Pbmicose, todos os espectros SERS normalizados obtidos das amostras de pulmões infectados foram subtraídos do espectro do pulmão sadio (ver Figura 4.28 (a)). Nas Figuras 4.28 (b), (c) (d) e (e) são mostrados ampliações de regiões espectrais importantes. Os picos com intensidades positivos (negativos) diz respeito às bandas que tiveram suas intensidade diminuídas (aumentadas) com relação às intensidades das bandas Raman provenientes do pulmão sadio.

Note das Figuras 4.28 que as maiores diferenças de intensidades são apresentadas pelas amostras PIPb-PBS, PIPb-FMBL, ou seja aquelas que não foram tratadas com anfotericina B. É verificado que as diferenças de intensidades destas amostras é em média duas a três vezes maior que as encontradas para as amostras PIPb-AmB e PIPb-FMBL-AmB. O fato de que as diferenças espectrais das amostras tratadas com AmB serem sempre menores que as não tratadas sugerem que a administração de anfotericina B provoca uma redução da super-oxigenação dos neutrófilos, indicando assim que o processo infeccioso é menor nestas amostras que nas demais. Além do mais, a proximidade entre as diferenças das intensidades ob-

tidas das amostras PIPb-AmB e PIPb-FMBL-AmB indica que ambos tratamentos tem efeitos terapêuticos muito semelhantes. Como a quantidade de anfotericina B administrada via sistema nanoparticulado é 40 % menor que a administrada pelo método convencional é justo dizer que este tratamento apresenta vantagens sobre o tratamento convencional, uma vez que é esperado que os efeitos colaterais diminuam com a diminuição da dosagem de anfotericina B.

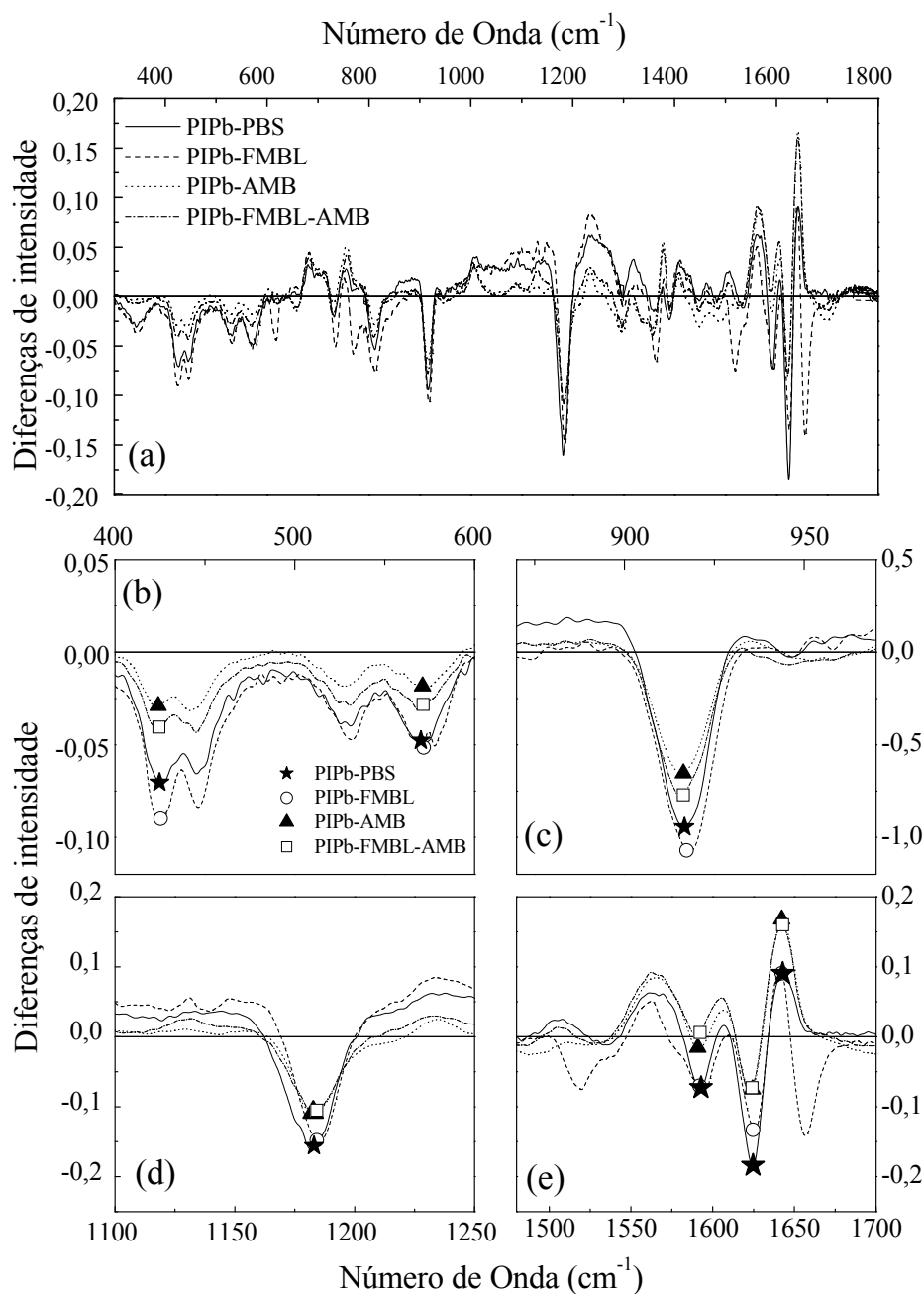


Figura 4.28: (a) Subtração entre os espectros SERS de pulmões infectados e submetidas a diferentes tratamentos (PBS, FMBL, AmB livre, FMBL-AmB) e pulmão sadio. (b), (c) (d) e (e) ampliações de regiões espectrais importantes.

Conclusão

Da análise dos espectros SERS foi possível realizar uma comparação entre a utilização das drogas Amb livre (tratamento convencional) e FMBL-AmB no tratamento da infecção por Pbmicoze em camundongos. Foi verificado que, apesar da utilização de tecido pulmonar nas medidas SERS, os espectros obtidos apresentam as mesmas características do espectro Raman do sangue. Este resultado foi explicado levando-se em conta a grande intensificação SERS favorecida pela interação das moléculas hémicas com o substrato de prata. Uma comparação entre os espectros SERS obtidos a partir das amostras de pulmões infectados e sadio mostram que as alterações espectrais observadas estão associadas ao processo de superoxigenação dos neutrófilos, induzido pela infecção fúngica. O processo de superoxigenação gera altas concentrações de espécies reativas de oxigênio que contribuem para destruir os agentes patogênicos. As variações nas intensidades relativas dos modos Raman associados a vibrações provenientes do núcleo central do complexo ferro-porfirina observados nos espectros das amostras tratadas com FMBL-AmB com relação às amostras não tratadas com AmB, evidenciam que o tratamento reduz a superoxigenação dos neutrófilos, e, conseqüentemente reduz o processo infeccioso. Além do mais, foi verificado que os dois diferentes tratamentos (Amb livre e Amb conjugado com NPs) levam ao mesmo resultado. Evidenciando, assim, que mesmo com dosagem 40 % menor, o tratamento com o sistema FMBL-AmB é tão eficiente quanto o tratamento convencional com anfotericina B.

4.4.2 Estudo SERS da possibilidade de nanopartículas magnéticas atravessarem a barreira hemato-encefálica de camundongos

Introdução

O uso de nanopartículas magnéticas como carreadores de fármacos, agentes de contraste em ressonância magnética e magnetohipertemia são algumas das vertentes da nanociência e nanotecnologia que trazem grandes perspectivas dentro da biomedicina no tratamento de diversas enfermidades, inclusive do câncer. Destaca-se a potencial utilização deste sistema no tratamento de câncer cerebral, uma vez que, além de ser uma das formas mais letais de câncer [184], o seu tratamento, pelos métodos convencionais envolve complexidades ainda a serem superadas. Como, por exemplo, a exposição subterapêutica do tecido do tumor à droga. Trabalhos recentes como o de Chertok *et al.* [185] têm proposto o uso de nanopartículas magnéticas como sistema alternativo, não invasivo, para o tratamento de câncer no cérebro, tanto por possibilitar o aumento da exposição à droga, utilizando para isso transportadores de drogas coloidais (por exemplo, lipossomas, nanopartículas), quanto por magnetohipertermia.

As atuais modalidades de tratamento de câncer cerebral, como a cirurgia e a radioterapia, são dificultadas pela acessibilidade limitada ao tumor dentro do cérebro e pelo risco de dano ao tecido normal em volta do carcinoma [184]. Além do mais, o tratamento por quimioterapia também tem se mostrado pouco eficaz. Embora potentes agentes quimioterapêuticos estejam disponíveis, a sua entrega e retenção no local do tumor após a administração sistêmica enfrenta muitos desafios. Isto ocorre devido à natureza impermeável da barreira hemato-encefálica [186]. Para contornar essa dificuldade têm-se como procedimento padrão injetar os medicamentos diretamente no crânio. Contudo, o aumento da concentração excessiva da droga

no cérebro pode levar a um quadro de neurotoxicidade. No trabalho de Chertok *et al.* [187] foi mostrado que o uso de nanopartículas magnéticas como vetores de drogas, quando aplicados pela veia carótida, conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e entregar o fármacos no sítios específicos das células cancerígenas. Além do mais, aproveitando-se das propriedades magnéticas das ferritas, que as tornam bons agentes de contraste em ressonância magnética [188], foi possível monitorar *in situ* a localização dos sistemas de entrega de drogas.

Independentemente de quais sejam as potenciais aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas é de fundamental importância minimizar o grau de toxicidade, assim como, controlar sua biodistribuição no organismo após injeção no corpo [189]. O destino das nanopartículas após sua introdução no sangue tem sido amplamente discutido por médicos e cientistas envolvidos na concepção e desenvolvimento desses nanodispositivos [190]. Assim, obter nanopartículas magnéticas com revestimentos adequados, biocompatíveis e com sítios ativos para bioconjugação dos mais diferentes agentes terapêuticos é essencial para o sucesso dessas aplicações. Um dos sistemas de maior sucesso nesta empreitada é a utilização da albumina bovina (BSA) como agente encapsulador de nanopartículas conjugadas com fármacos [191].

Assim, nesse trabalho a técnica SERS foi empregada para investigar a possibilidade de, ao serem injetadas na corrente sanguínea de camundongos, nanopartículas magnéticas encapsuladas em albumina bovina (NPBSA) atravessarem a barreira hematoencefálica [192].

Metodologia

Preparação das amostras e dos substratos

a) Amostras

Sangue e diferentes partes do cérebro (cerebelo, córtex e diencéfalo) de ca-

mundongos tratados com nanopartículas encapsuladas em albumina bovina (NPBSA) e apenas com BSA (controle), foram analisados. Para a fabricação do sistema NPBSA foi utilizado fluidos iônico de maguemita, o qual foi associado à albumina bovina e em seguida liofilizadas. Foram injetados 100 μ L de BSA nos animais usados como grupo controle e 100 μ L de NPBSA, diluído em tampão fostato (7,2 pH), nos animais tratados. A eutanásia dos animais foi realizada com 2 dias após o tratamento. Detalhes das amostras podem ser encontradas no trabalho de Débora Cintra [192].

b) Preparação do substrato.

Os substratos utilizados foram obtidos pelo processo de eletrólise como descrito na Seção 3.3.2. Para a obtenção dos espectros, 20 μ L do sangue diluído e de uma solução preparada com as partes do cérebro, após decantação sobre ímã, foram depositados na superfície do filme de prata e secos com fluxo de nitrogênio. Duas soluções para o cérebro foram estudadas: uma proveniente das amostras maceradas em eppendorf contendo água destilada (denominada concentrado) e outra do sobrenadante dessas amostras, obtidas após centrifugação à 3000 rpm, 4°C durante 4 min. Os espectros SERS, adquiridos imediatamente após a secagem, foram obtidos usando a linha 514.5nm do laser de íon Argônio, na configuração de quase *backscattering* (ver Seção 3.2).

Resultados e discussão

- Análise do Sangue

Os espectros SERS das amostras de sangue tratada (i) e não tratada (ii) com NPBSA são mostrados na Figura 4.29. Para comparação os espectro SERS do sistema NPBSA (nanopartículas magnéticas encapsulada em albumina bovina) é mostrado em (iii). Como pode ser observado, os espectros SERS das amostras

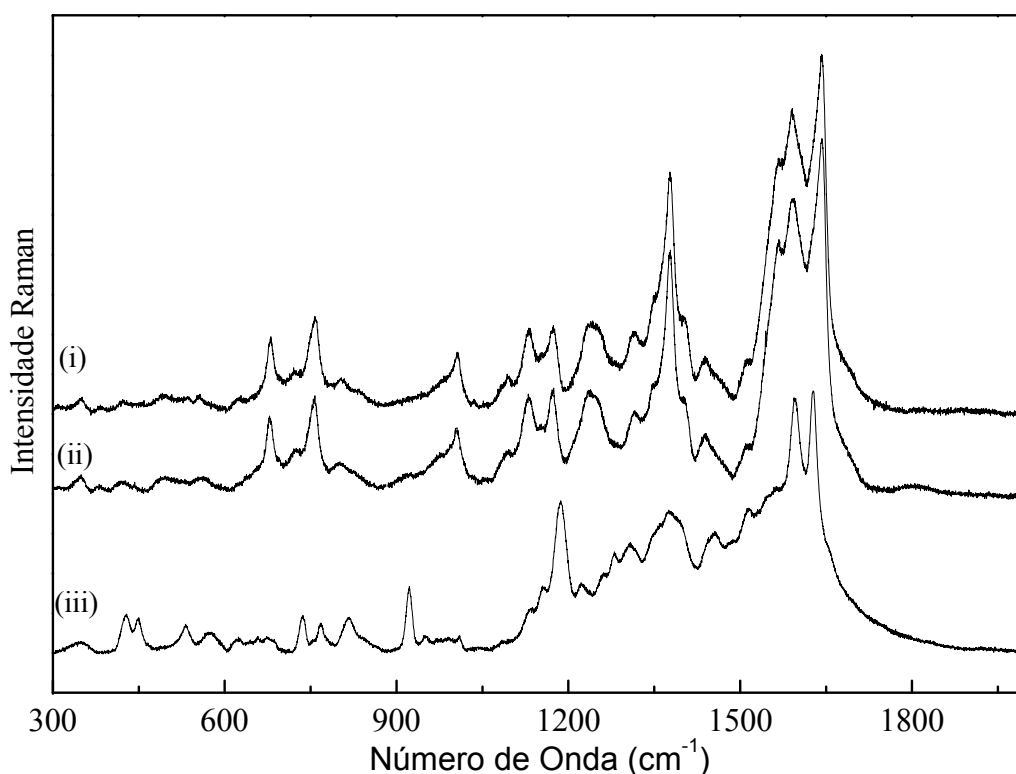


Figura 4.29: Espectros SERS das amostra de sangue de camundongo tratado com o sistema NPBSA (i) e não tratado (controle). Para comparação é mostrado em (iii) o espectro SERS da albumina bovina (BSA).

de sangue são absolutamente idênticas. Além do mais, estes espectros são idênticos ao espectro SERS obtido a partir da amostra de pulmão sadio (ver Figura 4.26 (i) mostrado na Seção 4.4.1), comprovando assim que a injeção do sistema NPBSA no organismo do animal não induz alteração no grau de oxigenação do sangue no animal tratado (ver discussão na Seção 4.4.1).

O espectro SERS do sistema NPBSA (Figura 4.26 (iii)) mostra somente bandas características da proteína. Não havendo portanto, sinal Raman das nanopartículas magnéticas. De modo que, somente foram observados modos associados à vibração dos anéis aromáticos dos aminoácidos que constituem a albumina (1 triptofan (Trp), 18 tirosina (Tyr) e 31 fenelalaninas (Phe)) 816, 1185, 1377, 1456, e 1561

cm^{-1} , assim como de seus terminais carboxilatos e aminas 1591, 1390, 736, 575, 530, 453, 426 cm^{-1} [193]. Observa-se também modos associados à estrutura da proteína como as bandas amida I em 1630 cm^{-1} , amida II em 1547 cm^{-1} e amida III em 1278 cm^{-1} .

- Análise do Cérebro

O tecido cerebral é constituído de 70-80% de água, 7.5-8.5% de proteínas e 5-15% de lipídios, sendo que para estes há abundância em fosfolipídeos e esteróide colesterol [194]. A alta complexidade química destes materiais torna a análise do espectro Raman do cérebro extremamente difícil. Contudo, por ser uma técnica altamente sensível à estrutura química e estrutural dos diferentes tipos de materiais a espectroscopia Raman tem se mostrado muito eficiente no estudo de variações da composição química de materiais biológicos e, portanto, tem sido amplamente empregada para este fim [195].

Os espectros SERS obtidos para as diferentes partes do cérebro (cerebelo, diencéfalo e córtex) do animal tratado com o sistema NPBSA (i), quanto do usado como controle (ii), são mostrados nas Figuras 4.30, 4.31 4.32, respectivamente. Nos painéis (a) e (b) são mostrados os espectros SERS dos concentrados e dos sobrenadantes de cada região.

Como pode ser verificado nas Figuras 4.30, 4.31 4.32 há diferenças significativas entre os espectros SERS obtidos a partir das diferentes partes do cérebro. Por exemplo, ao se comparar os espectros SERS do cerebelo (Figura 4.30) verifica-se que, no caso das amostras de concentrado, há um forte aumento dos picos em 650, 815 e 1180 cm^{-1} , todos característicos da tirosina. Contudo, para a região do diencéfalo estas mesmas bandas apresentaram comportamento inverso ao do observado para o cerebelo, ou seja elas tiveram suas intensidades relativas diminuídas com o tratamento. No caso da região do cortex houve um aumento de intensidade do pico em 650 cm^{-1} , redução de intensidade do pico em 815 cm^{-1} e ausência da banda em

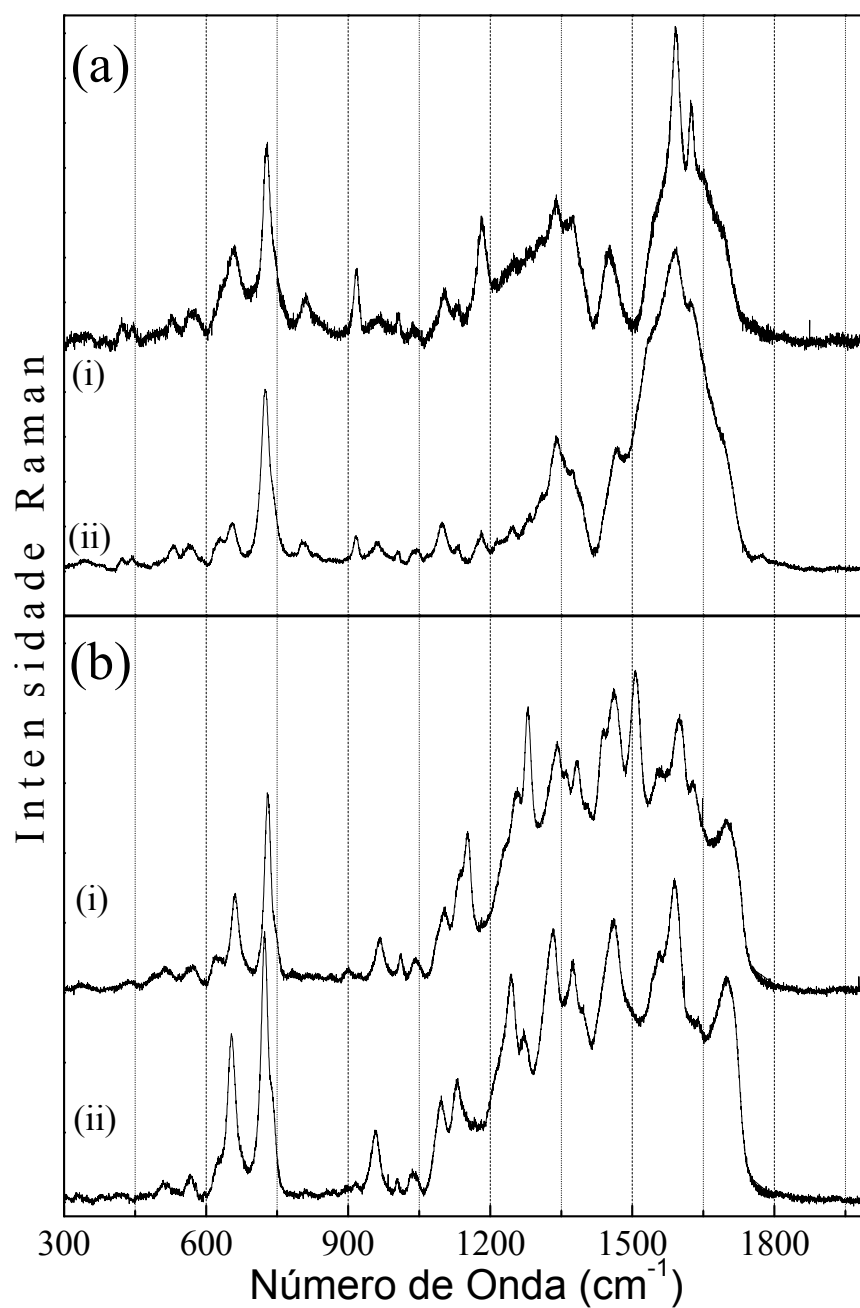


Figura 4.30: Espectros SERS das amostras de cerebelo concentrado (a) e sobrenadante (b), para os camundongos tratado com o sistema NPBSA (i) e não tratado (controle) (ii).

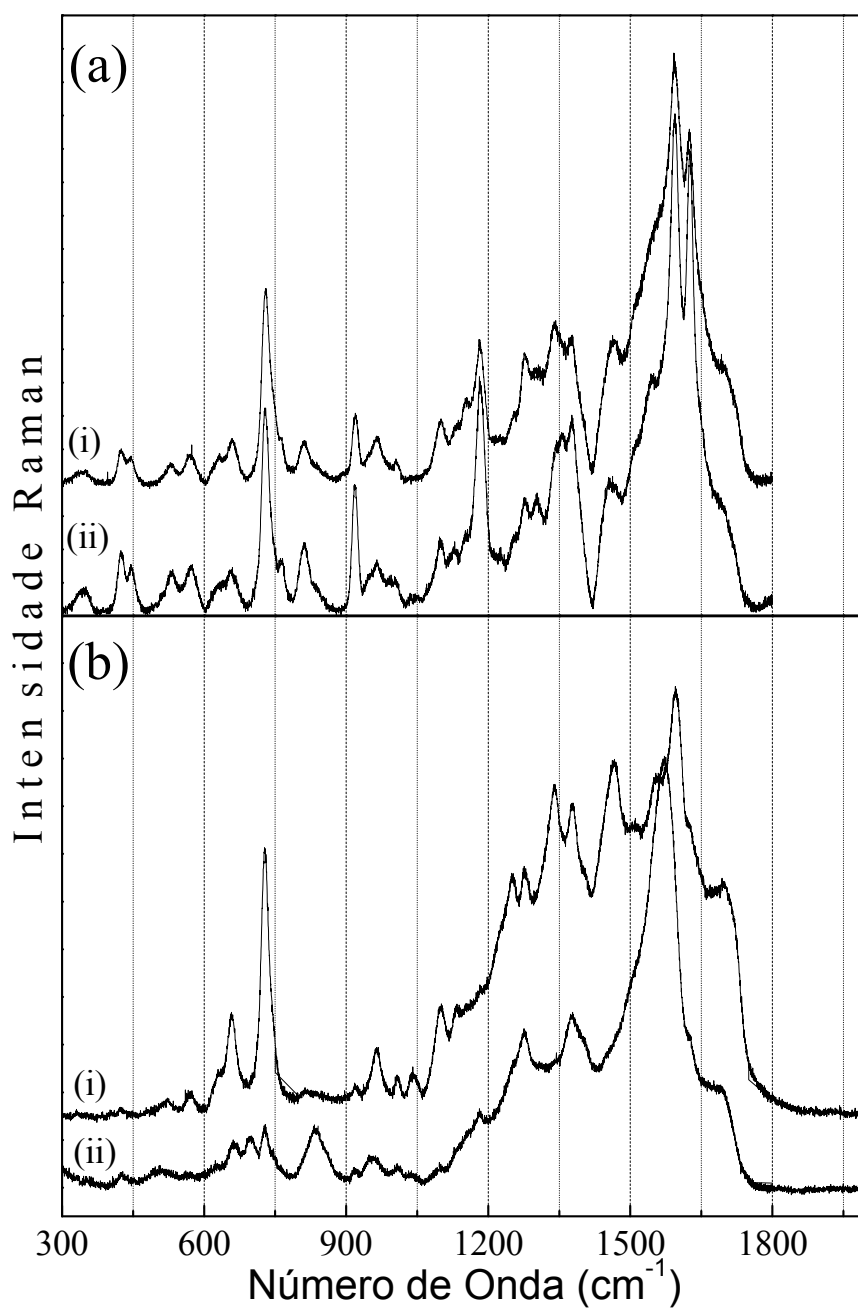


Figura 4.31: *Espectros SERS das amostras de diencéfalo concentrado (a) e sobrenadante (b), para os camundongos tratado com o sistema NPBSA (i) e não tratado (controle) (ii).*

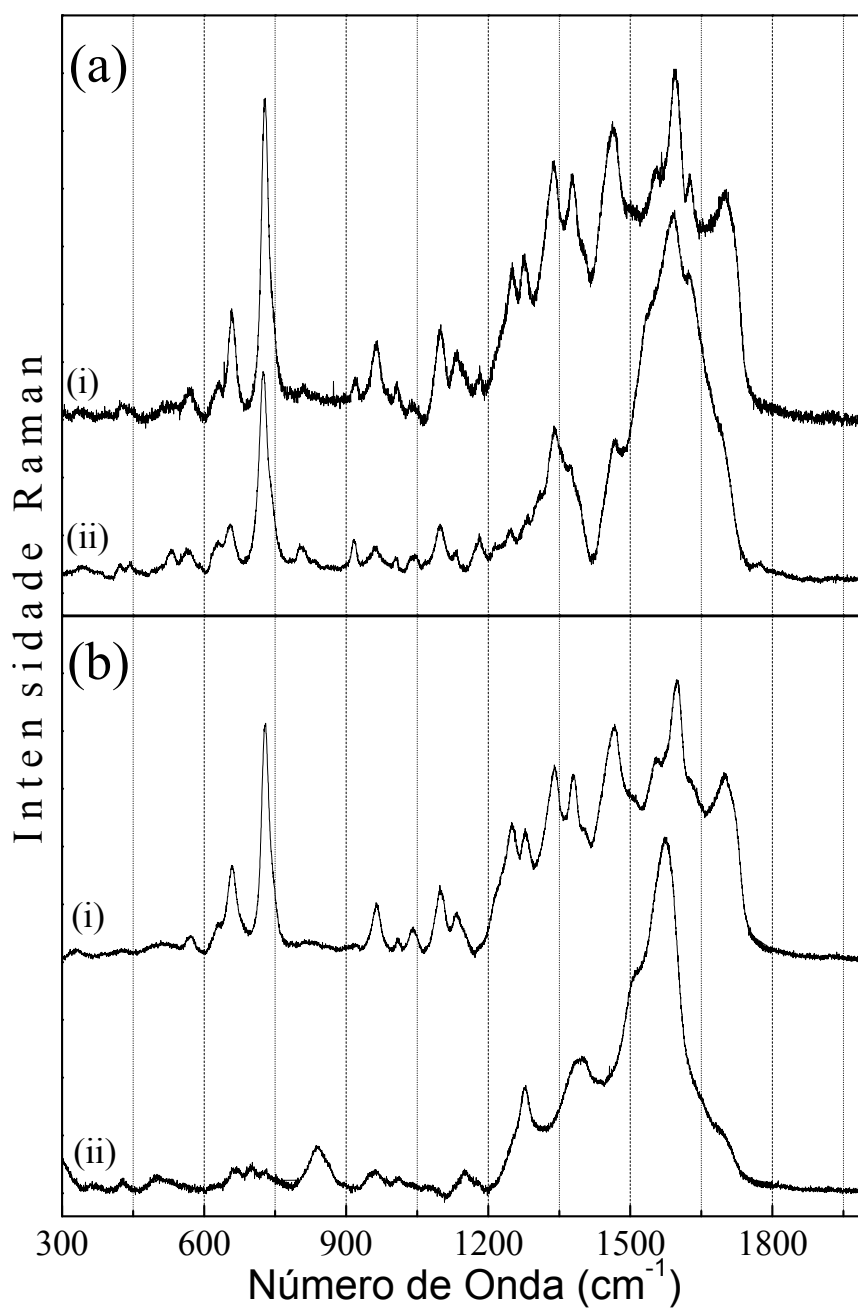


Figura 4.32: Espectros SERS das amostras de córtex concentrado (a) e sobrenadante (b), para os camundongos tratado com o sistema NPBSA (i) e não tratado (controle) (ii).

1180 cm^{-1} .

Com exceção do cortex cerebral, diferenças significativas também são encontrados entre os espectros dos concentrados e dos sobrenadantes. As principais bandas vibracionais observadas são atribuídas principalmente à composição das proteínas e fosfolipídios. Existem bandas em comum em todos os espectros, por exemplo as bandas em 1630, 1550 e 1280 cm^{-1} que são associadas a vibrações da estrutura da proteínas, amida I, amida II e amida III, respectivamente. Já as as bandas intensas em torno de 1460 cm^{-1} são atribuídas à vibrações do CH_2 originarias tanto das proteínas quanto dos lipídios. A razão de intensidade entre as bandas 1460 e 1630 (I_{1460}/I_{1630}) pode ser usada para estimar o teor relativo de lipídios e proteínas [195]. Com exceção das amostras de cortex cerebral esta taxa é da ordem de $\sim 2,5$ para as amostras de concentrados e de $\sim 1,0$ para as amostras de sobrenadantes. Este resultado mostra que as amostras de sobrenadantes são muito mais ricas em lipídios que os concentrados. Outras bandas associadas aos fosfolipídios são as bandas em 725 cm^{-1} ($\nu(P-O-P)_s$), 1100 cm^{-1} ($\nu(C-C)$ e $\nu(PO^2-)$), 1350 cm^{-1} (vibrações *twisting* e *wagging* do CH_2) e 1700 cm^{-1} ($C=C$), novamente estas bandas são mais intensas nos espectros das amostras de sobrenadantes.

Infelizmente, no atual estágio do trabalho só é possível afirmar que a injeção do sistema NPBSA na corrente sanguínea dos camundongos induz significativas alterações químicas em todas as regiões do cérebro estudadas. Sugerindo, portanto, que as nanopartículas magnéticas ultrapassaram a barreira encefálica. Contudo, somente com esses resultados não é possível propor uma hipótese que explique quais as alterações químicas são responsáveis pelas modificações espectrais promovidas pela presença das nanopartículas no interior do cérebro.

Conclusão

Os resultados obtidos nesta seção demonstraram que a técnica SERS pode ser utilizada com sucesso no estudo das alterações químicas provocadas nas diferentes regiões do cérebro de camundongos ao serem tratados com complexos nanoestruturados. Os resultados evidenciaram que a injeção do complexo nanopartículas magnéticas encapsulada em albumina atravessam a barreira hemato-encefálica, o que provoca as alterações nos espectros de todas as regiões estudadas. Resultado diferente foi encontrado para as amostras de sangue tratada e não tratada, as quais revelaram espectros iguais. Infelizmente, devido à alta complexidade dos espectros SERS obtidos e ao estágio inicial do trabalho, ainda não é possível determinar quais seriam as alterações químicas provocadas pela presença das nanopartículas de óxido de ferro no interior do cérebro. Para a proposição de uma hipótese plausível a qual explique essas observações mais estudos se fazem necessários.

Capítulo 5

Conclusões Gerais

Os resultados alcançados ao longo deste trabalho foram obtidos a partir do uso de dois substratos SERS-ativos desenvolvidos com sucesso. Dois foram os tipos empregados: coloide de prata e filme anodizado, também de prata. De modo que, foi verificado o êxito da técnica SERS na caracterização da interface nanopartícula/surfactante dos mais diversos complexos nanoestruturados, assim como, no estudo dos efeitos advindo do uso destes complexos em sistemas *in vivo*.

Do estudo da estabilidade e da atividade SERS dos substratos empregados, utilizando a violeta de genciana como molécula teste, verificou-se que o coloide de prata proporciona intensificação SERS da ordem de 10^3 e apresenta uma grade estabilidade nos primeiros 30 dias após sua preparação. Além disso, foi observado que o coloide mantém atividade SERS mesmo 60 dias após sua síntese. Esta notável estabilidade não foi constatado nos substratos a base de filmes de prata, os quais se mostram inativos 24 horas após sua preparação. Contudo, apesar de sua baixa estabilidade com o tempo, foi verificado que estes substratos apresentam intensificação SERS superior à 10^7 .

O uso do coloide de prata na análise da conjugação entre anfotericina B (AmB) e nanopartículas de ferro pré-cobertas com bicamada de ácido láurico mos-

trou que a AmB ancora na bicamada de ácido laurico através da cadeia poliênica do anel macrolactone. A par disso, foi possível inferir a organização estrutural da AmB na superfície das nanopartículas, de modo que, no modelo aqui proposto os terminais hidrofílicos da molécula de AmB continuam livres para interagir com a membrana celular dos fungos. Esta característica é importante pois, mesmo acoplado à nanopartícula a AmB continua a formar os canais trans-membrana que leva à morte celular.

O estudo da conjugação do anticorpo anti-CEA em nanopartículas de ferro pré-coberta com DMSA foi realizado utilizando-se o filme de prata com o substrato SERS. Da análise dos espectros constatou-se que o DMSA está adsorvido na superfície das nanopartículas, tomando diferentes conformações, mas sempre mantendo o grupo carboxilato voltado para o meio aquoso. Foi também verificado que, devido à ausência das ligações $C = O$, o sistema FM-DMSA apresenta uma superfície altamente reativa, sendo, portanto, adequada para receber uma nova camada molecular. A conjugação do anti-CEA com as moléculas de DMSA adsorvidas nas nanopartículas foi comprovada por meio das alterações nas energias vibracionais dos modos associados ao carboxilato do DMSA adsorvido e, pelo surgimento do modo *stretching* proveniente da ligação $C = O$ no espectro da amostra FM-antiCEA. Esta ligação surge devido à conjugação do anti-CEA com a molécula de DMSA por meio da ligação peptídica formada entre o grupo amina do anticorpo com o grupo carboxílico do DMSA, resultando em uma amida secundária.

A potencialidade da técnica SERS na análise de sistemas biológicos pode ser observada a partir do estudo realizado do pulmão de camundongo tratado com o sistema DDS (*drug delivery system*), baseado no carregamento do fármaco anfotericina B por nanopartículas recobertas com bicamada de ácido láurico, FMBL-AmB. Assim, da análise dos espectros SERS foi possível realizar uma comparação entre a utilização das drogas Amb livre (tratamento convencional) e FMBL-AmB no tra-

tamento da infecção por *Pbmico*se em camundongos. Verificou-se que os espectros SERS obtidos a partir das amostras de pulmões infectados e sadio mostram alterações associadas ao processo de superoxigenação dos neutrófilos, induzido pela infecção fúngica. Também observou-se que as variações nas intensidades nos espectros das amostras tratadas com FMBL-AmB, com relação às amostras não tratadas com AmB, evidenciam que o tratamento diminui esse processo infeccioso. Além disso, foi verificado que os dois tratamentos (Amb livre e Amb conjugado com NPs) levam ao mesmo resultado. Esse resultado mostra que o tratamento com o sistema FMBL-AmB apresenta vantagens sobre o tratamento convencional, já que é realizado com uma menor concentração de AmB, o que reduz a toxicidade gerada pela droga.

Filme de prata foi utilizado como substrato SERS no estudo da possibilidade de nanopartículas magnéticas atravessarem a barreira hemato-encefálica de camundongos. Para isso, nanopartículas de maguemita foram encapsuladas em albumina bovina e injetadas na corrente sanguínea dos animais. As diferenças espectrais observadas entre os dados obtidos por SERS das diferentes regiões do cérebro dos camundongos tratadas com NP/albumina e albumina pura evidenciaram o sucesso da estratégia em levar nanopartículas ao interior do cérebro. Infelizmente, devido à alta complexidade dos espectros SERS obtidos e ao estágio inicial do trabalho, ainda não é possível determinar quais seriam as alterações químicas provocadas pela presença de nanopartículas de óxido de ferro no interior do cérebro.

Portanto, foi demonstrado que é possível aplicar a técnica SERS, com sucesso, na análise de nanopartículas magnéticas complexadas com moléculas surfactantes bioativas. Além disso, os resultados ratificam que é factível implementar a técnica SERS no estudo de sistemas biológicos, como amplamente exposto na literatura.

Como perspectiva têm-se os seguintes planos:

- verificar a presença da proteína CEA após a imunomarcação promovida pelo fluido FM-antiCEA;
- produzir outros tipos de substratos SERS utilizando ouro;
- produzir substrato SERS baseado em filme de prata por diferentes rotas;
- encontrar uma metodologia para podermos quantificar a concentração das moléculas estudadas;
- criar sistemas de marcação inteligentes com corantes adsorvidos na superfície de colóide de prata - sondas biocompatíveis e ativas no SERS;
- fazer SERS *in situ*, método de detecção biológico;
- fazer análise estatística usando PCA (Análise de Componente Principal) - na análise de materiais biológicos;
- fazer cálculos de FDTD (Diferenças Finitas no Domínio do Tempo) para identificar os modos relacionados à interação da amostra em estudo com o substrato SERS.

Referências Bibliográficas

- [1] Dhruva J. Bharali and Shaker A. Mousa. Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: Current perspective and future promise. *Pharmacology and Therapeutics*, 128(2):324 – 335, 2010.
- [2] Akira Ito, Masashige Shinkai, Hiroyuki Honda, and Takeshi Kobayashi. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(1):1 – 11, 2005.
- [3] D. Bahadur and Jyotsnendu Giri. Biomaterials and magnetism. *Sadhana*, 28:639–656, 2003.
- [4] Omid Veisheh, Jonathan W. Gunn, and Miqin Zhang. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3):284 – 304, 2010.
- [5] Shivang R. Dave and Xiaohu Gao. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(6):583–609, 2009.
- [6] José L. Arias, L. Harivardhan Reddy, and Patrick Couvreur. Magneto-responsive squalenoyl gemcitabine composite nanoparticles for cancer active targeting. *Langmuir*, 24(14):7512–7519, 2008.

-
- [7] M.A.G. Soler, T.F.O. Melo, S.W. da Silva, E.C.D. Lima, A.C.M. Pimenta, V.K. Garg, A.C. Oliveira, and P.C. Morais. Structural stability study of cobalt ferrite-based nanoparticle using micro raman spectroscopy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 272:2357 – 2358, 2004.
- [8] Use of the photoacoustic spectroscopy in the investigation of the dilution process in surface-coated nanoparticles. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 352(32):3692 – 3696.
- [9] Maria A. G. Soler, Emilia C. D. Lima, Sebastião W. da Silva, Tiago F. O. Melo, Angela C. M. Pimenta, João P. Sinnecker, Ricardo B. Azevedo, Vijayendra K. Garg, Aderbal C. Oliveira, Miguel A. Novak, and Paulo C. Morais. Aging investigation of cobalt ferrite nanoparticles in low ph magnetic fluid. *Langmuir*, 23(19):9611–9617, 2007.
- [10] Katrin Kneipp, Yang Wang, Harald Kneipp, Lev T. Perelman, Irving Itzkan, Ramachandra R. Dasari, and Michael S. Feld. Single molecule detection using surface-enhanced raman scattering (sers). *Phys. Rev. Lett.*, 78:1667–1670, 1997.
- [11] Shuming Nie and Steven R. Emory. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced raman scattering. *Science*, 275(5303):1102–1106, 1997.
- [12] Martin Moskovits. Surface-enhanced spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.*, 57:783–826, Jul 1985.
- [13] Iain A. Larmour and Duncan Graham. Surface enhanced optical spectroscopies for bioanalysis. *Analyst*, 136:3831–3853, 2011.
- [14] Joanna C. Jones, Clare McLaughlin, David Littlejohn, Daran A. Sadler, Duncan Graham, and W. Ewen Smith. Quantitative assessment of surface-

-
- enhanced resonance raman scattering for the analysis of dyes on colloidal silver. *Analytical Chemistry*, 71(3):596–601, 1999.
- [15] S. Sánchez-Cortés, C. Domingo, J. V. García-Ramos, and J. A. Aznárez. Surface-enhanced vibrational study (seir and sers) of dithiocarbamate pesticides on gold films. *Langmuir*, 17(4):1157–1162, 2001.
- [16] Narayan Sundararajan, Danqian Mao, Selena Chan, Tae-Woong Koo, Xing Su, Lei Sun, Jingwu Zhang, Kung-bin Sung, Mineo Yamakawa, Philip R. Gafken, Tim Randolph, Dale McLerran, Ziding Feng, Andrew A. Berlin, and Mark B. Roth. Ultrasensitive detection and characterization of posttranslational modifications using surface-enhanced raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 78(11):3543–3550, 2006.
- [17] Ines Delfino, Anna Rita Bizzarri, and Salvatore Cannistraro. Single-molecule detection of yeast cytochrome c by surface-enhanced raman spectroscopy. *Biophysical Chemistry*, 113(1):41 – 51, 2005.
- [18] Bayden R. Wood and Don McNaughton. Raman excitation wavelength investigation of single red blood cells in vivo. *Journal of Raman Spectroscopy*, 33(7):517–523, 2002.
- [19] C. V. Raman and K. S. Krishnan. A new type of secondary radiation. *Nature*, 121:501–502, 1928.
- [20] Ewen Smith and Geoffrey Dent. *Modern Raman Spectroscopy : A Practical Approach*. John Wiley and Sons Ltd, 2005.
- [21] D. Bougeard, H. Hamaguchi, and L. D. Ziegler. Editorial. *Journal of Raman Spectroscopy*, 34(2):97–99, 2003.

-
- [22] Adolf Smekal. Zur quantentheorie der dispersion. *Naturwissenschaften*, 11:873–875, 1923.
- [23] G. Placzek. *Rayleigh Streuung und Raman Effekt - Handbuch d. Radiologie*, volume 6. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 2^a ed. edition, 1934.
- [24] H. Kramers and W. Heisenberg. Über die streuung von strahlung durch atome. *Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei*, 31:681–708, 1925. 10.1007/BF02980624.
- [25] P. A. M. Dirac. The quantum theory of dispersion. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A*, 114(769):710–728, 1927.
- [26] Derek A. Long. *The Raman Effect: A Unified Treatment of the Theory of Raman Scattering by Molecules*. John Wiley and Sons Ltd, 2001.
- [27] Geo. Glockler. The raman effect. *Rev. Mod. Phys.*, 15:111–173, Apr 1943.
- [28] John R. Ferraro, Kaszuo Nakamoto, and Chris W. Brown. *Introductory Raman Spectroscopy*. Academic Press; 2 edition, 2005.
- [29] Amanda L. Willis, Nicholas J. Turro, and Stephen O'Brien. Spectroscopic characterization of the surface of iron oxide nanocrystals. *Chemistry of Materials*, 17(24):5970–5975, 2005.
- [30] W.B. White and B.A. DeAngelis. Interpretation of the vibrational spectra of spinels. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 23(4):985 – 995, 1967.
- [31] D. L. A. de Faria, S. Venâncio Silva, and M. T. de Oliveira. Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides. *Journal of Raman Spectroscopy*, 28(11):873–878, 1997.

-
- [32] Aaron M. Jubb and Heather C. Allen. Vibrational spectroscopic characterization of hematite, maghemite, and magnetite thin films produced by vapor deposition. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2(10):2804–2812, 2010.
- [33] Ying-Sing Li, Jeffrey S. Church, and Andrea L. Woodhead. Infrared and raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(8):1543 – 1550, 2012.
- [34] M.A.G. Soler, G.B. Alcantara, F.Q. Soares, W.R. Viali, P.P.C. Sartoratto, J.R.L. Fernandez, S.W. da Silva, V.K. Garg, A.C. Oliveira, and P.C. Morais. Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles. *Surface Science*, 601(18):3921–3925, 2007.
- [35] Maria A. G. Soler, Emilia C. D. Lima, Eloiza S. Nunes, Fabio L. R. Silva, Aderbal C. Oliveira, Ricardo B. Azevedo, and Paulo C. Morais. Spectroscopic study of maghemite nanoparticles surface-grafted with dmsa. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(6):1003–1008, 2011.
- [36] Igor Chourpa, Laurence Douziech-Eyrolles, Lazare Ngaboni-Okassa, Jean-Francois Fouquenot, Simone Cohen-Jonathan, Martin Souce, Herve Marchais, and Pierre Dubois. Molecular composition of iron oxide nanoparticles, precursors for magnetic drug targeting, as characterized by confocal raman microspectroscopy. *Analyst*, 130:1395–1403, 2005.
- [37] Marcelo Sousa, Francisco A. Tourinho, and Joel C. Rubim. Use of raman micro-spectroscopy in the characterization of $m^{II} = f_e o_4$ ($m = \text{fe, zn}$) electric double layer ferrofluids. *Brazilian Journal of Physics*, 31:185 – 191, 2000.
- [38] M. Fleischmann, P.J. Hendra, and A.J. McQuillan. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chemical Physics Letters*, 26(2):163 – 166, 1974.

-
- [39] David L. Jeanmaire and Richard P. Van Duyne. Surface raman spectroelectrochemistry: Part i. heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 84(1):1 – 20, 1977.
- [40] J.A. Creighton, M.G. Albrecht, R.E. Hester, and J.A.D. Matthew. The dependence of the intensity of raman bands of pyridine at a silver electrode on the wavelength of excitation. *Chemical Physics Letters*, 55(1):55 – 58, 1978.
- [41] Martin Moskovits. Surface-enhanced raman spectroscopy: a brief perspective. In Katrin Kneipp, Martin Moskovits, and Harald Kneipp, editors, *Surface-Enhanced Raman Scattering*, volume 103 of *Topics in Applied Physics*, pages 1–17. Springer Berlin / Heidelberg, 2006.
- [42] Alan Campion and Patanjali Kambhampati. Surface-enhanced raman scattering. *Chem. Soc. Rev.*, 27:241–250, 1998.
- [43] Dalva L. A. de Faria, Marcia L. A. Temperini, and Oswaldo Sala. Vinte anos de efeito SERS. *Química Nova*, 22:541 – 552, 07 1999.
- [44] John R. Lombardi, Ronald L. Birke, Tianhong Lu, and Jia Xu. Charge-transfer theory of surface enhanced raman spectroscopy: Herzberg–teller contributions. *The Journal of Chemical Physics*, 84(8):4174–4180, 1986.
- [45] Alexandre G. Brolo, Donald E. Irish, and Brian D. Smith. Applications of surface enhanced raman scattering to the study of metal-adsorbate interactions. *Journal of Molecular Structure*, 405(1):29 – 44, 1997.
- [46] Xiu Feng Lang, Peng Gang Yin, Ting Ting You, and Lin Guo. Chemical effects in sers of pyrazine adsorbed on au-pd bimetallic nanoparticles: A theoretical investigation. *ChemPhysChem*, 13(1):237–244, 2012.

-
- [47] Lin Lin Zhao, Lasse Jensen, and George C. Schatz. Surface-enhanced raman scattering of pyrazine at the junction between two ag20 nanoclusters. *Nano Letters*, 6:1229–1234, 2006.
- [48] Milton Kerker, Dau-Sing Wang, and H. Chew. Surface enhanced raman scattering (sers) by molecules adsorbed at spherical particles: errata. *Appl. Opt.*, 19(24):4159–4174, Dec 1980.
- [49] Joel Gersten and Abraham Nitzan. Spectroscopic properties of molecules interacting with small dielectric particles. *The Journal of Chemical Physics*, 75(3):1139–1152, 1981.
- [50] Gustav Mie. Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3):377–445, 1908.
- [51] Katrin Kneipp, Harald Kneipp, Irving Itzkan, Ramachandra R. Dasari, and Michael S. Feld. Ultrasensitive chemical analysis by raman spectroscopy. *Chemical Reviews*, 99(10):2957–2976, 1999.
- [52] Fredrik Svedberg, Zhipeng Li, Hongxing Xu, and Mikael Käll. Creating hot nanoparticle pairs for surface-enhanced raman spectroscopy through optical manipulation. *Nano Letters*, 6(12):2639–2641, 2006.
- [53] Pilarisetty Tarakeshwar, Daniel Finkelstein-Shapiro, Sarah J. Hurst, Tijana Rajh, and Vladimiro Mujica. Surface-enhanced raman scattering on semiconducting oxide nanoparticles: Oxide nature, size, solvent, and ph effects. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(18):8994–9004, 2011.
- [54] Y. D. Yin, L. Gao, and C. W. Qiu. Electromagnetic theory of tunable sers manipulated with spherical anisotropy in coated nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(18):8893–8899, 2011.

-
- [55] J.M. Séquaris, E. Koglin, and B. Malfoy. Inner and outer complexes of pt-coordination compounds with dna probed by sers spectroscopy. *FEBS Letters*, 173(1):95 – 98, 1984.
- [56] Sukhwinder Kaur, Ganesh Venktaraman, Maneesh Jain, Shantibhusan Senapati, Pradeep K. Garg, and Surinder K. Batra. Recent trends in antibody-based oncologic imaging. *Cancer Letters*, 315(2):97 – 111, 2012.
- [57] Max Schütz, Christian I. Müller, Mohammad Salehi, Christoph Lambert, and Sebastian Schlücker. Design and synthesis of raman reporter molecules for tissue imaging by immuno-sers microscopy. *Journal of Biophotonics*, 4(6):453–463, 2011.
- [58] Chunyuan Song, Zhuyuan Wang, Jing Yang, Ruohu Zhang, and Yiping Cui. Preparation of 2-mercaptobenzothiazole-labeled immuno-au aggregates for sers-based immunoassay. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1):285 – 288, 2010.
- [59] X.-M. Qian and S. M. Nie. Single-molecule and single-nanoparticle sers: from fundamental mechanisms to biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.*, 37, 2008.
- [60] Ximei Qian, Xiang-Hong Peng, Dominic O Ansaria, Qiqin Yin-Goen, Georgia Z Chen, Dong M Shin, Lily Yang, Andrew N Young, May D Wang, and Shuming Nie. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced raman nanoparticle tags. *Nature Biotechnology*, 26:83 – 90, 2008.
- [61] Katherine A. Willets. Surface-enhanced raman scattering (sers) for probing internal cellular structure and dynamics. *Anal Bioanal Chemistry*, 394:85–94, 2009.

-
- [62] Janina Kneipp, Harald Kneipp, Margaret McLaughlin, Dennis Brown, and Katrin Kneipp. In vivo molecular probing of cellular compartments with gold nanoparticles and nanoaggregates. *Nano Letters*, 6(10):2225–2231, 2006.
- [63] J.L. Castro, J.F. Arenas, M.R. López-Ramírez, D. Peláez, and J.C. Otero. Surface-enhanced raman scattering of hydroxybenzoic acids adsorbed on silver nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 332(1):130 – 135, 2009.
- [64] N. Peica, I. Pavel, S. Cînta Pînzaru, V. K. Rastogi, and W. Kiefer. Vibrational characterization of e102 food additive by raman and surface-enhanced raman spectroscopy and theoretical studies. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36(6-7), 2005.
- [65] Haibin Tang, Guowen Meng, Qing Huang, Zhuo Zhang, Zhulin Huang, and Chuhong Zhu. Arrays of cone-shaped zno nanorods decorated with ag nanoparticles as 3d surface-enhanced raman scattering substrates for rapid detection of trace polychlorinated biphenyls. *Advanced Functional Materials*, 22(1):218–224, 2012.
- [66] Kwan KIM and Kuan Soo SHIN. Surface-enhanced raman scattering: A powerful tool for chemical identification. *Analytical Sciences*, 27(8):775, 2011.
- [67] Guilherme V.M., Paola Corio, and Joel C. Rubim. Surface-enhanced raman spectra of magnetic nanoparticles adsorbed on a silver electrode. *Journal Electroanalytical Chemistry*, 603:27–34, 2007.
- [68] Z. Q. Tian. Surface-enhanced raman spectroscopy: advancements and applications. *Journal of Raman Spectroscopy*, 36:466–470, 2005.

-
- [69] Francesca Casadio, Marco Leona, John R. Lombardi, and Richard Van Duyne. Identification of organic colorants in fibers, paints, and glazes by surface enhanced raman spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, 43(6):782–791, 2010.
- [70] S. Khalafalla and G. Reimers. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. *Magnetics, IEEE Transactions on*, 16(2):178 – 183, 1980.
- [71] P. C. Lee and D. Meisel. Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17):3391–3395, 1982.
- [72] Ren Ming Liu, Yi Pu Kang, Xing Fa Zi, Ming Jun Feng, Man Cheng, and Min Zhen Si. The ultratrace detection of crystal violet using surface enhanced raman scattering on colloidal ag nanoparticles prepared by electrolysis. *Chinese Chemical Letters*, 20(6):711 – 715, 2009.
- [73] Lili He, Nam-Jung Kim, Hao Li, Zhiqiang Hu, and Mengshi Lin. Use of a fractal-like gold nanostructure in surface-enhanced raman spectroscopy for detection of selected food contaminants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21):9843–9847, 2008.
- [74] Alexandre Merlen, Virginie Chevallier, Jean Christophe Valmalette, Lionel Patrone, Philippe Torchio, Sylvain Vedraïne, François Flory, and Golam Moula. Surface enhanced spectroscopy with gold nanostructures on silicon and glass substrates. *Surface Science*, 605(13-14):1214 – 1218, 2011.
- [75] Henrique de Santana, Dimas A. M. Zaia, Paola Corio, Fady El Haber, and Guy Louarn. Preparação e caracterização de substratos sers ativos: um estudo da adsorção do cristal violeta sobre nanopartículas de prata. *Química Nova*, 29:194 –199, 2006.

-
- [76] Maria KNAUER, Natalia P. IVLEVA, Reinhard NIESSNER, and Christoph HAISCH. Optimized surface-enhanced raman scattering (sers) colloids for the characterization of microorganisms. *Analytical Sciences*, 26(7):761–766, 2010.
- [77] Samuel L. Kleinman, Emilie Ringe, Nicholas Valley, Kristin L. Wustholz, Eric Phillips, Karl A. Scheidt, George C. Schatz, and Richard P. Van Duyne. Single-molecule surface-enhanced raman spectroscopy of crystal violet isotopologues: Theory and experiment. *Journal of the American Chemical Society*, 133(11):4115–4122, 2011.
- [78] Ying-Sing Li and Yu Wang. Chemically prepared silver/alumina substrate for surface-enhanced raman scattering. *Appl. Spectrosc.*, 46(1):142–146, 1992.
- [79] Nancy J. Szabo and James D. Winefordner. Evaluation of two commercially available tlc materials as ser substrates. *Appl. Spectrosc.*, 51(7):965–975, 1997.
- [80] Nancy J. Szabo and James D. Winefordner. Evaluation of a solid-phase extraction membrane as a surface-enhanced raman substrate. *Appl. Spectrosc.*, 52(4):500–512, 1998.
- [81] Ewan Polwart, Ruth L. Keir, Christine M. Davidson, W. Ewen Smith, and Darran A. Sadler. Novel sers-active optical fibers prepared by the immobilization of silver colloidal particles. *Appl. Spectrosc.*, 54(4):522–527, 2000.
- [82] Reyer J Dijkstra, Arjen Gerssen, Evtim V Efremov, Freek Ariese, Udo A Th Brinkman, and Cees Gooijer. Substrates for the at-line coupling of capillary electrophoresis and surface-enhanced raman spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 508(2):127 – 134, 2004.
- [83] Gang Wei, Hualan Zhou, Zhiguo Liu, and Zhuang Li. A simple method for the preparation of ultrahigh sensitivity surface enhanced raman scattering (sers) active substrate. *Applied Surface Science*, 240(1):260 – 267, 2005.

-
- [84] L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J. V. García-Ramos, and G. Morcillo. Mixed silver/gold colloids: A study of their formation, morphology, and surface-enhanced raman activity. *Langmuir*, 16(25):9722–9728, 2000.
- [85] Yong Du and Yan Fang. Assignment of charge transfer absorption band in optical absorption spectra of the adsorbate-silver colloid system. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60(3):535 – 539, 2004.
- [86] Christophe Petit, Patricia Lixon, and Marie Paule Pileni. In situ synthesis of silver nanocluster in aot reverse micelles. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(49):12974–12983, 1993.
- [87] C. H. Munro, W. E. Smith, M. Garner, J. Clarkson, and P. C. White. Characterization of the surface of a citrate-reduced colloid optimized for use as a substrate for surface-enhanced resonance raman scattering. *Langmuir*, 11(10):3712–3720, 1995.
- [88] Steven E. J. Bell and Narayana M. S. Sirimuthu. Surface-enhanced raman spectroscopy as a probe of competitive binding by anions to citrate-reduced silver colloids. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(33):7405–7410, 2005.
- [89] O. Siiman, L. A. Bumm, R. Callaghan, C. G. Blatchford, and M. Kerker. Surface-enhanced raman scattering by citrate on colloidal silver. *The Journal of Physical Chemistry*, 87(6):1014–1023, 1983.
- [90] Jin Zhang and Cecilia Noguez. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures. *Plasmonics*, 3:127–150, 2008.
- [91] Daniel Fornasiero and Franz Grieser. Analysis of the visible absorption and sers excitation spectra of silver sols. *The Journal of Chemical Physics*, 87(5):3213–3217, 1987.

-
- [92] E. J. Liang, X. L. Ye, and W. Kiefer. Surface-enhanced raman spectroscopy of crystal violet in the presence of halide and halate ions with near-infrared wavelength excitation. *The Journal of Physical Chemistry A*, 101(40):7330–7335, 1997.
- [93] Andrzej and Kudelski. Raman studies of rhodamine 6g and crystal violet sub-monolayers on electrochemically roughened silver substrates: Do dye molecules adsorb preferentially on highly sers-active sites? *Chemical Physics Letters*, 414(4-6):271 – 275, 2005.
- [94] Wu-Hu Li, Xiao-Yuan Li, and Nai-Teng Yu. Surface-enhanced resonance hyper-raman scattering and surface-enhanced resonance raman scattering of dyes adsorbed on silver electrode and silver colloid: a comparison study. *Chemical Physics Letters*, 312(1):28 – 36, 1999.
- [95] Camila M. B. Santos, Sebastião W. da Silva, Luciana R. Guilherme, and Paulo C. Morais. Serrs study of molecular arrangement of amphotericin b adsorbed onto iron oxide nanoparticles precoated with a bilayer of lauric acid. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(42):20442–20448, 2011.
- [96] Halde C., Wright E.T., Pollard W.H. II, Newcomer V.D., and Sterberg T.H. The effect of amphotericin b upon the yeast flora of the gastrointestinal tract of man. *Antibiot Annu.*, pages 123–127, 1956.
- [97] D.P. Kontoyiannis, E. Mantadakis, and G. Samonis. Systemic mycoses in the immunocompromised host: an update in antifungal therapy. *Journal of Hospital Infection*, 53(4):243 – 258, 2003.
- [98] Michael and Kleinberg. What is the current and future status of conventional amphotericin b? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27:12 – 16, 2006.

-
- [99] Fatin Nawwab Al-Deen, Jenny Ho, Cordelia Selomulya, Charles Ma, and Ross Coppel. Superparamagnetic nanoparticles for effective delivery of malaria dna vaccine. *Langmuir*, 27(7):3703–3712, 2011.
- [100] Nahar M., Dutta T., Murugesan S., Asthana A., Mishra D., Rajkumar V., Tare M., Saraf S., and Jain N. K. Functional polymeric nanoparticles an efficient and promising tool for active delivery of bioactives. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 23:259–318, 2006.
- [101] André C. Amaral, Anamélia L. Bocca, Alice M. Ribeiro, Janayna Nunes, Danielle L. G. Peixoto, Andreza R. Simioni, Fernando L. Primo, Zulmira G. M. Lacava, Ricardo Bentes, Ricardo Titze de Almeida, Antonio C. Tedesco, Paulo C. Morais, and Maria Sueli S. Felipe. Amphotericin b in poly(lactic-co-glycolic acid) (plga) and dimercaptosuccinic acid (dmsa) nanoparticles against paracoccidioidomycosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63:526–533, 2009.
- [102] Jing Neng, Mark H. Harpster, Hao Zhang, James O. Mecham, William C. Wilson, and Patrick A. Johnson. A versatile sers-based immunoassay for immunoglobulin detection using antigen-coated gold nanoparticles and malachite green-conjugated protein a/g. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(3):1009 – 1015, 2010.
- [103] Slawomir Wójcik, Viktoria Babenko, and Wojciech Dzwolak. Insulin amyloid superstructures as templates for surface enhanced raman scattering. *Langmuir*, 26(23):18303–18307, 2010.
- [104] Prompong Pienpinijtham, Xiao Xia Han, Sanong Ekgasit, and Yukihiro Ozaki. Highly sensitive and selective determination of iodide and thiocyanate concentrations using surface-enhanced raman scattering of starch-reduced gold nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 83(10):3655–3662, 2011.

-
- [105] Yara Ridente, Jean Aubard, and Jacques Bolard. Absence in amphotericin b-spiked human plasma of the free monomeric drug, as detected by sers. *FEBS Letters*, 446(2):283 – 286, 1999.
- [106] Philippe Millié, Jacqueline Langlet, Jacqueline Bergès, Jacqueline Caillet, and Jean-Philippe Demaret. Self-association of amphotericin b in water. theoretical energy and spectroscopy studies. *The Journal of Physical Chemistry B*, 103(49):10883–10891, 1999.
- [107] Mariusz Gagos, Marta Arczewska, and Wieslaw I. Gruszecki. Raman spectroscopic study of aggregation process of antibiotic amphotericin b induced by h⁺, na⁺, and k⁺ ions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(17):5032–5036, 2011.
- [108] Margaret R Bunow and Ira W Levin. Vibrational raman spectra of lipid systems containing amphotericin b. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 464(1):202 – 216, 1977.
- [109] La Via W V, Lambert J L, Pelletier M J, Morookian J M, Sirk S J, Mickiene D, Walsh T J, and Borchert M S. Measurement of amphotericin b concentration by resonant raman spectroscopy a novel technique that may be useful for non-invasive monitoring. *Medical Mycology*, 44(2):169–174, 2006.
- [110] Metha Rutnakornpituk, Siraprapa Meerod, Boonjira Boontha, and Uthai Wichai. Magnetic core-bilayer shell nanoparticle: A novel vehicle for entrapment of poorly water-soluble drugs. *Polymer*, 50(15):3508 – 3515, 2009.
- [111] B Payet, D Vincent, L Delaunay, and G Noyel. Influence of particle size distribution on the initial susceptibility of magnetic fluids in the brown relaxation range. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 186(1):168 – 174, 1998.

-
- [112] B.D. Cullity and S.R. Stock. *Elements of X-Ray Diffraction*. Addison-Wesley, 3 edition edition, 2001.
- [113] Rajesh Regmi, Correy Black, C. Sudakar, P. H. Keyes, Ratna Naik, G. Lawes, Prem Vaishnava, Cornel Rablau, David Kahn, Melissa Lavoie, Vijayendra K. Garg, and A. C. Oliveira. Effects of fatty acid surfactants on the magnetic and magnetohydrodynamic properties of ferrofluids. *Journal of Applied Physics*, 106(11):113902, 2009.
- [114] D. Maity and D.C. Agrawal. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 308(1):46 – 55, 2007.
- [115] Siegfried Wartewig and Reinhard H.H. Neubert. Pharmaceutical applications of mid-ir and raman spectroscopy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(8):1144 – 1170, 2005.
- [116] Ahmed Besheer, Gerd Hause, Jörg Kressler, and Karsten Mäder. Hydrophobically modified hydroxyethyl starch: Synthesis, characterization, and aqueous self-assembly into nano-sized polymeric micelles and vesicles. *Biomacromolecules*, 8(2):359–367, 2007.
- [117] Sam Hanash. Disease proteomics. *Nature*, 422:226 – 232, 2003.
- [118] Behera D., Raghavendra V., and Khanduja K.L. Carcinoembryonic antigen and sialic acid levels (total and lipid bound) in patients with lung cancer. *Lung Cancer*, 18(1001):168–168, 1997.
- [119] Teresa Casas Pina, Isabel Tovar Zapata, Francisco Cañizares Hernández, Juan Bermejo López, Pascual Parrilla Paricio, and Pedro Marti´nez Hernández. Tumour markers in serum, bronchoalveolar lavage and biopsy

-
- cytosol in lung carcinoma: what environment lends the optimum diagnostic yield? *Clinica Chimica Acta*, 305(1):27 – 34, 2001.
- [120] Jiehua Lin, Feng Yan, and Huangxian Ju. Noncompetitive enzyme immunoassay for carcinoembryonic antigen by flow injection chemiluminescence. *Clinica Chimica Acta*, 341(1):109 – 115, 2004.
- [121] Jingli Yuan, Guilan Wang, Keisuke Majima, and Kazuko Matsumoto. Synthesis of a terbium fluorescent chelate and its application to time-resolved fluoroimmunoassay. *Analytical Chemistry*, 73(8):1869–1876, 2001.
- [122] Derek A. Palmer and James N. Miller. Thiophilic gels: applications in flow-injection immunoassays for macromolecules and haptens. *Analytica Chimica Acta*, 303(2):223 – 230, 1995.
- [123] Gufeng Wang, Robert J. Lipert, Maneesh Jain, Sukhwinder Kaur, Subhanakar Chakraborty, Maria P. Torres, Surinder K. Batra, Randall E. Brand, and Marc D. Porter. Detection of the potential pancreatic cancer marker muc4 in serum using surface-enhanced raman scattering. *Analytical Chemistry*, 83(7):2554–2561, 2011.
- [124] Hongquan Zhang, Qiang Zhao, Xing-Fang Li, and X. Chris Le. Ultrasensitive assays for proteins. *Analyst*, 132(8):724–737, 2007.
- [125] Hyangah Chon, Sangyeop Lee, Sang Wook Son, Chil Hwan Oh, and Jaebum Choo. Highly sensitive immunoassay of lung cancer marker carcinoembryonic antigen using surface-enhanced raman scattering of hollow gold nanospheres. *Analytical Chemistry*, 81(8):3029–3034, 2009.
- [126] Meiyong Liu, Chunping Jia, Yunyan Huang, Xinhui Lou, Shihua Yao, Qinghui Jin, Jianlong Zhao, and Jiaqing Xiang. Highly sensitive protein detection using enzyme-labeled gold nanoparticle probes. *Analyst*, 135, 2010.

-
- [127] Meiyong Liu, Chunping Jia, Yunyan Huang, Xinhui Lou, Shihua Yao, Qinghui Jin, Jianlong Zhao, and Jiaqing Xiang. Highly sensitive protein detection using enzyme-labeled gold nanoparticle probes. *Analyst*, 135:327–331, 2010.
- [128] B. Sahin, V. Paydak, and S. Paydas. 121 p - hepatosteatosi and alterations of ca15.3 and cea in patients with breast cancer receiving tamoxifen. *European Journal of Cancer*, 32(0):201–217, 1996.
- [129] Luis Hernández, Antonia Espasa, Cleofé Fernández, Alfredo Candela, Concepción Marti ´n, and Santiago Romero. Cea and ca 549 in serum and pleural fluid of patients with pleural effusion. *Lung Cancer*, 36(1):83 – 89, 2002.
- [130] Mirjam J.A. Engelen, Henk W.A. de Bruijn, Harrie Hollema, Klaske A. ten Hoor, Pax H.B. Willemse, Jan G. Aalders, and Ate G.J. van der Zee. Serum ca 125, carcinoembryonic antigen, and ca 19-9 as tumor markers in borderline ovarian tumors. *Gynecologic Oncology*, 78(1):16 – 20, 2000.
- [131] Mônica Pereira Garcia, Renata Miranda Parca, Sacha Braun Chaves, Luciano Paulino Silva, Antonio Djalma Santos, Zulmira Guerrero Marques Lacava, Paulo César Morais, and Ricardo Bentes Azevedo. Morphological analysis of mouse lungs after treatment with magnetite-based magnetic fluid stabilized with dmsa. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293(1):277 – 282, 2005.
- [132] <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=02030312>.
- [133] Mariana Campos. *Conjugação de anticorpo anti-antígeno carcinoembriônico a nanopartículas magnéticas: avaliação do potencial para detecção e tratamento de câncer*. PhD thesis, UnB, 2012.

-
- [134] Nian Bing Li, Ling Mei Niu, and Hong Qun Luo. Electrochemical behavior of uric acid and epinephrine at a meso-2,3-dimercaptosuccinic acid self-assembled gold electrode. *Microchimica Acta*, 153:37–44, 2006.
- [135] Oksana Zaluzhna, Lyndsey Brightful, Thomas C. Allison, and YuYe J. Tong. Spectroscopic evidence of a bidentate-binding of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid on silver nanoclusters. *Chemical Physics Letters*, 509:148 – 151, 2011.
- [136] Sang Woo Joo, Sang Woo Han, Hyouk Soo Han, and Kwan Kim. Adsorption and stability of phthalic acid on a colloidal silver surface: surface-enhanced raman scattering study. *Journal of Raman Spectroscopy*, 31(3):145–150, 2000.
- [137] Peter Hildebrandt and Manfred Stockburger. Surface-enhanced resonance raman spectroscopy of rhodamine 6g adsorbed on colloidal silver. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(24):5935–5944, 1984.
- [138] C.J. Sandroff, S. Garoff, and K.P. Leung. Surface-enhanced raman study of the solid/liquid interface: Conformational changes in adsorbed molecules. *Chemical Physics Letters*, 96(5):547 – 551, 1983.
- [139] H. Okabayashi, K. Izawa, T. Yamamoto, H. Masuda, E. Nishio, and C. J. O'Connor. Surface structure of silica gel reacted with 3 – mercaptopropyltriethoxysilane and 3 – aminopropyltriethoxysilane: formation of the s-s bridge structure and its characterization by raman scattering and diffuse reflectance fourier transform spectroscopic studies. *Colloid and Polymer Science*, 280:135–145, 2002.
- [140] M. Venkataramanan, G. Skanth, K. Bandyopadhyay, K. Vijayamohan, and T. Pradeep. Self-assembled monolayers of two aromatic disulfides and a diselenide on polycrystalline silver films: An investigation by sers and xps. *Journal of Colloid and Interface Science*, 212(2):553 – 561, 1999.

-
- [141] J. Barthelmes and W. Plieth. Sers investigations on the adsorption of pyridine carboxylic acids on silver-influence of ph and supporting electrolyte. *Electrochimica Acta*, 40(15):2487 – 2490, 1995.
- [142] P. Panpech, S. Vijarnwannaluk, S. Sanorpim, W. Ono, F. Nakajima, R. Katayama, and K. Onabe. Correlation between raman intensity of the n-related local vibrational mode and n content in gaasn strained layers grown by movpe. *Journal of Crystal Growth*, 298:107 – 110, 2007.
- [143] Caroline R.A. Valois, Juliana M. Braz, Eloiza S. Nunes, Marco A.R. Vinolo, Emilia C.D. Lima, Rui Curi, Wolfgang M. Kuebler, and Ricardo B. Azevedo. The effect of dmsa-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via a $\beta 2$ integrin-dependent pathway. *Biomaterials*, 31(2):366 – 374, 2010.
- [144] Karin Strigård Håkan Mellstedt Gustav J. Ullenhag, Jan-Erik Frödin and Carl G. M. Magnusson. Induction of igg subclass responses in colorectal carcinoma patients vaccinated with recombinant carcinoembryonic antigen. *Cancer Research*, 62:1364–1369, 2002.
- [145] K.C. and Chou. Low-frequency motions in protein molecules. beta-sheet and beta-barrel. *Biophysical Journal*, 48(2):289 – 297, 1985.
- [146] <http://www.druglib.com/activeingredient/arcitumomab/chembio/>.
- [147] <http://en.wikipedia.org/wiki/Antibody>.
- [148] <http://cftc.cii.fc.ul.pt/PRISMA/capitulos/capitulo4/modulo4/topico1.php>.
- [149] X. Dou, Y. Yamaguchi, H. Yamamoto, S. Doi, and Yukihiro Ozaki. Nir sers detection of immune reaction on gold colloid particles without bound/free antigen separation. *Journal of Raman Spectroscopy*, 29(8):739–742, 1998.

-
- [150] Angela M. Ahern and Robin L. Garrell. Protein-metal interactions in protein-colloid conjugates probed by surface-enhanced raman spectroscopy. *Langmuir*, 7(2):254–261, 1991.
- [151] Gi. Xue, Quinpin. Dai, and Shuanggen. Jiang. Chemical reactions of imidazole with metallic silver studied by the use of sers and xps techniques. *Journal of the American Chemical Society*, 110(8):2393–2395, 1988.
- [152] J. S. Suh and M. Moskovits. Surface-enhanced raman spectroscopy of amino acids and nucleotide bases adsorbed on silver. *Journal of the American Chemical Society*, 108(16):4711–4718, 1986.
- [153] S.V. Goryainov, E.V. Boldyreva, and E.N. Kolesnik. Raman observation of a new ζ polymorph of glycine? *Chemical Physics Letters*, 419:496 – 500, 2006.
- [154] Frank S. Parker. *Applications of Infrared, Raman, and Resonance Raman Spectroscopy in Biochemistry*. Springer; 1 edition, 1983.
- [155] C. Yohannan Panicker, Hema Tresa Varghese, L. Ushakumari, Y. Sheena Mary, Jyotirmoy Sarkar, and Joydeep Chowdhury. Concentration and ph dependent sers spectra of sulfanilic acid sodium salt on colloidal silver particles. *Journal of Raman Spectroscopy*, 41(9):944–951, 2010.
- [156] S Stewart and P.M Fredericks. Surface-enhanced raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 55:1641 – 1660, 1999.
- [157] Vladimír Kopecký Jr., Rüdiger Ettrich, Katerina Hofbauerová, and Vladimír Baumruk. Structure of human α 1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(1):41 – 46, 2003.

-
- [158] Katherine Willets. Surface-enhanced raman scattering (sers) for probing internal cellular structure and dynamics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394:85–94, 2009.
- [159] Michael D. Matousek, Pavel; Morris. *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields (Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering)*. Springer; 1st Edition, 2010.
- [160] Ke-Jing Huang, De-Jun Niu, Wan-Zhen Xie, and Wei Wang. A disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on nano-au/multi-walled carbon nanotubes-chitosans nanocomposite film modified glassy carbon electrode. *Analytica Chimica Acta*, 659(1-2):102 – 108, 2010.
- [161] Aidan Meade, Fiona Lyng, Peter Knief, and Hugh Byrne. Growth substrate induced functional changes elucidated by ftir and raman spectroscopy in in-vitro cultured human keratinocytes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387:1717–1728, 2007.
- [162] Zhiwei Huang, Annette McWilliams, Harvey Lui, David I. McLean, Stephen Lam, and Haishan Zeng. Near-infrared raman spectroscopy for optical diagnosis of lung cancer. *International Journal of Cancer*, 107(6):1047–1052, 2003.
- [163] E.P. Campos, C.R. Padovani, and A.M.J. Cataneo. Paracoccidioidomicose: estudo radiológico e pulmonar de 58 casos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33:267 – 276, 08 1991.
- [164] Angel Gonzalez, Henrique L. Lenzi, Ester M. Motta, Luzia Caputo, Jorge H. Sahaza, Ana M. Cock, Ana C. Ruiz, Angela Restrepo, and Luz E. Cano. Ex-

-
- pression of adhesion molecules in lungs of mice infected with paracoccidioides brasiliensis conidia. *Microbes and Infection*, 7(4):666 – 673, 2005.
- [165] Maria Aparecida Shikanai-Yasuda, Flávio de Queiroz Telles Filho, Rinaldo Pâncio Mendes, Arnaldo Lopes Colombo, and Maria Luiza Moretti. Consenso em paracoccidioidomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39:297 – 310, 2006.
- [166] M. Ameen, C. Talhari, and S. Talhari. Advances in paracoccidioidomycosis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 35(6):576–580, 2010.
- [167] Hiroshi Fukui, Tomohiro Koike, Akira Saheki, Satoru Sonoke, Yoshifumi Tomii, and Junzo Seki. Evaluation of the efficacy and toxicity of amphotericin b incorporated in lipid nano-sphere. *International Journal of Pharmaceutics*, 263(1):51 – 60, 2003.
- [168] Camila de Arruda Saldanha. *Avaliação da Atividade Antifúngica da Anfotericina B Conjugada com Fluido Magnético Bicamanda de Ácido Láurico no Tratamento da Paracoccidioomicose*. PhD thesis, UnB, 2012.
- [169] Zeng Haishan, McWilliams Annette, and Lam Stephen. Optical spectroscopy and imaging for early lung cancer detection: a review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1:111–122, 2004.
- [170] Leonardo M. Moreira, Landulfo Silveira Jr., Fábio V. Santos, Juliana P. Lyon, Rick Rocha, Renato A. Zângaro, Antonio Balbin Villaverde, and Marcos T.T. Pacheco. Raman spectroscopy: A powerful technique for biochemical analysis and diagnosis. *Spectroscopy: Biomedical Applications*, 22:1–19, 2008.
- [171] K Maquelin, C Kirschner, L.-P Choo-Smith, N van den Braak, H.Ph Endtz, D Naumann, and G.J Puppels. Identification of medically relevant micro-

-
- organisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 51(3):255–271, 2002.
- [172] Dimitri Pappas, Benjamin W Smith, and James D Winefordner. Raman spectroscopy in bioanalysis. *Talanta*, 51(1):131 – 144, 2000.
- [173] David I. Ellis and Royston Goodacre. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and raman spectroscopy. *Analyst*, 131:875–885, 2006.
- [174] Josefa R Baena and Bernhard Lendl. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(5):534 – 539, 2004.
- [175] Yongkuan Wu, Kun Liu, Kedong Song, and Shi Pan. Three powerful research tools from single cells into single molecules: Afm, laser tweezers, and raman spectroscopy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165:485–496, 2011.
- [176] Katrin Kneipp, Harald Kneipp, Irving Itzkan, Ramachandra R Dasari, and Michael S Feld. Surface-enhanced raman scattering and biophysics. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 14(18):R597, 2002.
- [177] C. Otto, N. M. Sijtsema, and J. Greve. Confocal raman microspectroscopy of the activation of single neutrophilic granulocytes. *European Biophysics Journal*, 27:582–589.
- [178] N.M. Sijtsema, C. Otto, G.M.J. Segers-Nolten, A.J. Verhoeven, and J. Greve. Resonance raman microspectroscopy of myeloperoxidase and cytochrome b558 in human neutrophilic granulocytes. *Biophysical Journal*, 74(6):3250 – 3255, 1998.

-
- [179] I. Notingher, S. Verrier, S. Haque, J. M. Polak, and L. L. Hench. Spectroscopic study of human lung epithelial cells (a549) in culture: Living cells versus dead cells. *Biopolymers*, 72(4):230–240, 2003.
- [180] Christoph Krafft, Benjamin Dietzek, and Jurgen Popp. Raman and cars microspectroscopy of cells and tissues. *Analyst*, 134, 2009.
- [181] M. Abe, T. Kitagawa, and Y. Kyogoku. Resonance raman spectra of octaethylporphyrinato-ni(ii) and meso-deuterated and 15^n substituted derivatives. ii. a normal coordinate analysis. *The Journal of Chemical Physics*, 69(10):4526–4534, 1978.
- [182] Songzhou Hu, Kevin M. Smith, and Thomas G. Spiro. Assignment of protoheme resonance raman spectrum by heme labeling in myoglobin. *Journal of the American Chemical Society*, 118(50):12638–12646, 1996.
- [183] Bayden Wood, Peter Caspers, Gerwin Puppels, Shveta Pandiancherri, and Don McNaughton. Resonance raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387:1691–1703, 2007.
- [184] Paul Graham Fisher and Patricia A. Buffler. Malignant gliomas in 2005. 293(5):615–617, 2005.
- [185] Beata Chertok, Allan E. David, and Victor C. Yang. Brain tumor targeting of magnetic nanoparticles for potential drug delivery: Effect of administration route and magnetic field topography. *Journal of Controlled Release*, 155(3):393 – 399, 2011.
- [186] Mazurchuk R. Straubinger R.M. Zhou, R. Antivasculature effects of doxorubicin-containing liposomes in an intracranial rat brain tumor model. *Cancer Research*, 62(9):2561–2566, 2002.

-
- [187] Beata Chertok, Bradford A. Moffat, Allan E. David, Faquan Yu, Christian Bergemann, Brian D. Ross, and Victor C. Yang. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for mri monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*, 29(4):487 – 496, 2008.
- [188] Hussain S.M. Krestin G.P. Wang, Y.-X.J. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: Physicochemical characteristics and applications in mr imaging. *European Radiology*, 11(11):2319–2331, 2001.
- [189] Jun Sung Kim, Tae-Jong Yoon, Kyeong Nam Yu, Byung Gul Kim, Sung Jin Park, Hyun Woo Kim, Kee Ho Lee, Seung Bum Park, Jin-Kyu Lee, and Myung Haing Cho. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological Sciences*, 89(1):338–347, January 2006.
- [190] Stephane Mornet, Sebastien Vasseur, Fabien Grasset, and Etienne Duguet. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.*, 14:2161–2175, 2004.
- [191] I. Hilger, R. Hergt, and W.A. Kaiser. Use of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer. *Nanobiotechnology, IEE Proceedings -*, 152(1):33 – 39, 2005.
- [192] Débora de Oliveira Cintra e Silva. *Polímeros de Albumina Magnéticos em Sistema Nervoso Central de Camundongos: Estudo de Expressão Gênica e Protéica*. PhD thesis, UnB, 2012.
- [193] Pavol Miskovsky, Daniel Jancura, Santiago Sánchez-Cortés, Eva Kocisova, and Laurent Chinsky. Antiretrovirally active drug hypericin binds the iia subdomain of human serum albumin: Resonance raman and surface-enhanced raman spectroscopy study. *Journal of the American Chemical Society*, 120(25):6374–6379, 1998.

- [194] Christoph Krafft, Lars Neudert, Thomas Simat, and Reiner Salzer. Near infrared raman spectra of human brain lipids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(7):1529 – 1535, 2005.
- [195] Aritake Mizuno, Takashi Hayashi, Kouichi Tashibu, Shuichi Maraishi, Kazuaki Kawauchi, and Yukihiro Ozaki. Near-infrared ft-raman spectra of the rat brain tissues. *Neuroscience Letters*, 141(1):47 – 52, 1992.