

Universidade de Brasília
Instituto de Física

Aline Bessa Veloso

Uso da técnica SERS na caracterização de nanoemulsão a base de AlClPc e de células de câncer de mama tratadas por TFD: um estudo *in vitro*

Brasília - DF
2015

Aline Bessa Veloso

Uso da técnica SERS na caracterização de nanoemulsão a base de AlClPc e de células de câncer de mama tratadas por TFD: um estudo *in vitro*

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

Orientador: Prof. Dr. Sebastião William da Silva

Brasília - DF
2015

Ao meu carinhoso e amado filho,
Dylan, por iluminar a minha vida com
sua alegria, inocência e curiosidade.

AGRADECIMENTOS

À minha família, principalmente ao meu filho, à minha mãe, ao meu esposo, à minha irmã e à minha sogra, Dylan, Maria Eunice, João Paulo, Alice e Neusa, pelo amor, apoio e compreensão, e por sempre acreditar e torcer pelas minhas conquistas.

Ao meu orientador, prof. Dr. Sebastião William da Silva, por seu apoio, dedicação e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas, Dr. João Paulo Longo, Dr. Luis Muehlmann, Dr. Ricardo Azevedo, e seus alunos pelas amostras e discussões sobre o trabalho.

À Dra. Camila Messias, pela amizade e pelos ensinamentos de SERS.

À Dra. Queila Ferreira pelo companheirismo, amizade e apoio ao longo desses anos.

Ao Dr. Fabio Nakagomi pela amizade e apoio no laboratório.

Aos professores Dr. Júnio, Dra. Maria Aparecida, Dr. Paulo César, Dr. Paulo Souza, Dr. Coaquira e Dr. Marcelo pelo feliz convívio no Cnano.

Aos Colegas do Cnano, Camila Lette, Leandro, Isís, Lucélia, Tiago, Paulo e aos demais colegas do Institutos de Física, Ana, Sarah, Alexandre, Nádia, Willian, Lizbet, Marly, Marcos, Klever, Valdeir e demais pelo harmonioso convívio.

Ao Marcelo do laboratório de química, Wilson do laboratório de Criogenia, Sandra e Tales da secretaria por todo apoio prestado.

Ao MCTI pela realização do concurso que permitiu dar uma melhor qualidade de vida a minha família durante esse período.

Aos colegas do Canal Ciência pelo companheirismo nesses anos e por ouvir tantas vezes de Física, Raman e células de câncer.

À todos, que de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

“ Eu faço parte dos pensam que a Ciência é belíssima. Um cientista em um laboratório não é apenas um técnico, ele é também uma criança diante de fenômenos naturais que o impressionam como um conto de fada. Não podemos acreditar que todo progresso científico se reduz a mecanismos, máquinas, engrenagens, mesmo que essas máquinas tenham sua própria beleza. ”

Marie Curie (1867-1934)

Resumo

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres e a causa de mais de meio milhão de mortes no mundo a cada ano. Como alternativa aos tratamentos convencionais, a terapia fotodinâmica (TFD) tem se mostrado uma modalidade terapêutica promissora para tratamento de vários tumores malignos, pois é pouco invasiva e de baixo custo. Contudo, sua aplicação clínica tem sido limitada devido a baixa solubilidade dos fotossensibilizadores em meio aquoso, o que tem motivado a busca por novas formulações como nanoemulsões a base Alumínio-Cloro-Ftalocianina (NP/AICIPc). Assim, neste trabalho foi estudada, pela técnica Espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS), a solubilidade de AICIPc em meios aquoso e oleoso. Os dados SERS mostraram que, mesmo no meio oleoso, o aumento da concentração da AICIPc induz a formação de agregados moleculares devido à interação entre os macrociclos centrais das moléculas de AICIPc. Em complemento, a técnica SERS foi utilizada no estudo de células de câncer de mama tratadas por terapia fotodinâmica, mediadas por NP/AICIPc. A partir dos espectros SERS e da análise multivariacional, foi possível distinguir os diferentes grupos celulares obtidos após tratamento por TFD (grupos controle, viáveis e mortos) com diferentes concentrações de NP/AICIPc. Os resultados evidenciaram que o tratamento por TFD levou a significantes mudanças relacionadas aos teores de proteínas, lipídios e DNA. A partir destas mudanças foi constatado que a necrose é o principal mecanismo de morte celular após tratamento por TFD, nas condições aqui empregadas. Os resultados ainda sugeriram que os mecanismos de defesa celular, induzidos pelo estresse oxidativo advindo da TDF, levaram à produção de proteínas nas células viáveis as quais podem estar associadas com proliferação e controle do processo de divisão celular.

Abstract

Breast cancer is the most common type of cancer among women and it is the cause of over half million deaths worldwide every year. As an alternative to conventional therapies, photodynamic therapy (PDT) has been shown to be a promising therapeutic modality for several malignant tumor treatments, as it is less invasive and has low cost. However, its clinical application has been limited due to the low solubility of photosensitizers in aqueous solution, which has motivated the search for new formulations, such as nanoemulsion bases in aluminum-chloro-phthalocyanine (NP/AICIPc). In this work the solubility of AICIPc in aqueous and oily medium was studied by SERS technique (Surface Enhanced Raman Spectroscopy). Even in oily medium, SERS data showed the concentration of AICIPc induces the formation of molecular aggregates due to the interaction between the central macrocycles of AICIPc molecules. In addition, SERS technique was used in the study of breast cancer cells treated by photodynamic therapy mediated by NP/AICIPc. SERS spectra and multivariate analysis allowed the distinction of different cellular groups after they have been treated by PDT (control, viable and dead groups) with different concentrations of NP/AICIPc. The results showed treatment by PDT yielded significant changes related to proteins, lipids and DNA in the cells. From these changes, it was found that necrosis is the main cell death mechanism after treatment with PDT, under the conditions of this study. Moreover, the results suggested that cellular defense mechanisms, induced by oxidative stress of PDT, caused some protein production in viable cells that may be associated with proliferation and the control of cell division process.

Lista de ilustrações

- Figura 2.1** Tipos de espalhamento de um fóton por uma molécula.
- Figura 2.2** Diagrama ilustrando o mecanismo de intensificação SERS através do modelo químico (FARIA; TEPERINI; SALA, 1999).
- Figura 4.1** Estrutura da molécula de alumínio-cloro ftalocianina (BASOVA, 2011).
- Figura 4.2** Esquema ilustrando a nanopartícula de AlClPc. Imagens de Flávia Barros.
- Figura 4.3** Espectros Raman convencional da Alumínio-Cloro Ftalocianina em solução aquosa (a), em pó (b) e da nanoemulsão com 10 $\mu\text{mol/L}$ de AlClPc (c).
- Figura 4.4** Espectro Raman convencional AlClPc em pó e espectro SERS da solução aquosa de AlClPc, normalizados pela área.
- Figura 4.5** Espectro Raman convencional AlClPc em pó (a), e espectro SERS de nanoemulsões de AlPc com concentração de 5 (b), 15 (c), 40 (d), 65 (e) $\mu\text{mol/L}$ de AlClPc, e da solução aquosa de AlClPc (f).
- Figure 5.1** Espectros SERS médios das células 4T1 do grupo controle (i) e das células tratadas com NP/AlClPc (ii) - (v), sendo os grupos de células viáveis (ii) - (iii) e mortas (iv) - (v), todos tratados com 5 e 10 μM de NP/AlClPc, respectivamente. Cada espectro mostrado é uma média dos espectros de 30 amostras de células. Para facilitar visualização a região de mais baixa energia (400 – 1100) foi multiplicada por 10.
- Figura 5.2** Comparação entre os valores de intensidades médias e desvios padrões de picos SERS relacionados a proteínas (a) e lipídios (b). Em (c) e (d) são mostrados detalhes das regiões espectrais relativos a proteínas e lipídios, respectivamente.
- Figura 5.3** Espectros SERS para os grupos de células 4T1 controle, viáveis e mortas ambas tratadas por TFD mediadas por NP/AlClPc com dosagem de 10 μM . As linhas cheias mostram as médias espectrais.
- Figura 5.4** PCA dos grupos de células controle e tratadas por TFD mediadas por NP/AlClPc com dosagem de 5 e 10 μM : mortas (a); viáveis (b) e tratadas com 5 μM (c) e 10 μM (d) de NP/AlClPc. Em (e) é mostrado a comparação entre os cinco grupos celulares.

Lista de tabelas

- Tabela 3.1** Dados iniciais para PCA. As linhas representam os espectros obtidos (*n espectros*), a colunas os números de onda (*m número de onda*) e *x* a intensidade Raman.
- Tabela 4.1** Atribuições dos modos vibracionais do espectro Raman convencional da AlCIPc em pó (BASOVA, 2011).
- Tabela 4.2** Razão entre as intensidades provenientes da região central e da extremidade das moléculas de AlCIPc, na forma de pós e de nanoemulsão.
- Tabela 5.1** Atribuições dos modos vibracionais do espectro SERS da célula 4T1.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Abreviaturas/ siglas/símbolos	Significado
A	Adenina.
Ag	Prata.
AgNO₃	Nitrato de prata.
AgNPs	Nanopartículas de prata.
AlClPc	Alumínio-Cloro-Ftalocianina.
<i>as.</i>	<i>Assimetric.</i>
<i>bend.</i>	<i>Bending.</i>
C	Citosina.
CCD	Do inglês <i>Charge-Coupled Device</i> .
CuPc	Cobre ftalocianina.
<i>def.</i>	<i>Deformation.</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> .
E	Campo elétrico local.
EROs	Espécies reativas de oxigênio.
ERO-α	Retículo endoplasmático oxidoredutase alfa
FePc	Ferro ftalocianina.
FS	Fotossensibilizador.
G	Guanina
Gl	Vidro.
Gly	glicine
H₂Pc	Ftalocianina de base livre.
I_A	Intensidades Raman anti-Stoke.
IARC	Agência Internacional de Pesquisas em Câncer do inglês <i>International Agency of Research on Cancer</i> .
I_c	Intensidades relativas entre os modos vibracionais do centro da molécula de AlClPc.
I_{ex}	Intensidades relativas entre os modos vibracionais relacionados ao grupo de benzenos da molécula de AlClPc.
I_s	Intensidades Raman anti-Stoke.
LbL	Camada-por-camada do inglês <i>Layer-by-Layer</i> .
LDA	Análise Discriminatória Linear do inglês <i>Linear Discrimination Analysis</i> .
Na₃C₆H₅O₇	Citrato de sódio.
NaCl	Cloreto de sódio.
NP/AlClPc	Nanoemulsão de AlClPc.

OFETs	Transistores orgânico de efeito de campo do inglês <i>organic field-effect transistors</i> .
OLEDs	Diodos emissores de luz orgânicos do inglês <i>organic light-emitting diodes</i> .
PAH	Poli(cloridrato de alilamina).
PBS	Tampão fosfato-salino do inglês <i>phosphate buffered saline</i> .
Pc	Ftalocianina do inglês <i>Phthalocyanines</i> .
PC	Componentes principais do inglês <i>principal componentes</i> .
PCA	Análise da Componente Principal do inglês <i>Principal Component Analysis</i> .
Phe	Fenilalanina do inglês <i>Phenilalanina</i> .
PtdIns	<i>Phosphatidylinositol</i>
PVM/MA	Poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)
RNA	Ácidos ribonucleico do inglês <i>ribonucleic acid</i> .
RRS	Espectroscopia Raman Ressonante do inglês <i>Ressonat Raman Spectroscopy</i> .
RS	Espectroscopia Raman do inglês <i>Raman spectroscopy</i> .
SERS	Espectroscopia Raman por intensificação de superfície do inglês <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> .
Si	Silício.
str.	<i>Stretching</i> .
T	Timina.
TFD	Terapia Fotodinâmica.
T-PESCIS	Do inglês <i>targeted plasmonically enhanced single cell imaging spectroscopy</i> .
Trp	Triptofano.
TSPc	Tetrasulfato ftalocianina.
twist.	<i>Twisting</i> .
Tyr	Tyrosina.
α	Polarizabilidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	17
2.1 – Objetivos Gerais	18
2.2 – Objetivos Específicos	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 – Terapias fotodinâmica	21
3.2 – Espectroscopia Raman	22
3.3 – SERS	26
3.3.1 – Mecanismo eletromagnético	28
3.3.2 – Mecanismo químico	29
3.3.3 – SERS aplicado ao estudo da molécula de ftalocianina	31
3.3.4 – SERS aplicado ao estudo de sistemas biológicos	33
3.4 – Análise das Componentes Principais	36
4. ESTUDOS SERS DA NANOEMULSÃO DE AICIPc	41
4.1 – Introdução	42
4.2 – Metodologias	45
4.3 – Resultados e Discussões	47
4.4 – Conclusões	53
5. ESTUDO SERS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA (LINHA 4T1) TRATADAS POR TFD MEDIADA POR NANOEMULSÃO DE AICIPc	54
5.1 – Introduções	55
5.2 – Metodologias	57
5.3 – Resultados	61
5.4 – Discussão	70
5.5 – Conclusões	78
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	79
REFERÊNCIAS	83

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A incidência de câncer no mundo vem aumentando a cada ano, estima que no ano de 2012 foram registrados mais de 14 milhões de novos casos e que o câncer foi responsável pela morte de 8,2 milhões de pessoas nesse mesmo ano (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2013). Entre as mulheres, o câncer de mama representa 25% de todos os casos de câncer diagnosticados (estatísticas excluem câncer de pele não melanoma). Estimam-se 522 mil mulheres morreram devido ao câncer de mama apenas no ano de 2012 (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2013). Como em outros tipos de câncer, é comum à sua disseminação para tecidos vizinhos e mesmo em tecidos ou órgãos distantes como, por exemplo, fígado, pulmão e osso. Dessa forma, há a necessidade de tratamento logo nos primeiros estágios.

O processo de tratamento do câncer de mama poder ser bastante árduo. As terapias mais utilizadas são cirurgia para retirada do tumor, radioterapia, quimioterapia, ou combinações dessas modalidades. Frequentemente é necessário realizar uma mastectomia no seio afetado. Assim, a comunidade científica vem buscando novas metodologias para substituir ou auxiliar no tratamento do câncer de mama. Atualmente a Terapia Fotodinâmica (TFD) tem sido utilizada nos tratamentos de câncer de boca e de pele (LONGO, 2008). Contudo, com o desenvolvimento de novos sistemas nanoestruturados, sondas ou lasers mais penetrantes tem possibilitado o uso da TFD no tratamento do câncer de mama (WANG et al., 2011).

A terapia fotodinâmica consiste na administração de fármaco fotossensibilizador, não tóxicos à luz branca, que ao ser excitado por uma fonte luminosa, com comprimento de onda determinado, desencadeia a formação de espécies reativas de oxigênio que levam à morte celular (LONGO et al., 2012; MUEHLMANN et al., 2011; MUEHLMANN et al., 2014).

Apesar do laser poder ser focalizado apenas na região tumoral resguardando os demais tecidos mamários, a TFD pode levar a um mecanismo de resposta das células sobreviventes ao tratamento (AGOSTINIS et al., 2011). Essa reação adversa ainda não é bem compreendida, havendo necessidade de uma avaliação das características físico-químicas das células pós-tratamento.

A escolha do fármaco fotossensibilizador é de extrema importância para o sucesso da TFD. A baixa toxicidade à luz branca, o comprimento de onda para a ativação e a eficiência clínica são uns dos critérios para a sua escolha. Nesse sentido, a ftalocianina (Pc) é um fármaco promissor para ao uso em TFD. Além da baixa toxicidade e apresentar intenso acúmulo em células cancerosas (CHAN et al., 1990; O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009), as moléculas de ftalocianina são ativadas por luz com o comprimento de onda em torno de 650 a 750 nm, região espectral que permite maior penetração do laser no tecido humano.

No entanto, a ftalocianina é uma molécula hidrofóbica, o que inviabiliza a sua utilização direta em estruturas biológicas. Essa característica induz uma eliminação rápida pelo organismo e perda intensa de sua atividade fotodinâmica em meio aquoso (CHAN et al., 1990; DARWENT et al., 1982). Dessa forma, necessita-se de um meio capaz de transportar a ftalocianina pela corrente sanguínea às células cancerígenas. Alguns pesquisadores vêm desenvolvendo sistemas nanoestruturados para evitar a hidrofobia da ftalocianina em meios aquosos mantendo suas características desejadas (MUEHLMANN et al., 2014; Longo et al., 2012; MIJAN et al., 2014; LU et al., 2011) porém muitos desses sistemas utilizam grande quantidade de solventes orgânicos, o que dificulta a sua aplicabilidade (MUEHLMANN et al., 2014; PRIMO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2012).

Neste sentido, pesquisadores do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia: Nanobiotecnologia, financiamento do CNPq/MCTI, do qual fazemos parte, propuseram um novo sistema nanoestruturado contendo Alumínio-Cloro-Ftalocianina (AlClPc) para aplicação

em terapia fotodinâmica. Esse sistema é obtido por um método de espontânea emulsão criando nanopartículas oleosas contendo AICIPc, formando uma nanoemulsão de AICIPc (NP/AICIPc). A concentração de AICIPc no sistema oleoso não afeta suas propriedades coloidais, contudo pode afetar sua intensidade de fluorescência e a produção fotoativada de EROS (Espécies Reativas de Oxigênio), principalmente quando solubilizada em altas concentrações. Por outro lado, quando solubilizada em baixas concentrações, os resultados desejados também não são alcançados. Assim, um estudo de modo a otimizar a determinação da concentração ideal de AICIPc nas nanopartículas da nanoemulsão se faz necessário.

Por fornecer informações sobre as energias vibracionais de moléculas e cristais, a espectroscopia Raman tem mostrado ser uma poderosa ferramenta na identificação e quantificação de espécies químicas presentes em uma determinada amostra, uma vez que o conjunto dos modos vibracionais da amostra está univocamente relacionado à sua identidade química (SI; KANG; ZHANG, 2009; DA SILVA, 2010). A espectroscopia Raman é extremamente útil para um vasto número de aplicações, sendo utilizada em estudos analíticos quantitativos e qualitativos nas áreas de química, biologia, geologia, farmacologia e físicas de estado sólido, entre outras (ARAGON et al., 2011; CHEN et al., 2007; THE et al., 2008). Nas áreas biológicas, a espectroscopia Raman tem sido usada na identificação e quantificação de biomoléculas presentes no sistema estudado (THE et al., 2008; HAKA et al., 2005; THAKUR et al., 2007). Como exemplo pode se citar seu uso na distinção entre células/tecido cancerígenos e não cancerígenos (ABRAMCZYK et al., 2011; BROZEK-PLUSKA et al., 2008; BROZEK-PLUSKA et al., 2012; KAST et al., 2007). Além do mais, quando combinada com análises multivariacional, como Análise da Componente Principal (do inglês *Principal Component Analysis* - PCA), a espectroscopia Raman tem sido capaz de distinguir diferentes tipos de câncer e até mesmo diferentes estágios de câncer (OSHIMA et al., 2010; SU et al., 2012; THAKUR et al., 2007).

No entanto, muitas vezes a espectroscopia Raman convencional possui limitações no estudo de biosistemas, pois muitas biomoléculas apresentam baixa seção de choque e intensos efeitos de fluorescências. Assim, para contornar estas limitações, fazem-se necessárias abordagens experimentais mais avançadas. Nesse contexto, a técnica de Espectroscopia Raman Intensificada por Superfície (do inglês *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* - SERS) emerge como uma ferramenta poderosa e inovadora para o estudo desses sistemas, de forma que importantes resultados já foram alcançados pelo nosso grupo de pesquisa (DA PAZ et al., 2012; SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

O efeito SERS é a intensificação do sinal Raman por um fator que pode superar 10^6 , ocorrendo quando as moléculas são absorvidas ou estão nas proximidades de superfícies metálicas nanoestruturadas (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977; FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974; JEANMAIRE; DUYNE, 1977). Com isso, a técnica SERS pode ser de grande utilidade no estudo de células e tecidos de câncer (LEE et al., 2014; MAITI et al., 2012; MOHS et al., 2010).

Diante do exposto acima, foi proposto nesta tese, trabalhar em duas frentes. Primeiramente, a caracterização estrutural e química de nanoemulsões a base de AICIPc (NP/AICIPc) a ser utilizada no tratamento de câncer de mama. Para isto, a técnica SERS foi utilizada na caracterização de NP/AICIPc com diferentes concentrações de AICIPc. Resultados desse estudo foi recém-publicado (MUEHLMANN et al., 2015). Em seguida é apresentado um estudo sobre os efeitos da TFD mediada por NP/AICIPc no tratamento de células de câncer de mama de camundongo em sistema *in vitro*. Esse estudo foi motivado em virtude da constatação de que células sobreviventes ao TFD apresentam reações adversas tais como geração de subtipos celulares neoplásicos resistentes e agressivos.

Capítulo 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivos Gerais

O objetivo geral desta tese consiste em avaliar, por meio da técnica SERS, nanoemulsões a base de alumínio-cloro-ftalocianina (AICIPc) e estudar seus efeitos quando empregada na terapia fotodinâmica para o tratamento de câncer de mama *in vitro*.

2.2 – Objetivos Específicos

1. No estudo do fármaco:
 - a) Utilizar a espectroscopia Raman convencional e SERS na análise química e estrutural do alumínio-cloro-ftalocianina em sua forma pura (em pó), solução aquosa e em nanoemulsões com diferentes concentrações de AICIPc.

2. No estudo de células de câncer de mama:
 - a) Avaliar, por meio de SERS, células de câncer de mama de camundongos (linhagem 4T1), antes e após tratamento por terapia fotodinâmica mediada pelo sistema NP/AICIPc.
 - b) Utilizar a análise multivariacional PCA para distinção dos espectros SERS oriundas de células de câncer de mama não tratadas, mortas (após o tratamento) e viáveis (após o tratamento) com duas dosagens diferentes do agente fotossensibilizador.

- c) Identificar as espécies químicas que apresentam maiores variações espectrais entre os diferentes grupos celulares.
- d) Propor possíveis mecanismos de morte e de respostas bioquímicas que levem a sobrevivência de células 4T1 ao tratamento por TDF.

Capítulo 3

Revisão da Literatura

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 – Terapias fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD), diferentemente de outros tratamentos convencionais de câncer (como quimioterapia, radioterapia e cirurgias mutiladoras), é uma alternativa pouco invasiva e pouco tóxica, o que diminui os efeitos colaterais pós-tratamento e os custos operacionais (LONGO, 2008). O tratamento pela TFD consiste na administração de drogas fotossensibilizadoras que ao serem excitadas por luz a um específico comprimento de onda geram agentes citotóxicos que leva à morte celular.

De forma simplificada, ao receber fótons emitidos por uma fonte de laser, o fármaco fotossensibilizador (FS) é levado do seu estado fundamental para o estado excitado singleto. Como o estado excitado singleto é instável, o FS poderá decair para o estado fundamental reemitindo a mesma quantidade de energia recebida inicialmente ou decairá para um estado excitado de menor energia, estado tripleto. Nesse estado, o FS poderá desencadear dois tipos de processos de reação que geram diversas espécies reativas de oxigênio (ERO's). Na reação do tipo I, o FS interage com as biomoléculas presentes no meio transferido energia a essas, então, as biomoléculas interagem com o oxigênio do meio formando os ERO's. Na reação do tipo II, o FS interage diretamente com o oxigênio do meio tornando-o excitado, desencadeando a formação dos ERO's. Os ERO's são radicais livres altamente energéticos que interagem com as moléculas do biosistema levando a modificações químicas que podem resultar em morte celular.

3.2 – Espectroscopia Raman

Quando um feixe de luz incide sobre a matéria, os fótons que compõem a luz podem interagir com moléculas da matéria e serem absorvidos ou espalhados, ou então passar pela matéria sem que haja alguma interação. Se um dos fótons incidentes tiver energia igual à diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado de uma das moléculas, esse fóton poderá ser absorvido e a molécula será promovida para o estado excitado. Essa mudança de estado pode ser medida através de espectroscopia de absorção, na qual se detecta a energia dos fótons da radiação da luz incidente que foram absorvidos pelo material. Em outra situação, o fóton incidente pode interagir com a matéria e ser espalhado. Nesse caso, o fóton não precisa ter energia igual à diferença de energia entre o estado fundamental e excitado, pois a luz incidente induz estados virtuais de curta duração. Como os estados virtuais não são estáveis, a matéria decai para um estado de menor energia e um fóton é reemitido. Os fótons reemitidos trazem informações importantes sobre a matéria podendo ser coletados e analisados por um experimento de espalhamento. Atualmente a técnica de espalhamento mais utilizada para caracterização e identificação de materiais é a espectroscopia Raman (SMITH; DENT, 2005).

O espalhamento dos fótons pela matéria pode ocorrer de duas formas: elasticamente e inelasticamente. Se o fóton ao interagir com a matéria distorce apenas a nuvem de elétrons, o fóton não sofrerá mudança de frequência e o espalhamento será elástico, conhecido como espalhamento Rayleigh. No entanto, se ao interagir com a matéria o fóton reforça o movimento (vibração) do núcleo, esse fóton poderá transferir energia para o núcleo ou o núcleo poderá transferir energia para o fóton. Nesse caso, o fóton espalhado possui energia diferente do fóton incidente e o processo é inelástico, conhecido como espalhamento Raman, sendo bem menos frequente que o Rayleigh (para cada $10^6 - 10^8$ fótons espalhados, apenas um sofre espalhamento Raman). Mesmo assim, a baixa ocorrência, em comparação ao espalhamento Rayleigh, não

torna o espalhamento Raman uma técnica insensível, pois laser modernos associados com microscópios podem fornecer uma grande densidade de fótons em uma pequena amostra.

O espalhamento da luz pela matéria com mudança de frequência foi previsto teoricamente pelo físico austríaco A. G. Smekal em 1923 e foi experimentalmente comprovado em 1928 pelo físico indiano C. V. Raman (SMITH; DENT, 2005). Nesse experimento, Raman utilizou luz do sol, filtros (para selecionar a frequência da luz) e amostras de gases e líquidos puros. Em 1930, Raman recebeu o prêmio Nobel pelo desenvolvimento da experiência e constatação do fenômeno.

O espalhamento Raman pode ser interpretado pela mecânica quântica, na qual os níveis de energia vibracionais são dados por:

$$E_n = hv \left(n + \frac{1}{2} \right) ; n = 0, 1, 2, 3 \dots \quad (2.1)$$

onde v é a frequência de vibração molecular e n é o número quântico que determina a energia vibracional.

O espalhamento Rayleigh surge das transições que levam ao mesmo nível de energia vibracional, enquanto que o espalhamento Raman leva a níveis de energia diferentes. O espalhamento Raman é classificado em dois tipos: o Stokes e Anti-Stokes. O espalhamento Raman Stokes é o que leva a matéria para o estado vibracional de maior energia em relação a energia do estado inicial. Assim, a matéria que inicialmente está no estado fundamental com energia hv_0 interage com um fóton de energia hv_i e é excitada para um estado virtual de alta energia. Em seguida, essa matéria decai para um estado excitado, com energia de vibração igual a hv_M , e emite um fóton com energia menor que o incidente, $hv_S = hv_i - hv_M$. Por outro lado, o espalhamento Raman Anti-Stokes leva a matéria para estado vibracional de menor energia. Neste caso, a matéria encontra-se inicialmente em um estado vibracional excitado, hv_M , e após

interagir com o fóton incidente decai para um estado de energia inferior ao inicial. Ao decair, a matéria emite um fóton com energia maior a do fóton incidente, $h\nu_{AS} = h\nu_i + h\nu_M$. A Figura 2.1 ilustra os tipos de espalhamento entre um fóton e a matéria.

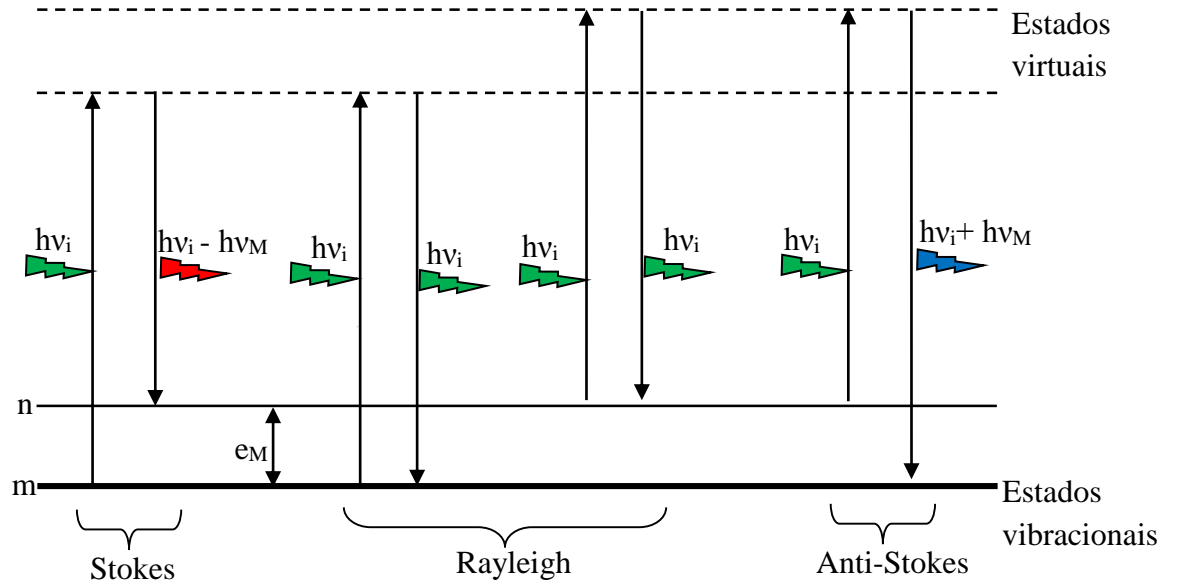


Figura 2.1: Tipos de espalhamento de um fóton pela matéria.

A intensidade Raman é proporcional ao momento de dipolo induzido pela a radiação incidente (SALA, 2008). Este momento de dipolo é dado por:

$$P_{mn} = E(\alpha_{ij})_{mn} , \quad (2.2)$$

onde o termo $(\alpha_{ij})_{mn}$ é o tensor de polarizabilidade da transição entre o estado vibracional m e n . Os índices i e j correspondem às coordenadas de posição x , y e z . O tensor de polarizabilidade é dado por:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \psi_m \alpha_{ij} \psi_n d\tau , \quad (2.3)$$

na qual ψ_m e ψ_n são as funções de onda do estado m e n respectivamente.

A Equação 2.2 também é válida para o espalhamento Rayleigh em que a polarizabilidade é intrínseca à molécula, enquanto que no espalhamento Raman a polarizabilidade é induzida pelo campo elétrico incidente.

Pode-se desenvolver o tensor polarizabilidade em série de Taylor em função da coordenada interna q :

$$(\alpha_{ij})_{mn} = (\alpha_{ij})_0 \int \psi_m \psi_n d\tau + \left(\frac{d\alpha_{ij}}{dq}\right)_0 \int \psi_m q \psi_n d\tau + \dots, \quad (2.4)$$

onde podemos desprezar os termos de ordem mais alta devido à pequena variação da coordenada q .

A primeira integral do tensor da Equação 2.4 só não será nula se os estados m e n forem iguais, devido à ortogonalidade entre as funções de ondas ψ_m e ψ_n . Assim, o primeiro termo da equação corresponde ao espalhamento Rayleigh, pois a matéria retorna ao estado inicial após a excitação.

No entanto, para que o segundo termo seja diferente de zero é necessário satisfazer as seguintes condições:

1. O termo $\left(\frac{d\alpha_{ij}}{dq}\right)_0 \neq 0$, caracteriza que pelo menos uma das componentes do tensor de polarizabilidade varia com a pequena vibração em torno da posição de equilíbrio;
2. O termo $\int \psi_m q \psi_n d\tau \neq 0$. Para que esta equação seja diferente de zero, $\psi_m q \psi_n$ deve ser uma função par. Como q é uma função ímpar, o produto $\psi_m \psi_n$ deve

ser ímpar, logo as funções de onda devem ter diferente paridade. Assim, o segundo termo da equação é correspondente ao espalhamento Raman. Pela regra de seleção tem-se que a variação do nível de energia deve ser dada por $\Delta n = \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$. Se Δn é positivo, tem-se um espalhamento Raman Stokes, caso contrário tem-se um espalhamento Raman Anti-Stokes.

Como a população dos estados segue a distribuição de Boltzmann, a matéria tende a estar no estado de menor energia à temperatura ambiente. Assim, com a excitação, espera-se que o espalhamento Anti-Stokes seja menos intenso do que o Stokes. Na verdade, experimentalmente é observado que a relação entre as intensidades Anti-Stokes (I_A) / Stokes (I_S) é dada por:

$$\frac{I_A}{I_S} = \left(\frac{\nu_0 + \nu_M}{\nu_0 - \nu_M} \right)^4 e^{\frac{e_M}{kT}} \quad (2.5)$$

onde e_M é a energia do estado excitado.

3.3 - SERS

O efeito SERS consiste na intensificação do sinal Raman por fatores que podem ser maiores que 10^6 vezes (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977; FLEISCHMAN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974; JEANMAIRE; DUYNÉ, 1977), de moléculas absorvidas ou nas proximidades de superfícies metálicas nanoestruturadas. A existência desse efeito permite o uso da espectroscopia Raman de forma muito mais abrangente, abrindo possibilidades da aplicação da espectroscopia vibracional para detecção de até uma única molécula (NIE; EMORY, 1997).

O efeito SERS foi observado pela primeira vez em 1974 (FLEISCHMAN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974), onde observou-se um aumento significativo do espalhamento Raman, da ordem de 10^6 , de moléculas de piridina absorvida em uma superfície de eletrodo de prata. Tal intensificação foi na época atribuída pelos autores ao aumento da superfície de contato entre a prata e as moléculas de piridina. Esse aumento da superfície de contato ocorria devido ao processo de rugosidade causado durante a eletrodeposição da prata. No entanto, em 1977 dois trabalhos independentes (ALBRECHT; CREIGHTON, 1977; JEANMAIRE; DUYNE, 1977) mostraram que a intensificação do efeito Raman devido à rugosidade da superfície não seria maior do que um fator de 10. Jeanmaire e coautores propuseram um mecanismo eletromagnético, no qual haveria uma intensificação do campo elétrico sobre a superfície do metal. O grupo de Creighton propôs que haveria um mecanismo químico pela qual há transferência de cargas entre a molécula de piridina e a superfície de prata. Atualmente as duas propostas são aceitas como explicação do efeito SERS de maneira que o efeito eletromagnético e o efeito químico são efeitos multiplicativos.

Nos últimos 40 anos, vários tipos de substratos foram usados, sendo os mais empregados sistemas nanoestruturados na forma de coloides, eletrodos e filmes depositados a vácuo (SALA, 1999). Os coloides são formados por nanopartículas metálicas suspensas em uma solução aquosa, que foram preparadas pela redução dos sais de metais dissolvidos em um agente redutor. Os eletrodos são formados pela ativação da superfície metálica através da oxidação-redução do metal por meio de variação de potencial aplicado ao eletrodo. Os filmes são formados por metais depositado por vaporização, a vácuo, em matrizes de vidro, silício ou outros materiais. Entre os metais utilizados como substrato SERS destaca-se a prata, o ouro e o cobre, sendo que a prata tem mostrado mais eficiência.

A intensidade do espalhamento Raman é proporcional ao momento de dipolo induzido do sistema metal-molécula dado pela Equação 2.2. O mecanismo eletromagnético está

relacionado com o aumento do campo elétrico local (E) enquanto o mecanismo químico está relacionado com a modificação da polarizabilidade (α) da molécula.

3.3.1 – Mecanismo eletromagnético

Em superfícies metálicas, como superfície de prata, os elétrons da camada de valência dos átomos possuem a liberdade de moverem-se ao longo de toda a superfície. Quando um feixe de luz incide nesses elétrons, eles oscilam coletivamente sobre a superfície. Essa oscilação de elétrons é denominada plasmon de superfície.

Plasmons de superfícies em pequenas e uniformes partículas, bem como em superfícies que possuem uma rugosidade periódica, têm uma frequência de ressonância em que absorvem e espalham luz com mais eficiência. Esta frequência varia com a natureza do material. A prata e ouro, por exemplo, possuem frequência de ressonância na região do visível o que favorece a sua utilização como substrato SERS. Como o metal pode absorver ou espalhar a luz e a razão entre esses dois efeitos depende das características intrínsecas de cada material. A prata, em comparação a outros metais, é o que mais favorece o espalhamento.

Além do espalhamento ter uma dependência com as características intrínsecas do material, esse também é influenciado pela rugosidade de sua superfície. Em superfícies metálicas planas, o plasmon oscila ao longo do plano, o que favorece apenas o efeito de absorção. Para que haja espalhamento é necessário que a oscilação dos plasmons ocorra na direção perpendicular à superfície de modo que às rugosidades permitem essa condição. Dessa forma, os plasmons, localizados nos vales da superfície rugosa, ao se locomoverem em direção ao pico provocam um espalhamento ressonante. Tal espalhamento intensifica o campo eletromagnético, submetendo as moléculas nessa região rugosa a essa intensificação.

O mecanismo eletromagnético pode ser simplificado explicado pelo modelo clássico de uma pequena esfera metálica na presença de um campo elétrico uniforme. O campo induzido na esfera é dado por (SMITH; DENT, 2005):

$$E_r = E_0 \cos\theta + g \left(\frac{a}{r}\right)^3 E_0 \cos\theta, \quad (2.6)$$

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

$$g = \left(\frac{\varepsilon - \varepsilon_0}{\varepsilon + 2\varepsilon_0}\right), \quad (2.7)$$

onde ε e ε_0 são constantes dielétricas do meio e da esfera metálica respectivamente.

O valor de g será máximo quando o denominador for mínimo. Como ε_0 é próximo de 1, a maximização de g ocorrerá quando ε for aproximadamente igual a -2. Nesse caso, o plasmon de superfície está em ressonância com a frequência da luz incidente, de modo que o campo elétrico local experimentado pela molécula absorvida na superfície do metal é muito maior do que o campo elétrico da radiação incidente.

3.3.2 – Mecanismo químico

A intensificação pelo mecanismo químico se deve à formação de ligação química entre a molécula absorvida e a superfície metálica. Essa ligação cria um estado de energia que permite a transferência de cargas (elétrons ou buracos) entre a molécula e a superfície metálica. Assim,

o novo estado criado aumenta consideravelmente a polarizabilidade da molécula devido à interação com o metal.

Nesse modelo, o fóton incidente é absorvido pelo metal, formando um par elétron-buraco. Através da ligação, o elétron ou o buraco tunela para a molécula e ao retornar para o metal traz informações sobre os estados vibracionais da molécula. Quando o par elétron-buraco é aniquilado, um fóton é emitido com energia diferente da radiação incidente. A Figura 2.2 ilustra o mecanismo de intensificação SERS por esse modelo.

Devido à necessidade de formação de ligação entre a molécula e o metal, o mecanismo químico é de curto alcance, de forma que esse processo é efetivo apenas para uma monocamada de cobertura. Além disso, por causa da nova ligação formada, os espectros obtidos por SERS podem divergir daqueles obtidos por Raman convencional, seja por mudanças em intensidades relativas, meia-larguras, deslocamentos de frequência ou mesmo pelo aparecimento de novas bandas (FARIA; TEPERINI; SALA, 1999).

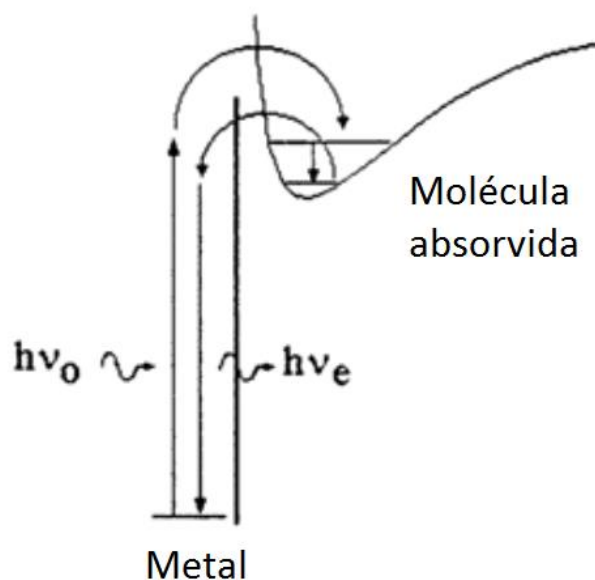


Figura 2.2: Diagrama ilustrando o mecanismo de intensificação SERS através do modelo químico (FARIA; TEPERINI; SALA, 1999).

3.3.3 – SERS aplicado ao estudo da molécula de ftalocianina

Desde de 1974, quando Fleischman e coautores descobriram o efeito SERS (FLEISCHMAN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974), inúmeros trabalhos vêm sendo publicados sobre diferentes tipos de moléculas absorvidas nos mais diversos substratos SERS.

No caso de moléculas de ftalocianina, um dos primeiros trabalhos foi publicado em 1980 (KOTZ; YEAGER, 1980), em que os autores estudaram moléculas de tetrasulfonato de cobalto ftalocianina absorvida em eletrodos de prata em solução aquosa. O trabalho mostrou que a intensidade das bandas Raman está diretamente relacionada à quantidade de carga transferida durante a ação eletroquímica da prata, o mesmo efeito já havia sido reportado para piridina absorvida na superfície de prata. Além disso, foram discutidas as possíveis orientações da molécula na superfície de prata, sendo apresentadas três possibilidades perpendicular à superfície; paralelo a superfície pelas ligações O-S das bordas da molécula; paralelo a superfície pelas ligações O-Co do centro da molécula. No entanto, os autores sugeriram maiores investigações para melhor compreender as atribuições vibracionais e a intensificação do sinal Raman.

Em 1983 Simic-Glavaski e colaboradores investigaram diversas moléculas de tetrasulfato ftalocianina (TSPc) com SERS e curvas de voltametrias (SIMIC-GLAVASKI; ZECEVIC; YEAGERS, 1983). As moléculas estudadas foram (metal-livre, cobalto e ferro) tetrasulfato ftalocianina (H₂⁻, Co- e Fe-TSPc) absorvido em eletrodos de prata em solução ácida, neutra e alcalina. Os dados espectrais mostram mudanças mais significativas da intensidade Raman nas bandas correspondentes a oxidação-redução. A intensidade dos picos Raman demonstrou ser uma função do estado de oxidação do TSPC absorvida na superfície, enquanto a corrente é uma função derivada correspondente à taxa de estado de oxidação pelo tempo. Para os autores as configurações mais prováveis para as moléculas absorvidas de TSPC

são as de extremidade e paralela. As camadas absorvidas maiores do que monocamada são menos prováveis.

No ano seguinte, foi publicado um estudo sobre o espalhamento Raman em filmes finos de cobre ftalocianina (CuPc) depositados em superfícies de filmes de silício (Si), vidro (Gl) e prata (Ag) (HAYASHI; SAMEJIMA, 1984). Diversas medidas de intensidade Raman foram realizadas variando as espessuras dos filmes de CuPc e Ag. Os autores observaram um relativo aumento da intensidade Raman (20 vezes) para filmes de CuPc com espessura de 800Å depositados sobre filmes prata com 400Å de espessura. Um aumento ainda maior (10^4 vezes) foi encontrado para cobertura de aproximadamente uma monocamada de filme de CuPc sobre um fino filme de 50Å de prata. Nessa espessura, metais como a prata formam filme-ilhas ao invés de filmes contínuos. Então, os autores mostraram que o aumento de 20 vezes na intensidade Raman no filme mais espesso de CuPC sobre Ag é provocado pela interferência de múltiplas reflexões da luz no filme de CuPc. Enquanto a intensificação Raman mais expressiva (10^4 vezes) se deve à excitação de plasmons de superfície nas ilhas de prata.

Mais tarde, Linss e colaboradores estudaram o efeito SERS em filmes de ftalocianina de base livre (H₂Pc) incorporados com aglomerados nanométricos de prata (LINSS; STENZEL; ZAHN, 1999). Foram obtidos espectros Raman dos filmes de H₂Pc com diferentes concentrações de prata e excitados por fontes de laser com comprimento de onda de 441.6 e 568.2 nm, que são, respectivamente, próximas e distantes da ressonância de plasma. Ao compararem os espectros dos filmes com aglomerados de prata com os filmes sem prata, notou-se uma intensificação Raman, contudo sem significativo deslocamento das bandas. Os autores observaram que a intensificação do sinal Raman depende da quantidade de prata no filme e do comprimento de onda do laser. Por meio de cálculos semi-clássicos, estabeleceram quantitativamente a relação entre a intensificação Raman e os parâmetros de oscilação ressonante de plasma da prata.

Em 2010 Alessio e coautores estudaram o efeito SERS em filmes crescidos em camada-por-camada (LbL) de ferro ftalocianina (FePc) sobre poli(cloridrato de alilamina) (PAH) (ALESSIO et al., 2010). Para obter o efeito SERS, foi incorporada uma camada de nanopartículas de prata (AgNPs) ao filme formando tricamadas de PAH/FePc/AgNPs. Para análise dos filmes, foram realizadas espectroscopia Raman (RS) e espectroscopia Raman ressonante (RRS), além de outras técnicas. Observou-se que os espectros RRS do pó de FePc e do filme PAH/FePc (sem as AgNPs) diferem em termos da intensidade relativa de certas bandas. Essa diferença pode estar relacionada à interação do FePc com a camada de PAH. No entanto, o espectro SERS Ressonante (SERRS) do filme PAH/FePc/AgNPs apresenta grande similaridades com o espectro RRS do pó de FePc. A razão para tal semelhança se deve ao fato de que as AgNPs são preferencialmente absorvidas na camada onde há agregados de FePc. Os filmes LbL de FePc obtiveram uma maior intensificação do sinal Raman para o SERS (10^4) do que SERRS (10^2), o que, segundo os autores, estaria de acordo com mecanismo eletromagnético de intensificação do sinal.

3.3.4 – SERS aplicado ao estudo de sistemas biológicos

A técnica SERS tem mostrado grande aplicabilidade em estudos de sistemas biológicos. Em geral, biosistemas são caracterizados por ter uma baixa concentração da espécie de interesse (da ordem de 10^{-4} a 10^{-5} mol.dm⁻³) e uma alta emissão de fluorescência o que limita o uso da técnica Raman convencional em tais sistemas. Por outro lado, por meio da técnica SERS pode-se obter um aumento significativo da sensibilidade e a supressão do efeito de fluorescência em biosistemas.

Um dos primeiros trabalhos sobre o uso do efeito SERS em sistemas biológicos foi publicado em 1984 (SEQUARIS; KOGLIN; MALFOY, 1984). Nesse trabalho os autores investigaram a interação entre $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ e $[\text{Pt}-(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$ com DNA em eletrodo de prata. O complexo $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ é uma droga conhecida por ter efeitos antitumorais enquanto o complexo $[\text{Pt}-(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$ não possui tais características. Objetivo do trabalho foi obter informações sobre a estereoquímica da ligação desses complexos de platina com DNA. Obtiveram como resultado que apenas o espectro da amostra com $[\text{Pt}-(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$ apresentava uma banda de estiramento Pt-N. Dessa forma, concluíram que a amostra com $[\text{Pt}-(\text{dien})\text{Cl}]\text{Cl}$ possuía uma interação mais fraca com o DNA, por esse motivo estaria mais exposto e próximo à superfície do eletrodo.

Em 2002, Allain e Vo-Dinh utilizaram um substrato de vidro com micropoços cobertos com moléculas de prata a fim de criar uma superfície SERS para a detecção do gene suscetível ao desenvolvimento de câncer de mama (ALLAIN; VO-DINH, 2002). Os autores usaram o Rodamina B como marcador do gene na cadeia de DNA e observaram uma grande intensificação do sinal Raman da amostra de DNA-Rodamina B, bem como a distinção entre os espectros dessa amostra e os da amostra controle.

No mesmo sentido, devido a sua alta sensibilidade, o SERS tem mostrado ser uma técnica promissora para estudo de células e tecidos cancerígenos. Em 2008, Ximei Qian e colaboradores usaram coloides com nanopartículas de ouro associadas à biomarcadores para detecção de tumores em animais vivos (QIAN et al., 2008). Os autores observaram que as nanopartículas com biomarcadores se acumulavam 10 vezes mais do que as partículas controles (sem marcadores) em tumores induzidos em ratos. Além disso, quando tais partículas são excitadas por um *laser* na região do infravermelho, apresentam um espectro de emissão com intensidade 200 vezes maior que a emissão de ponto quântico na região do infravermelho próximo (também usado para identificação de tumores). Assim, as nanopartículas de ouro com

biomarcadores permitiram por meio da espectroscopia a detecção de tumores com o tamanho da ordem de $0,03 \text{ cm}^3$ a penetração do laser a profundidade de 1-2 cm.

Em trabalhos mais recentes, utilizou-se a técnica SERS e análise multivariacional para diagnosticar câncer gástrico em amostras de ácidos nucleicos circulantes (RNA) presente em amostras de sangue (Chen et al., 2012). Os pesquisadores usaram como substrato SERS o coloide de prata agregado com MgCO_4 , depositado sobre uma placa de alumínio. Amostras de RNA foram extraídas de sangue de pacientes diagnosticados com câncer gástrico e de voluntários saudáveis. Dessa forma, através de análise estatística dos espectros RNA-SERS usando a Análise de Componente Principal (do inglês *Principal Component Analysis* - PCA) e Análise Discriminatória Linear (do inglês *Linear Discrimination Analysis* - LDA) foi possível discriminar amostras de pacientes com câncer e saudáveis.

El-Said e colaboradores desenvolveram um método sintético para preparação de nanoflores de ouro por deposição eletroquímica em ITO (EL-SAID et al., 2010). Eles utilizaram essas nanoflores como substrato SERS para detecção de mudanças na estrutura da célula cancerígena HepG2 expostas a três diferentes drogas quimioterápicas. Por meio da análise dos espectros Raman, observaram significativos efeitos das drogas anticancerígenas nas células. As drogas afetaram principalmente o núcleo da célula HepG2 desintegrando a estrutura do DNA, e assim diminuindo a viabilidade da célula e a sua proliferação.

Zhu e colaboradores introduziram nanopartículas de ouro em células vivas de câncer de mama para obter o efeito SERS (ZHU et al., 2013). Observaram que, após a incorporação das nanopartículas, essas localizavam-se no citoplasma, envolvidas por uma vesícula, e não alcançaram o núcleo. A intensidade SERS do pico em 1003 cm^{-1} , correspondente ao modo de reflexão no plano da ligação C-H do benzeno na fenilalanina, foi usado para mapear a célula. Os resultados mostraram que as nanopartículas de ouro interagem principalmente com as proteínas através da ligação da fenilalanina.

Recentemente, pesquisadores desenvolveram uma nova técnica que utiliza simultaneamente SERS e intensificação da imagem de espalhamento Rayleigh para monitorar mudanças moleculares de uma única célula durante o seu ciclo de vida (AUSTIN; KANG; EL-SAYED, 2013; KANG; AUSTIN; EL-SAYED, 2012). A técnica foi denominada em inglês *targeted plasmonically enhanced single cell imaging spectroscopy* (T-PESCIS) e utiliza nanopartículas de ouro para obter a intensificação de ambos os sinais. Austin e coautores usaram a T-PESCIS para avaliar a eficiência e a dinâmica de dois medicamentos, cisplatina e fluorouracil-5, utilizado em quimioterapia para tratamento de câncer epidérmico de boca humana (linha celular HSC-3), (AUSTIN; KANG; EL-SAYED, 2013). As nanopartículas de ouro foram introduzidas no núcleo da célula HSC-3 e imagens Rayleigh e espectros SERS foram obtidos ao longo de 24 horas de tratamento. Os autores mostraram que duas bandas estavam associadas a morte celular, em 1000 e 1585 cm^{-1} . Essas bandas apresentaram um aumento da intensidade relativa ao longo do tratamento até atingir uma estagnação. O tempo para que a célula atinja essa estagnação estaria relacionado a morte celular e a eficiência do medicamento.

3.4 – Análise das Componentes Principais

Em estudos de células de câncer por espectroscopia Raman, muitas vezes, as diferenças espectrais entre as células cancerígenas e as não cancerígenas são muito sutis, o que não permite uma análise direta de seus espectros. No caso deste trabalho, a diferenças espectrais entre células de câncer, antes e pós tratamento por TFD, são ainda mais sutis, de maneira que a análise direta de seus espectros deve ser complementada por uma análise estática dos dados espectrais para que possa acentuar tais diferenças. A estatística multivariacional vem sendo usada para

análise de espectros Raman devido ao grande conjunto de dados correlacionados. Esse tipo de análises espectrais é comumente classificado como supervisionado e não supervisionado (TU; CHANG, 2012). Em análises não supervisionadas, como *Clustering* e Análise da Componente Principal, não é necessário um conhecimento prévio das características de classe, pois essa são determinadas ao longo da análise. No entanto, para análises supervisionadas deve-se ter um conhecimento prévio dos números de classes e amostras representativas de cada classe, o caso da Análise Discriminante Linear, Análise de Regressão e Redes Neurais Artificiais. Neste trabalho, utilizamos a Análise da Componente Principal para estudo dos espectros Raman e SERS.

A Análise de Componente Principal (do inglês *Principal Components Analysis* – PCA) tem mostrado sucesso na análise multivariacional de espectros Raman e é bem aceita para a interpretação de dados (CHEN et al., 2012; TIE et al., 2009). Na espectroscopia Raman cada número de onda pode ser considerado como uma dimensão independente. A PCA reduz a dimensionalidade do conjunto de dados originais Raman em selecionadas componentes principais (do inglês *principal componentes* – PC), fornecendo uma visão estatística de suas correlações.

Para Análise da Componente Principal dos espectros Raman, primeiramente representa-se o conjunto de dados como na Tabela 3.1 (DE PAULA, 2009). As linhas representam os n espectros obtidos, as colunas os m números de ondas dos espectros e a unidade x_{nm} é a intensidade Raman obtida para m -ésimo número de onda do n -ésimo espectro.

Tabela 3.1: Dados iniciais para PCA. As linhas representam os espectros obtidos (n espectros), a colunas os números de onda (m número de onda) e x a intensidade Raman.

	Número de onda 1	Número de onda 2	...	Número de onda m
<i>Espectro 1</i>	x_{11}	x_{12}	...	x_{1m}
<i>Espectro 2</i>	x_{21}	x_{22}	...	x_{2m}
· · ·	· · ·	· · ·	· · ·	· · ·
<i>Espectro n</i>	x_{n1}	x_{n2}	...	x_{nm}

Assim, a partir dos dados da Tabela 3.1 obtém-se a matriz dos dados originais X :

$$X_{nm} = \begin{pmatrix} x_{11} & \cdots & x_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & \cdots & x_{nm} \end{pmatrix} . \quad (4.1)$$

Como os espectros Raman têm uma vasta variação de intensidades, necessita-se tornar a Matriz 4.1 adimensional com média nula e normalizar. Para isso, define-se a matriz modificada Y , cujos seus elementos são dados por:

$$y_{nm} = \frac{x_{nm} - \bar{x}_m}{\sigma_m} , \quad (4.2)$$

onde \bar{x}_m é a média aritmética da variável em m , dado por

$$\bar{x}_m = \frac{\sum_{n=1}^N x_{nm}}{N} , \quad (4.3)$$

e σ_m é desvio padrão em m

$$\sigma_m = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (x_{nm} - \bar{x}_m)^2}{N-1}} , N \neq 1 \quad (4.4)$$

A partir da matriz modificada, define-se a matriz covariante $C(Y)$ dada por

$$C(Y) = Y^T Y \quad (4.5)$$

onde Y^T é a matriz transposta de Y e os elementos de $C(Y)$ em termos de x são dados por:

$$C_{mm'} = \sum_{n=1}^N \left(\frac{x_{nm} - \bar{x}_m}{\sigma_m} \right) \left(\frac{x_{nm'} - \bar{x}_{m'}}{\sigma_{m'}} \right) . \quad (4.6)$$

A matriz $C(Y)$ possui as seguintes propriedades:

- $C(Y)$ é uma matriz simétrica $m \times m$
- Os elementos de sua diagonal são as variâncias de uma medida, ou seja, a média da dispersão estatística.
- Os elementos que estão fora da diagonal são os termos de covariância, que é definida como uma medida de como duas variáveis variam conjuntamente.

Assim, precisa-se maximizar os termos da diagonal principal e minimizar os termos fora dessa diagonal. Como a covariância não pode ser negativa, a melhor opção é diagonalizar a matriz C . Para isso, a técnica de PCA define uma matriz ortogonal P com todos os vetores de base ortogonais. Assim, P age em C como uma rotação generalizada para alinhar todas as bases com o eixo de máxima variância. Então, temos que encontrar P calculando os autovetores da matriz C , na qual cada autovetor são os coeficientes de uma PC e estão relacionados a um autovalor que é variância dessa componente principal. Assim, o termo de maior relevância é relacionado ao autovetor de maior autovalor.

$$PC = PV, \quad (4.7)$$

onde V é a matriz dos autovalores.

Os autovalores são ordenados e pareados de maneira que o m -ésimo autovalor corresponde ao m -ésimo autovetor, e assim, escrevemos os autovalores da matriz V em ordem decrescente:

$$V = \begin{pmatrix} \text{Variância de PC1} & 0 & 0 \\ 0 & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & \text{Variância de PCm} \end{pmatrix}$$

sendo que Variância da PC1 > Variância da PC2 > ... > Variância da m -ésima PC.

Mantendo a mesma relação para a matriz P , têm-se:

$$P = \begin{pmatrix} p_{11} & \cdots & p_{1m} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ p_{m1} & \cdots & p_{mm} \end{pmatrix} \quad (4.7)$$

As componentes principais são obtidas em ordem decrescente de importância. A primeira componente principal (PC1), de maior relevância, é a combinação linear das variáveis com maior variância nos dados originais. O termo geral de uma PC pode ser expresso pela relação

$$PC_{m'} = \sum_{m=1}^M y_{mm'} \times p_{mm'} \quad (4.8)$$

Ao final da análise, as tendências independentes presentes nos dados originais podem ser observadas em uma série de gráficos bidimensionais das componentes principais significativas. Em geral, as duas primeiras componentes principais são suficientes para identificar quais indivíduos estão melhor correlacionados. Caso necessário, PC3 e PC4 podem ser plotadas para ajudar a identificar as similaridades.

Nesse trabalho, todos os cálculos de PCA foram realizados com o *software* MINITAB® versão 14.20.

Capítulo 4

Estudo SERS da Nanoemulsão de AlClPc

4. ESTUDOS SERS DA NANOEMULSÃO DE AICIPc

4.1 – Introdução

As Ftalocianinas (Pc's) são um dos semicondutores orgânicos mais estudados. Devido sua alta estabilidade térmica e química, as Pc's são utilizadas em várias aplicações, tais como tinta e pigmentos, camadas ativas de diodos emissores de luz orgânicos (OLEDs), células solares, sensores, ou transistores de efeito de campo (OFETs) (LATTEYER et al., 2011; BASOVA, 2011). Na área farmacêutica, a Alumínio-cloro ftalocianina (AICIPc) tem atraído a atenção devido ao seu potencial uso como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica (TFD) (OLIVEIRA, 2011). O AICIPc tem baixa toxicidade e suas características fotossensibilizadoras são ativadas pela luz com comprimentos de onda entre 650 e 750 nm, região espectral que permite maior penetração no tecido humano.

A estrutura química da molécula de AICIPc ($C_{32}H_{16}AlClN_8$) é mostrada na Figura 4.1. A molécula de AICIPc possui um formato de disco plano composta por um macrociclo ligado a quatro isoindoles, estruturas formadas pela fusão de um bezeno e pirrole. O alumínio (III) é o átomo central que se encontra no plano do macrociclo. Esse, por sua vez, possui uma ligação iônica com o átomo de cloro (cloreto) que está fora do plano da molécula.

Apesar da AICIPc ser um fármaco promissor para uso na terapia fotodinâmica, essa molécula possui natureza hidrofóbica, o que pode inviabilizar o seu uso terapêutico. Nesse sentido, pesquisadores do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília propuseram um sistema nanoestruturado no qual as moléculas de Alumínio-Cloro Ftalocianina (AICIPc) possa ser solúvel. O sistema proposto é obtido por um método de emulsão espontânea,

na qual nanopartículas compostas por Cremophor® ELP e óleo de rícino mantêm as moléculas de AICIPc em suspensão na água, formando assim uma nanoemulsão de AICIPc (NP/AICIPc). Nessa nanoemulsão, o Cremophor® ELP foi usado como surfactante enquanto o óleo de rícino compõe a fase oleosa. As nanopartículas possuem diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente 25 nm (MUEHLMANN et al, 2015). A Figura 4.2 mostra uma ilustração da nanopartícula, na qual as moléculas de AICIPc são dispersas em óleo de rícino, enquanto as moléculas de Cremophor® ELP formam uma barreira externa.

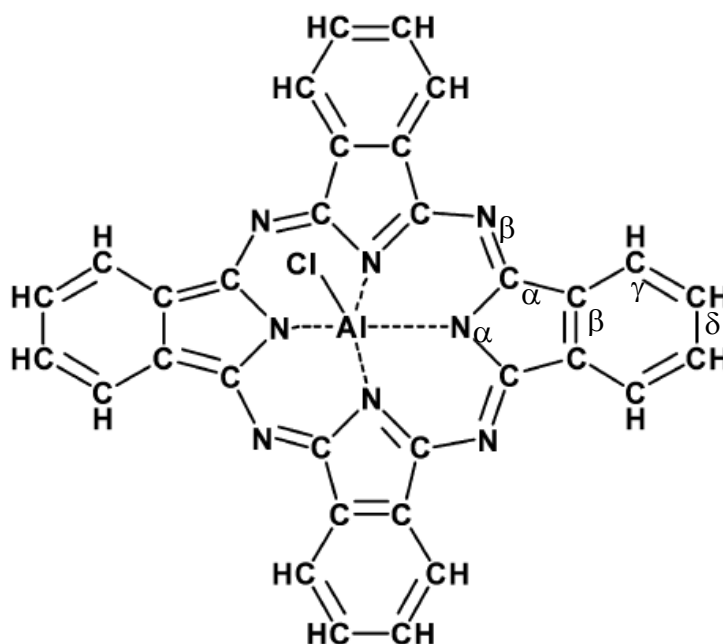


Figura 4.1: Estrutura da molécula de alumínio-cloro ftalocianina (BASOVA, 2011).

O Cremophor ELP®, marca registrada pela empresa química alemã BASF, é um solubilizante não iônico feito pela reação do óleo de rícino com óxido de etileno, em uma razão molar de 1: 35, seguido por um processo de purificação. Esse possui uma parte hidrofílica, que se localiza na parte mais externa da nanopartícula, e uma parte hidrofóbica, que fica no interior da nanopartícula.

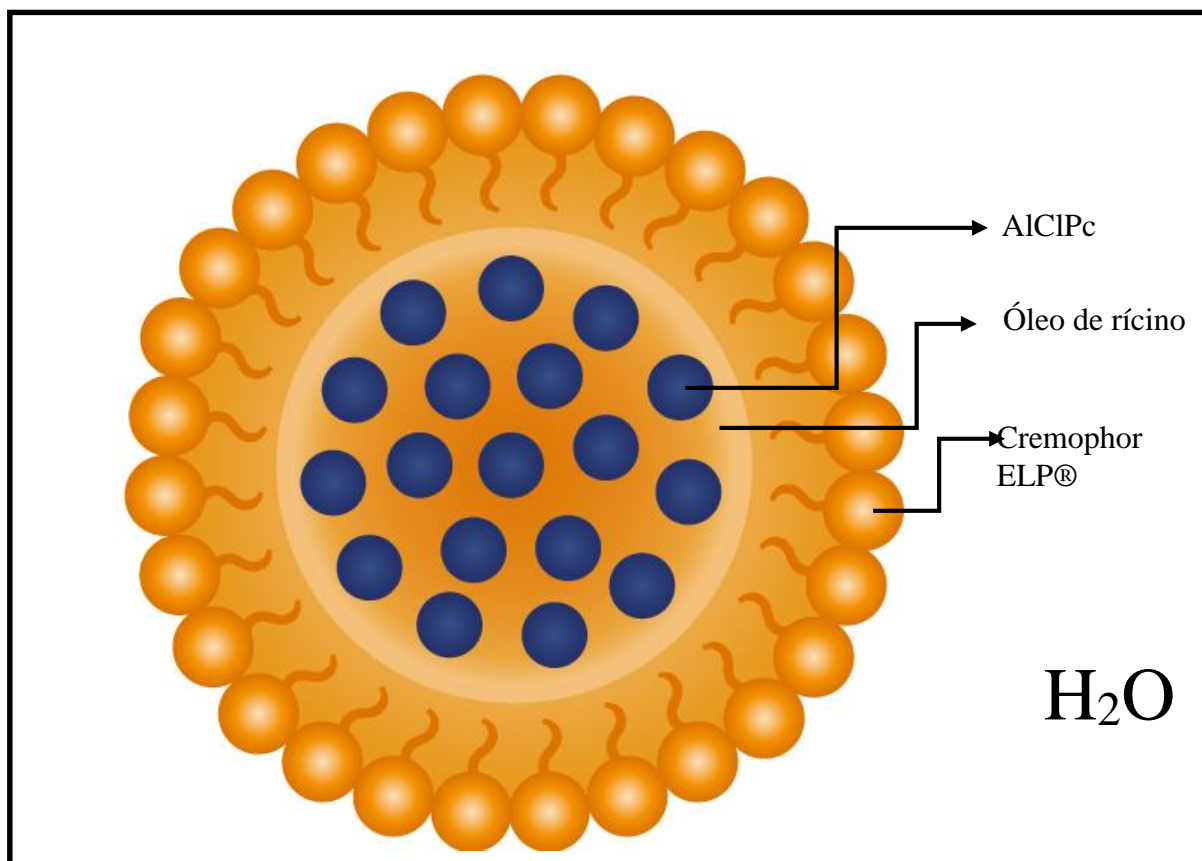


Figura 4.2: Esquema ilustrando a nanopartícula de AICIPc. Imagens de Flávia Barros.

Para aplicabilidade dessa estrutura em sistemas biológicos, é necessário que a nanoemulsão mantenha as características anticancerígenas da ftalocianina sem que haja a formação de agregados. Assim, faz-se necessário investigar o comportamento da AICIPc nessa emulsão e sua possível solubilidade. Para isso, as técnicas de espectroscopia Raman convencional e SERS foram utilizadas.

4.2 – Metodologias

4.2.1 - Preparos das amostras e do substrato SERS

a) Alumínio-cloro-ftalocianina

A AICIPc em pó foi adquirida da empresa Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil) e utilizada para análise de Raman convencional, análise SERS de sua solução em água e para produção de nanoemulsões. Para análise SERS da AICIPc em solução aquosa, a AICIPc foi dispersa em água na concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$.

As nanoemulsões de AICIPc foram preparadas por pesquisadores do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (MUEHLMANN et al, 2015). Essas nanoemulsões foram preparadas a partir de uma mistura de 75% de Cremophor ELP e 25% de óleo de rícino. Após a mistura, 12g dessa solução foi diluída em 100 mL de água sob agitação magnética. Em seguida, diferentes concentrações de AICIPc foram acrescentadas a essa solução formando assim soluções suspensas de nanopartículas de Cremophor e óleo de rícino contendo moléculas de AICIPc. Neste trabalho foram utilizadas nanoemulsões com concentração de 5, 15, 40 e 65 $\mu\text{mol/L}$ de AICIPc nas nanopartículas e concentração final na solução de 1 $\mu\text{mol/L}$ de AICIPc para todas as amostras.

b) Substrato SERS

Para o estudo da solução aquosa e das nanoemulsões à base de AICIPc, foram utilizados colóides de prata como substrato SERS. O colóide foi preparado pelo procedimento de Lee-

Meisel no qual se obtém a redução do nitrato de prata (AgNO_3) com o citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (LEE; MEISEL, 1982). Nesse procedimento, 34 mg de AgNO_3 são adicionados, sob agitação, em 150 mL água destilada aquecida ao ponto de ebulição, quando então 2,5 mL de citrato de sódio a 1% são adicionados. Mantem-se a mistura sob aquecimento e agitação até a solução apresentar uma cor amarelada, aproximadamente 15 minutos. Em seguida, adiciona-se mais 150 mL de água destilada fria e o aquecimento é desligado. Mantém-se sob a agitação por mais 10 minutos para que a solução esfrie. O coloide é guardado em vidraria escura e mantido sob refrigeração.

Após a síntese do coloide, esse foi misturado com solução aquosa de NaCl (0,1 mol/L) em uma proporção de 1:1. Esse procedimento permite a agregação das partículas de prata para intensificação do sinal Raman. Em seguida, as nanoemulsões de AICIPc (ou a solução aquosa) foram acrescentadas em diferentes proporções à mistura de coloide de prata e NaCl. As proporções foram testadas para que se encontrasse aquela que proporciona maior intensificação Raman e a melhor relação sinal/ruído.

4.2.2 – Instrumentação

Para a aquisição dos espectros Raman foi utilizado um espectrômetro triplo Jobin Yvon, modelo T64000 equipado com grades de 1800 linhas por mm e uma CCD (Charge-Coupled Device) de 2048 x 512 pixels resfriada a nitrogênio. As medidas foram realizadas com o sistema em micro-Raman com objetivas de 100 vezes e um Laser de Argônio sintonizado na linha 488 nm (azul) foi usado como fonte de excitação.

4.3 – Resultados e Discussões

A Figura 4.3 apresenta os espectros Raman convencional da Alumínio-Cloro-Ftalocianina em pó (Figura 4.3 (a)), em solução aquosa (Figura 4.3 (b)) e da nanoemulsão com 15 $\mu\text{mol/L}$ de AlClPc (Figure 4.3 (c)). Observa-se que os espectros da solução aquosa e da nanoemulsão são dominados por um forte sinal de fluorescência, o que impede a visualização dos modos vibracionais Raman. O espectro Raman da AlClPc em pó (Figure 4.3 (b)) foi ampliado em 100 vezes para que possa ser visualizado com os demais. Esse é um típico espectro da AlClPc em pó e seus principais modos vibracionais e atribuições, mostrados na Tabela 4.1, estão de acordo com a literatura (BASOVA, 2011). Apesar da molécula de AlClPc apresentar modos vibracionais altamente acoplados, pode-se afirmar que o espectro Raman é dominado pelas vibrações provindas do grupo do benzeno (em torno de 690, 1110, 1190, 1305, 1340, 1410, 1590 e 1610 cm^{-1}), macrociclo (em torno de 590, 750, 830, 1520 e 1538 cm^{-1}) e do pirrol (em torno de 830, 1037 e 1210 cm^{-1}).

A Figura 4.4 apresenta o espectro Raman convencional da AlClPc em pó e o espectro SERS da solução aquosa de AlClPc com concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$, ambos normalizados pela área integrada na região espectral de 400 a 1800 cm^{-1} . Nota-se que o espectro SERS da solução aquosa de AlClPc possui diferenças significativas quando comparado com o espectro Raman convencional da AlClPc em pó. As principais mudanças estão na quase completa ausência dos modos vibracionais provenientes da região central da molécula de AlClPc (macrociclo e pirrol) e deslocamentos dos modos vibracionais dos anéis de benzeno. Essas mudanças espectrais poderiam estar associadas com a formação de complexos químicos entre as moléculas de AlClPc e as nanopartículas de prata do coloide, que pode ocorrer através da ligação química Ag-Cl. Como resultado dessa interação, as moléculas de AlClPc estariam orientadas com a face voltada para a superfície em nanopartículas Ag. No entanto, esta hipótese pode ser

descartada por regras de seleção de superfície. Nessa configuração estrutural, seria de se esperar uma forte intensificação dos modos vibracionais fora do plano (presentes entre $500 - 1000 \text{ cm}^{-1}$) e ausência dos modos vibracionais no plano dos anéis. Contudo, observa-se nos espectros um comportamento completamente inverso (GAO; DAVIES; WEAVER, 1990). Além disso, acredita-se que a baixa solubilidade das moléculas de AlClPc em meio aquoso leva à formação de agregados, fazendo com que o teor de moléculas de AlClPc livres, disponíveis para se ligar à superfície das nanopartículas de prata, seja muito baixo, o que impede a obtenção de sinal SERS desses complexos químicos.

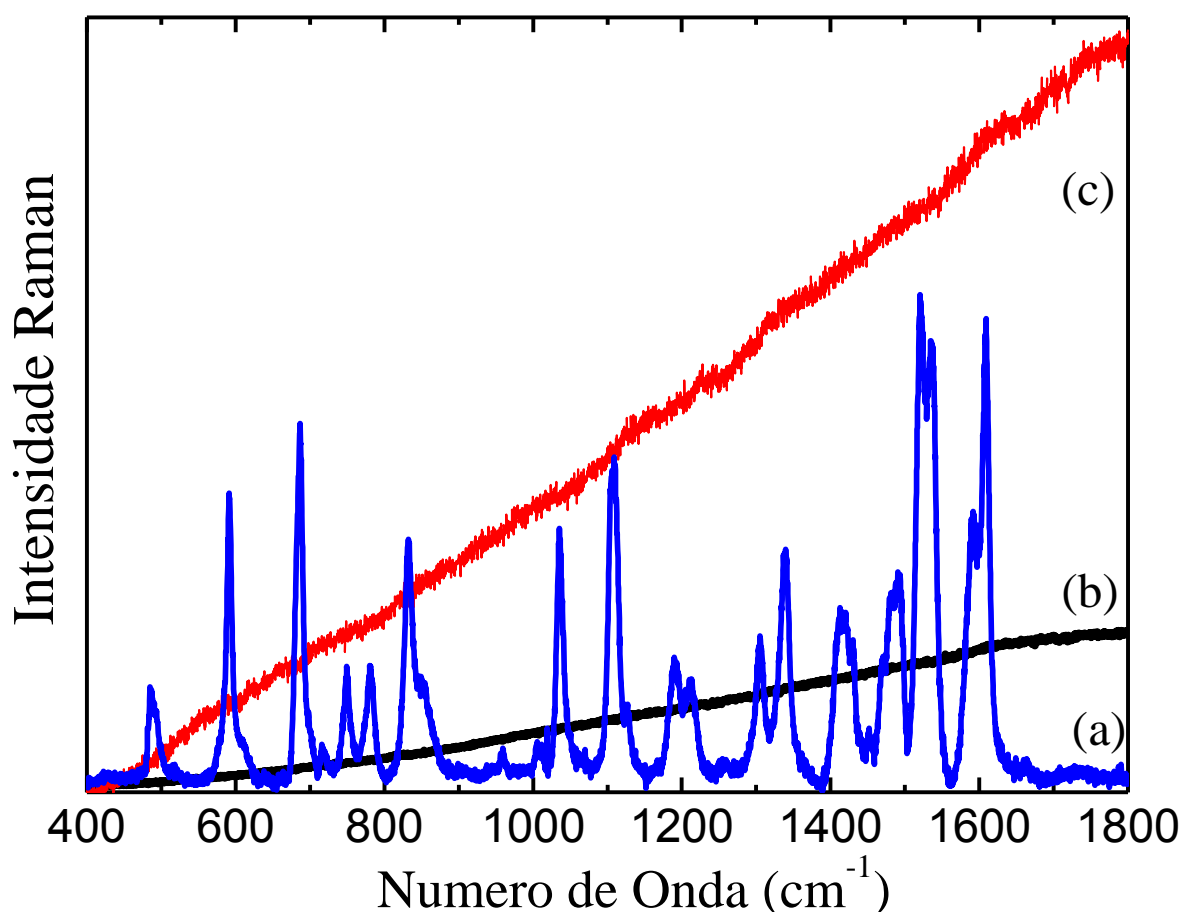


Figura 4.3: Espectros Raman convencional da Alumínio-Cloro Ftalocianina em solução aquosa (a), em pó (b) e em nanoemulsão com $15 \mu\text{mol/L}$ de AlClPc (c).

Tabela 4.1 – Atribuições dos modos vibracionais do espectro Raman convencional da AICIPc em pó (BASOVA, 2011).

Pico Raman (cm ⁻¹)	Atribuições
590	<i>Macroring Breath.</i> , C _α -N _α
690	C _α -N _β -C _α , N _α -C _α -C _β , C _β -C _γ -C _δ
750	C _α -N _α -C _α , Al-N _α , N _α -C _α -N _β , C _γ -C _δ -C _δ
780	C _β -C _γ -H, C _γ -C _δ -H OOP
830	C _α -N _α -C _α , C _α -N _β -C _α , N _α -C _α -N _β
1037	C _α -N _β -C _α , <i>isoindole def.</i>
1110	C _β -C _γ -H, C _δ -C _δ -H, <i>benz. breath.</i>
1190	C _δ -C _δ -H, C _γ -C _δ -H,
1210	C _α -N _α -C _α , <i>isoindole def.</i> , C _β -C _γ -H
1305	C _β -C _γ -H, C _γ -C _δ -H, C _α -C _β - C _β
1340	<i>macroring def.</i>
1410	C _α -N _α , C _α -N _β -C _α , C _δ -C _δ
1485	C _β - C _β , C _β -C _γ -H
1520	C _α -N _β
1538	C _α -C _β , C _β - C _β , C _α -N _β
1590	C _β -C _β , C _δ -C _δ , C _β - C _γ
1610	C _β -C _γ , C _γ -C _δ

A formação de agregados ocorre devido à forte interação AICIPc-AICIPc decorrente do sistema de anel aromático planar, que conduz à formação de estruturas ordenadas com os anéis de benzeno da molécula de AICIPc, preferencialmente localizado na superfície externa do sistema agregados (UDAL'TSOV; BOLSHAKOVA; VOS, 2014). Uma vez que o fator de intensificação SERS decai com $1/r^{12}$, os espectros SERS dos agregados dependem das espécies químicas dominantes mais próximas da superfície das nanopartículas de prata, que são alcançadas pelo feixe de laser incidente. No presente caso, as estruturas químicas fotoexcitadas são preferencialmente os anéis de benzeno, situados nas extremidades da molécula de AICIPc. Esse resultado explica a ausência dos modos vibracionais da região central da molécula de AICIPc e a presença de modos provenientes dos anéis de benzeno no espectro SERS da solução aquosa de AICIPc.

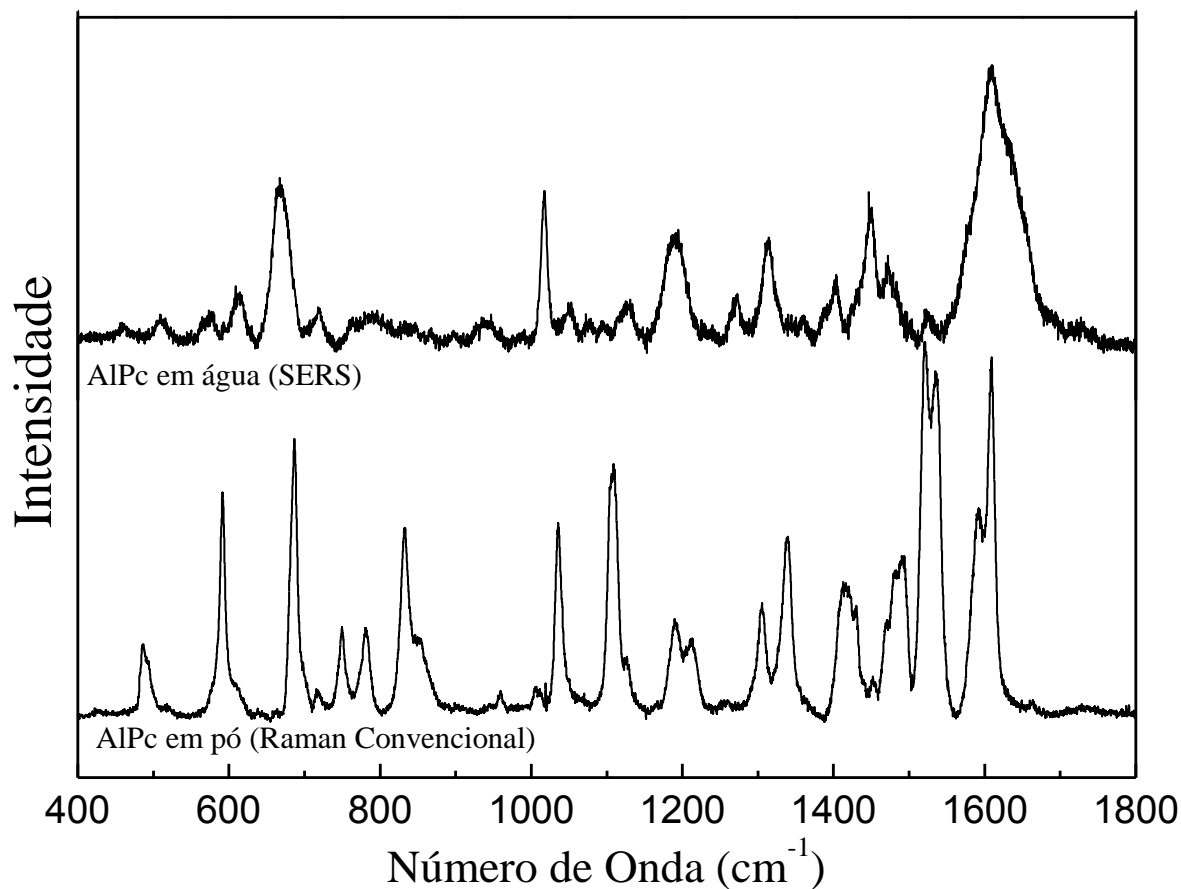


Figura 4.4: Espectro Raman convencional AlCIPc em pó e espectro SERS da solução aquosa de AlCIPc, normalizados pela área.

A Figura 4.5 mostra os espectros SERS das nanoemulsões com concentração de 5, 15, 40 e 65 $\mu\text{mol/L}$ de AlCIPc nas nanopartículas (Figura 4.5 (b) – (e)) e com concentração final na solução de 1 $\mu\text{mol/L}$ de AlCIPc para todas as amostras. Para melhor visualização todos os espectros foram normalizados pela área integrada. Para comparação, também são apresentados o espectro Raman convencional da AlCIPc em pó (Figure 4.5 (a)) e o espectro SERS da solução aquosa de AlCIPc com concentração de 1 $\mu\text{mol/L}$ (Figure 4.5 (f)). Os espectros SERS das amostras de nanoemulsões apresentam características similares ao espectro Raman convencional da AlCIPc em pó. No entanto, com uma análise cuidadosa, percebem-se diferenças marcantes, principalmente em relação à presença ou ausência de certas bandas e em

termos da variação de intensidades relativas de alguns picos. Por exemplo, o pico na região de 750 cm^{-1} , que corresponde as vibrações dos modos de $C_{\alpha}-N_{\alpha}-C_{\alpha}$ e $Al-N_{\alpha}$, está presente no espectro da AlClPc em pó mas está ausente no espectro das nanoemulsões.

Em complemento, o decréscimo entre as áreas integradas sob as bandas vibracionais relativos à região central da molécula de AlClPc (I_c) (bandas em 830 , 1037 e 1520 cm^{-1}) e os modos relacionados ao grupo benzeno, localizados nas extremidades da molécula de AlClPc (I_{ex}) (picos em 1190 , 1410 cm^{-1}), sugere uma tendência de agregação com o aumento da concentração de AlClPc nas nanopartículas das nanoemulsões. O que está de acordo com os resultados de experimentos de fluorescência e absorção (MUEHLMANN et al, 2015). Nitidamente a razão I_c/I_{ex} diminui com o aumento da concentração de AlClPc, tendendo para o espectro SERS da solução aquosa de AlClPc (Figura 4.5 (f)), cujos modos de vibração da região central da molécula estão ausentes. Por exemplo, a razão I_c/I_{ex} entre as áreas das bandas em 1520 , 1036 e 830 cm^{-1} (associadas aos modos vibracionais provenientes da região central das moléculas de AlClPc) com as áreas das bandas e 1410 e 1190 cm^{-1} são mostradas na Tabela 4.2. Verifica-se na Tabela 4.2 que a razão I_c/I_{ex} decresce com o aumento da concentração de AlClPc.

Tabela 4.2: Razão entre as intensidades provenientes da região central e da extremidade das moléculas de AlClPc, na forma de pó e de nanoemulsão.

I_c/I_{ex}	Pó	Concentração ($\mu\text{mol/L}$)			
		5	15	40	60
1520/1410	2.2	2.0	1.5	1.2	0.7
1036/1190	1.8	1.3	0.8	0.7	0.6
830/1190	1.9	1.4	0.8	0.7	0.4

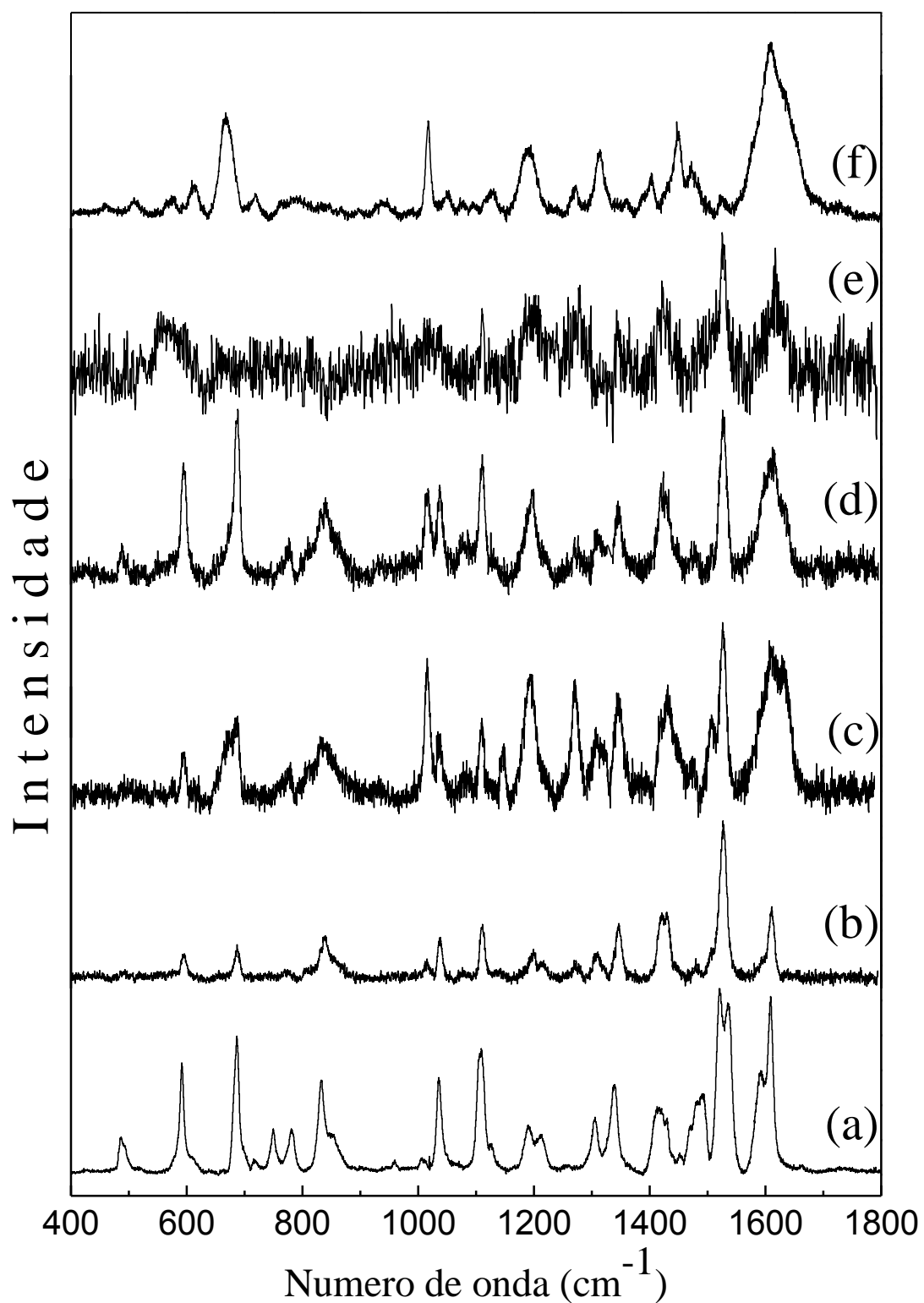


Figura 4.5: Espectro Raman convencional da AlClPc em pó (a), e espectro SERS das nanoemulsões de AlClPc com concentração de 5 (b), 15 (c), 40 (d), 65 (e) μmol/L de AlClPc, e da solução aquosa da AlClPc (f).

4.4 – Conclusões

Os resultados aqui apresentados demonstram que a técnica SERS pode ser utilizada com sucesso no estudo da solubilização de moléculas de AlClPc em meios aquoso e em nanoemulsões. Observou-se, que mesmo na nanoemulsão proposta, o aumento da concentração da AlClPc induz a formação de pequenos agregados moleculares devido a interação entre os macrociclos centrais das moléculas de AlClPc. Entre as amostras estudadas, constatou-se que a nanoemulsão com 40 $\mu\text{mol/L}$ de AlClPc (em suas nanopartículas) mostrou ser a mais indicada para o uso na terapia fotodinâmica, pois, essa apresenta maior concentração de AlClPc sem a formação de grandes agregados que possam prejudicar a TFD.

Capítulo 5

Estudo SERS de Células de Mama (Linha 4T1) Tratadas por TFD Mediada por Nanoemulsão de AlClPc

5. ESTUDO SERS DE CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA (LINHA 4T1) TRATADAS POR TFD MEDIADA POR NANOEMULSÃO DE AICIPc

5.1 – Introdução

O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer entre as mulheres. Em 2012, foram registrados 1,67 milhões de novos casos, o que representa 25% dos cânceres diagnosticados em mulheres (excluindo câncer de pele não melanoma) (IARC, 2013). Os tratamentos mais comumente adotados para o câncer da mama são a cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação desses. A terapia fotodinâmica (TFD) surge como uma técnica nova e menos agressiva que pode substituir ou apoiar os tratamentos convencionais (J. REIBEL, 2003; AGOSTINIS, 2011; DOUGHERTY, 1998; LOVELL, 2010; YANO, 2011; MONGE-FUENTES, DE 2014). Atualmente, a TFD é utilizada em tratamentos superficiais, tais como em câncer de boca e melanoma (AGOSTINIS, 2011; MONGE-FUENTES, DE 2014). No entanto, sistemas nanoestruturados, sondas ou lasers mais penetrantes podem estender o uso da TFD no tratamento de câncer de mama (DOUGHERTY et al., 1998).

A TFD baseia-se na produção de espécies oxidativas por um fotossensibilizador (FS) fotoativado. Esse FS é composto por moléculas capazes de converter a energia da luz em potenciais químicos. Em células aeróbicas, o FS converte tripleto O_2 em singleto O_2 , que é um forte oxidante e provoca estresse oxidativo, se forem gerados em quantidades suficientes (DOUGHERTY et al., 1998). Esse estresse oxidativo pode ser intenso o suficiente para induzir a morte celular ou gerar respostas significativas a esse estresse. Os mecanismos anticancerígenos TFD incluem a indução direta de morte da célula cancerígena (MUEHLMANN et al., 2014; LONGO et al., 2012; MUEHLMANN et al., 2011), o desligamento vascular com isquemia tumoral subsequente (MIJAN et al., 2014), e

ativação/dinamização de respostas imunes contra antígenos tumorais (AGOSTINIS, 2011; DOUGHERTY et al., 1998; CASTANO et al., 2006). No entanto, foi verificado que a TFD pode induzir a geração de subtipos celulares mais resistentes, aumentando a progressão e a agressividade das células tumorais sobreviventes após tratamento (AGOSTINIS et al., 2011).

A espectroscopia Raman é uma técnica bastante útil nos estudos de amostra biológicas, seja células ou tecido, por trazer importantes informações sobre a sua composição bioquímica. Cada pico em seu espectro corresponde a uma vibração molecular de um determinado grupo específico (CH_2 , CH_3 , NH , etc.) e sua intensidade está relacionada a concentração dessas espécies. Assim, o espectro Raman traz uma identidade das espécies químicas presentes na amostra.

A espectroscopia Raman vem sendo utilizada com sucesso como uma ferramenta sensível a diagnósticos de câncer. Trabalhos recentes de espectroscopia Raman em células/tecidos de mama (CHOWDARY et al., 2006; HAKA et al., 2005; HAKA et al., 2006; MATOUSEK; STONE, 2007; THAKUR et al., 2007), cervical (KAMEMOTO et al., 2010; MO, 2009), coloretal (CHEN et al., 2006; WIDJAJA et al., 2008;) e boca (SU et al., 2012) mostram a capacidade da técnica em distinguir células/tecido cancerígenos de não cancerígenos. Além do mais, o uso da técnica SERS, o qual pode intensificar o sinal Raman por fatores maiores que 10^6 vezes, potencializa o poder de diagnóstico (CHEN et al., 2012; TIE et al., 2009).

Contudo, as diferenças espectrais entre a célula cancerígenos e não cancerígenos são muito sutis, muitas vezes difícil de perceber por análises direta dos seus espectros, sendo necessário uma análise estatística. A espectroscopia Raman combinada com análise multivariada, tais como Análises da Componente Principal (PCA), mostrou-se capaz de distinguir diferentes tipos de câncer e mesmo diferentes fases do câncer (THAKUR, 2007; OSHIMA et al., 2010; SU et al., 2012).

Neste trabalho, são apresentados resultados de estudos realizados, por meio da técnica SERS e PCA, de células de câncer de mama tratadas por TFD. Células de câncer de mama de camundongo (linhagem 4T1) cultivadas *in vitro* foram tratadas por TFD utilizando um novo sistema nanoestruturado como droga fotossensibilizadora. O fármaco consiste de uma nanoemulsão de alumínio-cloro ftalocianina (AlClPc), composta por nanopartículas monodispersas formadas por uma mistura de Cremophor ELP® e óleo de rícino, obtido por um método de emulsificação espontânea (MUEHLMANN et al, 2015). Essas nanopartículas contêm moléculas de alumínio-cloro ftalocianina (AlClPc), que é o agente fotossensibilizador, na concentração de 40 µmol/L. Essa nanoemulsão foi diluída em duas concentrações finais (5 µmol/L e 10 µmol/L) para o tratamento. Após o tratamento por TFD, as células foram separadas em dois grupos: células viáveis e células mortas. Células não tratadas por TFD foram usadas como grupo controle. Os cinco grupos celulares foram congeladas em nitrogênio líquido. Filmes de prata eletrodepositados foram utilizados para obter o efeito SERS e a análise multivariada, por meio da PCA.

5.2 – Metodologias

Neste trabalho, a síntese das nanoemulsões e o cultivo, assim como o tratamento das células por terapia fotodinâmica foram realizados por pesquisadores do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

5.2. 1 – Preparos das amostras e do substrato SERS

a) Nanoemulsão de AICIPc

As nanoemulsões de AICIPc foram preparadas a partir da solubilização do pó de AICIPc em etanol 99°GL a uma concentração de 1,7 mM. Em seguida, adicionou-se a essa solução 12g de uma mistura formada por 75% Cremophor ELP® e 25% de óleo de rícino, de modo a obter uma concentração de 40 µmol/L de AICIPc. Então, o etanol foi removido à 100 °C, sob agitação magnética suave (300 RPM por 15 min). Em seguida, após a solução ter esfriado a temperatura ambiente, adicionou-se 70 mL de meio de cultivo sob agitação suave. Esse sistema foi mantido à agitação durante 15 min à temperatura ambiente. Então, os volumes foram ajustados com adição de meio de cultivo para as concentrações finais de 5 e 10 µmol/L de AICIPc. Esse sistema foi denominado NP/AICIPc.

b) Cultura e tratamento das células de câncer de mama

Amostras de células de câncer das glândulas mamárias de camundongo, linhagem 4T1 ATCC® CRL-2539, foram cultivadas em meio eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (100 UI / mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). As células foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera umidificada de CO₂ a 5 % por 24 horas. Em seguida, parte das amostras foram tratadas por TFD (células tratadas) e a outra parte manteve-se nas mesmas condições de cultivo por mais 24 horas sem receber tratamento (células controle), sendo em seguida congeladas com nitrogênio líquido.

Para o tratamento por TFD, as células foram separadas em dois grupos, as que receberam a nanoemulsão de 5 $\mu\text{mol/L}$ de AICIPc e as que receberam a nanoemulsão de 10 $\mu\text{mol/L}$ de AICIPc como fármaco fotossensibilizador. Em ambas amostras, as células foram expostas as nanoemulsões por 15 minutos no escuro e em seguida lavada duas vezes com tampão fosfato-salino (abreviação em inglês PBS). Depois, as células foram expostas a uma lâmpada LED (660 nm) com densidade de energia de 10 J/cm^2 por 10 minutos. Após o tratamento, as células foram cultivadas por mais 24 horas sob as mesmas condições de cultivo descrita anteriormente. Transcorrido esse tempo, foram separados os sobrenadantes (células mortas) das células sobreviventes (células viáveis) e, em seguida, congeladas em nitrogênio líquido.

c) Substrato SERS

Para estudo das células 4T1 foram utilizados filmes eletrodepostos de prata como substrato SERS. Os filmes de prata foram preparados pela eletrodeposição de íons de pratas em eletrodos de prata. Após serem previamente limpos e polidos, os eletrodos de prata são submersos a uma solução de 200 mL de água destilada e 22 mg de AgNO_3 . Em seguida, esses são submetidos a uma diferença de potencial de 3 V e corrente elétrica de aproximadamente 1000 μA por um período de 1 hora. Após a transcrição desse tempo, os eletrodos negativos são imediatamente secos sob fluxo de nitrogênio.

d) Preparos das amostras para medidas SERS

As células congeladas foram maceradas e agitadas para que se obtivesse uma solução líquida e homogênea das partes que compõem as células. Depois, 10 μL dessas células foram depositadas sobre o filme de prata que foi previamente preparado. Em seguida, os filmes foram

secos sob fluxo de nitrogênio e mantidos em recipientes lacrados com papel filme até a sua utilização. Devido a possibilidade de oxidação dos filmes e da degradação das células, as medidas Raman foram realizadas em um curto período, logo após o preparo das amostras até um tempo máximo de aproximadamente 4 horas.

5.2. 2 – Instrumentação

Para a aquisição dos espectros Raman foi utilizado um espectrômetro triplo Jobin Yvon, modelo T64000 equipado com grades de 1800 linhas por mm e uma CCD (Charge-Coupled Device) de 2048 x 512 pixels resfriada a nitrogênio. As medidas SERS das células 4T1 foram realizadas com o sistema em macro-Raman. Nesse sistema, para evitar aquecimento das amostras o feixe de laser foi focalizado na amostra por meio de uma lente cilíndrica de modo que a potência de excitação foi de $0,1 \text{ W/cm}^2$. Laser de Argônio na linha 488 nm (azul) foi usado como fonte de excitação.

5.2. 3 – Análise dos dados

Análises dos dados Raman foram realizados com auxílio dos *softwares* LabSpec 4.10. O sinal de fundo (*background*) foi subtraído dos dados originais dos espectros Raman e individualmente normalizado pela área integrada no intervalo de $400\text{--}1800 \text{ cm}^{-1}$. Com objetivo de verificar as diferenças espectrais entre os cinco grupos celulares, foram realizadas medidas SERS em 30 amostras de cada grupo. Em seguida, análises de componentes principais (PCA)

foram realizadas no conjunto dos 150 espectros. As PCA foram implementadas pelo *software* MINITAB®.

5.3 – Resultados

Os espectros SERS médios obtidos para os cinco grupos de células 4T1, controle e tratadas por TFD (viáveis e mortas), são mostradas na Figura 5.1. Os espectros mostrados foram mediados sobre um conjunto de 30 amostras para cada grupo celular, os quais foram normalizados segundo sua área integrada no intervalo de 400 – 1800 cm^{-1} . Os espectros SERS das células do grupo controle e tratadas por TFD mostram assinaturas espectrais com padrões bem definidos, exibindo uma impressão digital celular composta por sinais de complexos proteicos, lipídicos e de ácidos nucleicos (NOTINGHER et al., 2004). De modo geral, os espectros são muito similares, apresentando somente pequenas variações de intensidades e energias. Os espectros SERS das células tratadas por TFD (viáveis e mortas) mostram, de modo geral, deslocamentos Raman para maiores energias, quando comparadas ao grupo controle, para os modos vibracionais em torno de 765 (Trp), 1122 (C-N Peptídeo), 1173 (Tyr), 1250 (Amide III), 1337 (CH Proteínas), 1500 (Phy) e 1623 (Trp/Tyr) cm^{-1} . As atribuições desses modos vibracionais foram baseadas na literatura (NOTINGHER et al., 2004; VERRIER et al., 2004; ZHOU et al., 2013; BINOY et al., 2004) e estão resumidos na Tabela 5.1. Foi verificado que esses deslocamentos são maiores para os modos vibracionais provenientes dos grupos de células mortas, quando comparadas com os grupos de células viáveis. Observe que a maior parte dessas bandas estão associadas aos modos vibracionais de proteínas.

Tabela 5.1 – Atribuições dos modos vibracionais do espectro SERS da célula 4T1

Pico Raman	Atribuições			
	Proteínas	Lipídios	DNA	Outros
410		PtdIns ^{&}		
456	<i>ring torsion</i> Phe. ^{&}			
485			DNA ^{&}	
520	(-S-S-) ^{&}			
533	C=C ^{&}			
549	(-S-S-) ^{&}			
586				OH ^{&}
593		PtdIns ^{&}		
608	C-C, <i>twist.</i> Phe. ^{&}			
638	C-C, <i>twist.</i> Tyr ^{&}			
655			T, G [*]	CH ₂ <i>out-plane bend.</i> ⁺ <i>ring def</i>
685				
718		C-N ^{*§}		
765	Trp [*]			
813			<i>str.</i> (O-P-O) [*]	
828	<i>ring breath</i> , Tyr [§]		<i>str. as.</i> (O-P-O) [*]	
846	<i>ring breath</i> , Tyr [§]			
973	C-C <i>str</i> β - <i>sheet</i> [*]	CH <i>bend</i> [*]		
1003	Phe. ^{* §}			
1030	Phe. ^{* §}			
1051		(C - C) <i>str.</i> ^{* §}		C-O, C-C [*]
1077			PO ₂ ^{-§}	
1122	C-N <i>str.</i> Peptídeo [§]			
1153	C-C/C-N <i>str.</i> ^{* §}			Glycogen ⁺
1173	C-H <i>bend</i> Tyr [*]			
1199	C-C ₆ H ₄ Phe, Trp. ⁺			
1230		CH <i>bend.</i> [§]		
1253	Amide III ^{*§}		T, A [*]	
1325	CH <i>def.</i> [*]		G [*]	
1337	CH <i>def.</i> ⁺			
1375			A, G ⁺	
1404	CH ₃ <i>colog</i> ⁺			Triglyce ⁺
1434		CH <i>def.</i> [*]	G, A, CH <i>def.</i> [*]	
1488	CH <i>def.</i> [§]		DNA ⁺	
1500	Phy. ⁺			
1565			G, A ⁺	
1591	C-N, NH ₂ ⁺			
1623	C=C Tyr., Trp. ⁺			
1661	Amide I [*]	<i>str.</i> (C = C) [*]		

(NOTINGHER, 2004^{*}; VERRIER et al., 2004⁺; ZHOU et al., 2013[§]; BINOY et al., 2004[&])

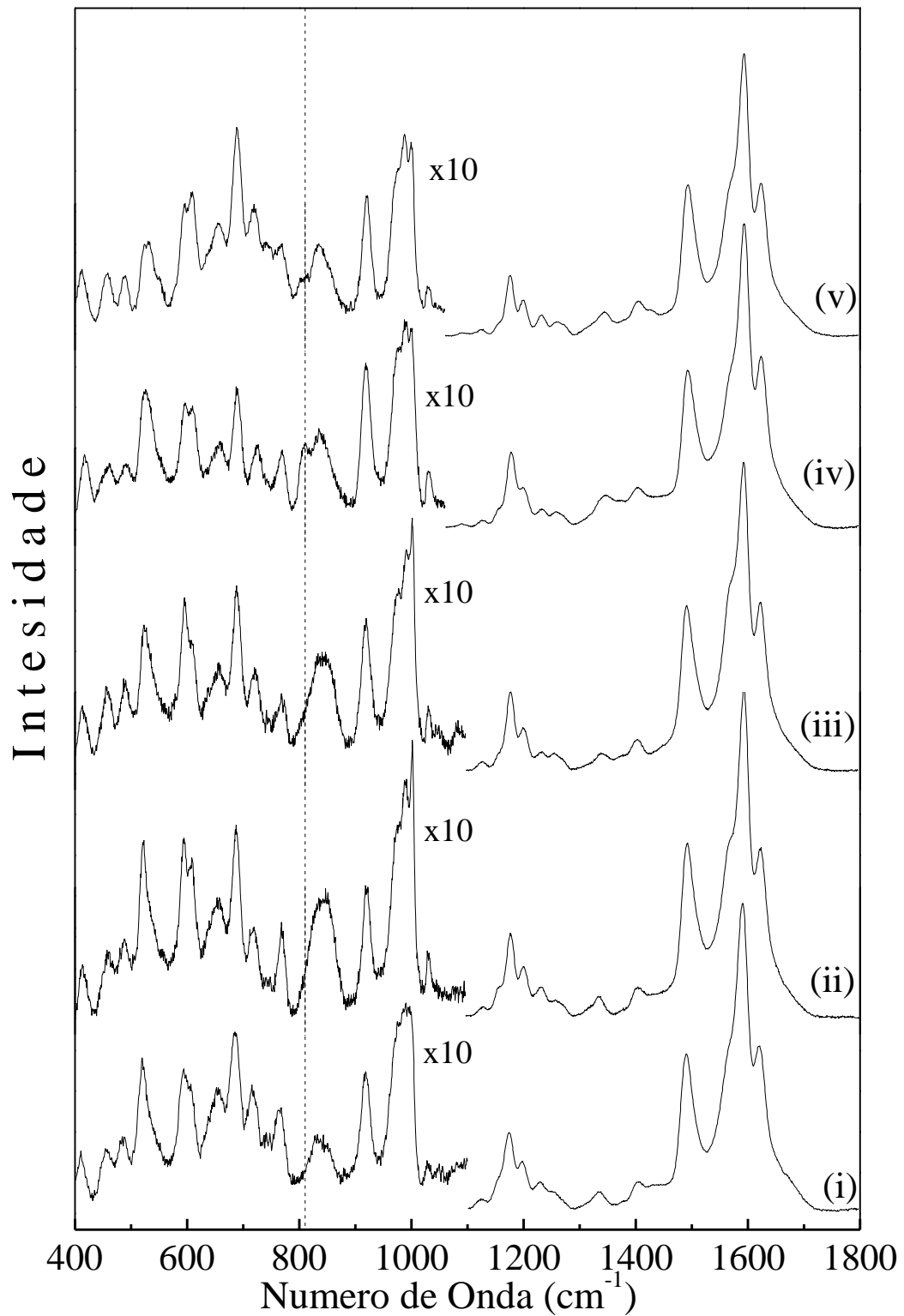


Figure 5.1: Espectros SERS médios das células 4T1 do grupo controle (i) e das células tratadas com NP/AlClPc (ii) - (v), sendo os grupos de células viáveis (ii) - (iii) e mortas (iv) - (v), todos tratados com 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$ de NP/AlClPc, respectivamente. Cada espectro mostrado é uma média dos espectros de 30 amostras de células. Para facilitar visualização a região de mais baixa energia (400 – 1100 cm^{-1}) foi multiplicada por 10.

Os espectros SERS das células mortas (tratadas com 5 e 10 μM) mostram o surgimento de uma nova banda em 813 cm^{-1} e redução da banda em 1565 cm^{-1} , associadas aos modos vibracionais do DNA, ligações fosfodiéster (O-P-O) responsáveis pelo esqueleto das cadeias dorsal e as bases da Adenina/Guanina do DNA, respectivamente (Kang; Austin; El-Sayed, 2014). Curiosamente, a banda em 813 cm^{-1} mostrou-se mais intensa nos espectros do grupo de células tratadas com dosagem de $5\text{ }\mu\text{mol/L}$, quando comparadas com as tratadas com $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ (ver linhas tracejadas na Figura 5.1). Adicionalmente, os espectros SERS de todos os grupos celulares tratados por TFD mostram, com relação ao grupo controle, aumentos de intensidades dos picos relacionados às proteínas (456 (Phe), 608 (Phe), 846 (Tyr), 1003 (Phe), 1030 (Phe) e 1500 (Phy) cm^{-1}). Contudo, foi verificado que esse aumento é maior para os grupos de células viáveis quando comparados aos grupos de células mortas. Exceção a esse comportamento foi observado para as bandas em 520 e 549 cm^{-1} , ambos associados a vibrações (-S-S-) das pontes dissulfeto intramolecular das proteínas. Nesse caso, foi verificado que as intensidades dessas bandas se mantiveram praticamente constantes para ambos os grupos de células viáveis e sofreram fortes reduções de intensidades para ambos os grupos de células mortas (~ 40 e 60% , para os grupos de células mortas tratadas com 5 e $10\text{ }\mu\text{mol/L}$, respectivamente). Por último, também foram observadas reduções de intensidades dos modos vibracionais dos lipídios em 593 (PtdIns), 718 (CN de lipídios), 973 (CH de lipídios), 1051 ((C-C) de lipídios), 1231 (CH de lipídios), 1434 cm^{-1} (CH de lipídios). As Figuras 5.2 (a) e (b) mostram, respectivamente, os resultados dessas comparações para os picos relacionados às proteínas e lipídios como mencionadas acima. As Figuras 5.2 (c) e (d) mostram detalhes de regiões espectrais relacionados a alguns desses modos vibracionais.

As variações espectrais observadas para os grupos células viáveis (tratadas com concentrações de 5 e $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ de NP/AICIPc), com relação ao grupo controle, são menores para lipídios e maiores para proteínas (ver Figura 5.2); isto é, a área integrada total dos modos

vibracionais relacionados às proteínas cresceu, com relação ao grupo controle, em média 42 % para os grupos de células mortas (35 e 50 % para as tratadas com 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente) e 80 % para as células viáveis (85 e 75 % para as tratadas com 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente). Por outro lado, a redução das áreas integradas totais relacionadas aos modos vibracionais dos lipídios, decresceram em média 35 % (32 e 37 % para as tratadas com 5 e 10 μM , respectivamente) e 20 % (18 e 22 % para as tratadas com 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente) para os grupos de células mortas e viáveis, respectivamente. As variações espectrais relacionadas aos modos vibracionais dos ácidos nucleicos também foram menores para os casos das células viáveis quando comparadas com os de células mortas. A principal diferença está na ausência do pico em 813 cm^{-1} , observado somente nos espectros SERS das células mortas.

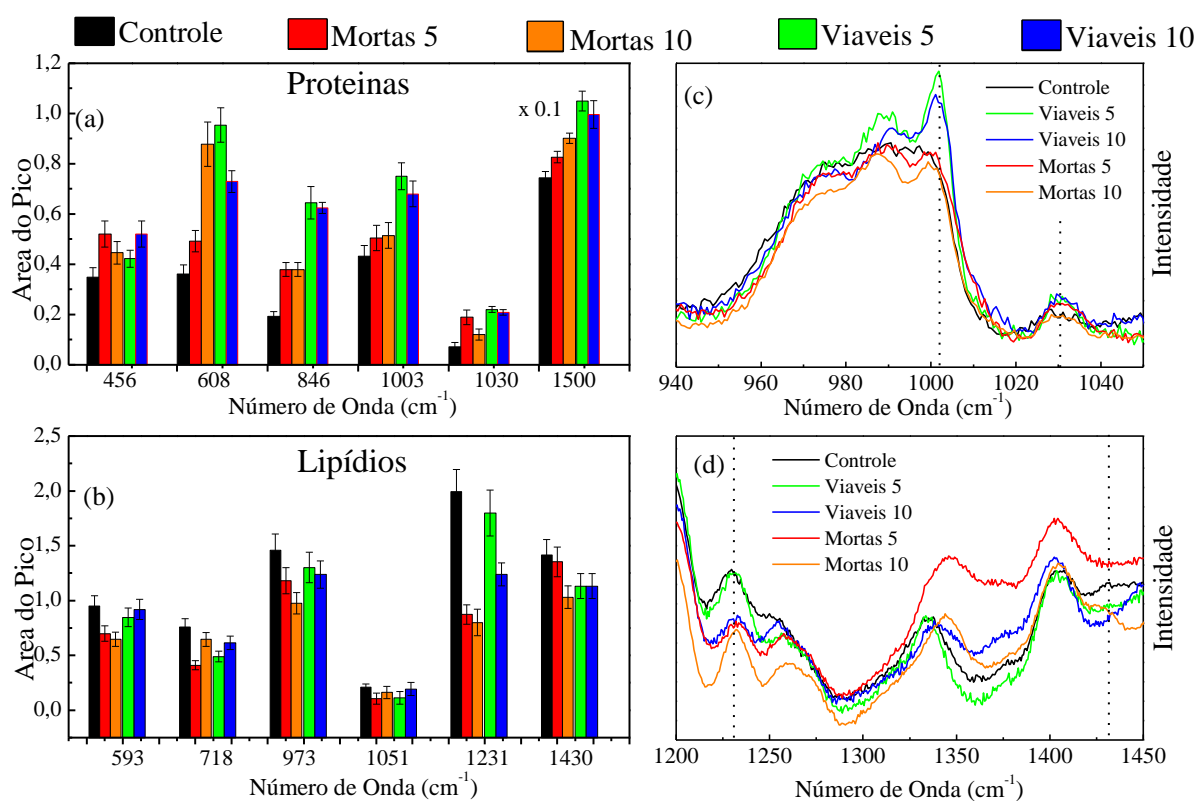


Figura 5.2: Comparação entre os valores de intensidades médias e desvios padrões de picos SERS relacionados a proteínas (a) e lipídios (b). Em (c) e (d) são mostrados detalhes das regiões espectrais relativos a proteínas e lipídios, respectivamente.

Com o objetivo de determinar se os espectros SERS podem ser usados para distinção entre as células tratadas com TFD mediada por nanoemulsão contendo AICIPc nas concentrações finais de 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$ (viáveis e mortas) com as do grupo controle foram empregadas ferramentas de análise estatística multivariacional nos espectros SERS. Por permitir apresentar as principais informações espectrais em um conjunto de componentes principais (PC's) a técnica escolhida foi a PCA (Análise de Componentes Principais). Mais detalhes da técnica de PCA podem ser encontrados na seção 3.4. A matriz de covariância foi construída a partir dos espectros SERS (todos os pontos do espectro) dos 150 espectros obtidos, sendo 30 espectros para cada grupo celular, de modo a determinar a variância entre os diferentes grupos celulares. Assim, como na Figura 5.1, as PC's foram realizadas após a correção da linha de base e a normalização dos espectros segundo suas áreas espectrais integradas no intervalo de $400 - 1800 \text{ cm}^{-1}$. Um exemplo típico da variância espectral é mostrado na Figura 5.3 para os grupos de células controle e tratadas por TFD com dosagem de 10 $\mu\text{mol/L}$ de AICIPc (viáveis e mortas). As linhas cheias mostram as médias espectrais.

Na Figura 5.4 são mostradas as dispersões de pontos utilizando as três primeiras PC's, as quais representam variâncias superiores a 41 %. Verifica-se na Figura 5.4 a formação de conjuntos de pontos bem definidos no espaço das PC's, correspondendo às células do grupo controle (preta) e dos grupos de células mortas (vermelho (5 $\mu\text{mol/L}$) e laranja (10 $\mu\text{mol/L}$)) e viáveis (verde (5 $\mu\text{mol/L}$) e azul (10 $\mu\text{mol/L}$)). A Figura 5.4 (a) mostra as três primeiras PC's que representam 45 % da variância dos dados obtidos para o grupo de células mortas comparadas com o grupo de células controle e, 43 % para os grupos de células viáveis, também comparadas com o grupo de células controle (Figura 5.4 (b)). Note que, enquanto os agrupamentos de células mortas estão bem separados, superposições entre as células viáveis, tratadas com dosagens de 5 e 10 μM podem ser observadas. Comparações entre o grupo controle

e os grupos de células tratadas com NP/AlClPc de 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$ (mortas e viáveis) são mostradas nas Figura 5.4 (c) e (d), respectivamente. Por último, na Figura 5.4 (e) é mostrada uma comparação entre todos os grupos celulares aqui estudados.

Os dados mostrados na Fig. 5.4 demonstram que os espectros SERS de todos os grupos celulares são altamente reprodutivos tanto entre os espectros de cada grupo quanto entre os espectros de um mesmo grupo celular. Este resultado reforça os dados estatísticos mostrados na Figura 5.2, os quais permitem confiar na variação dos valores das áreas integradas referentes aos modos vibracionais associados às proteínas e lipídios.

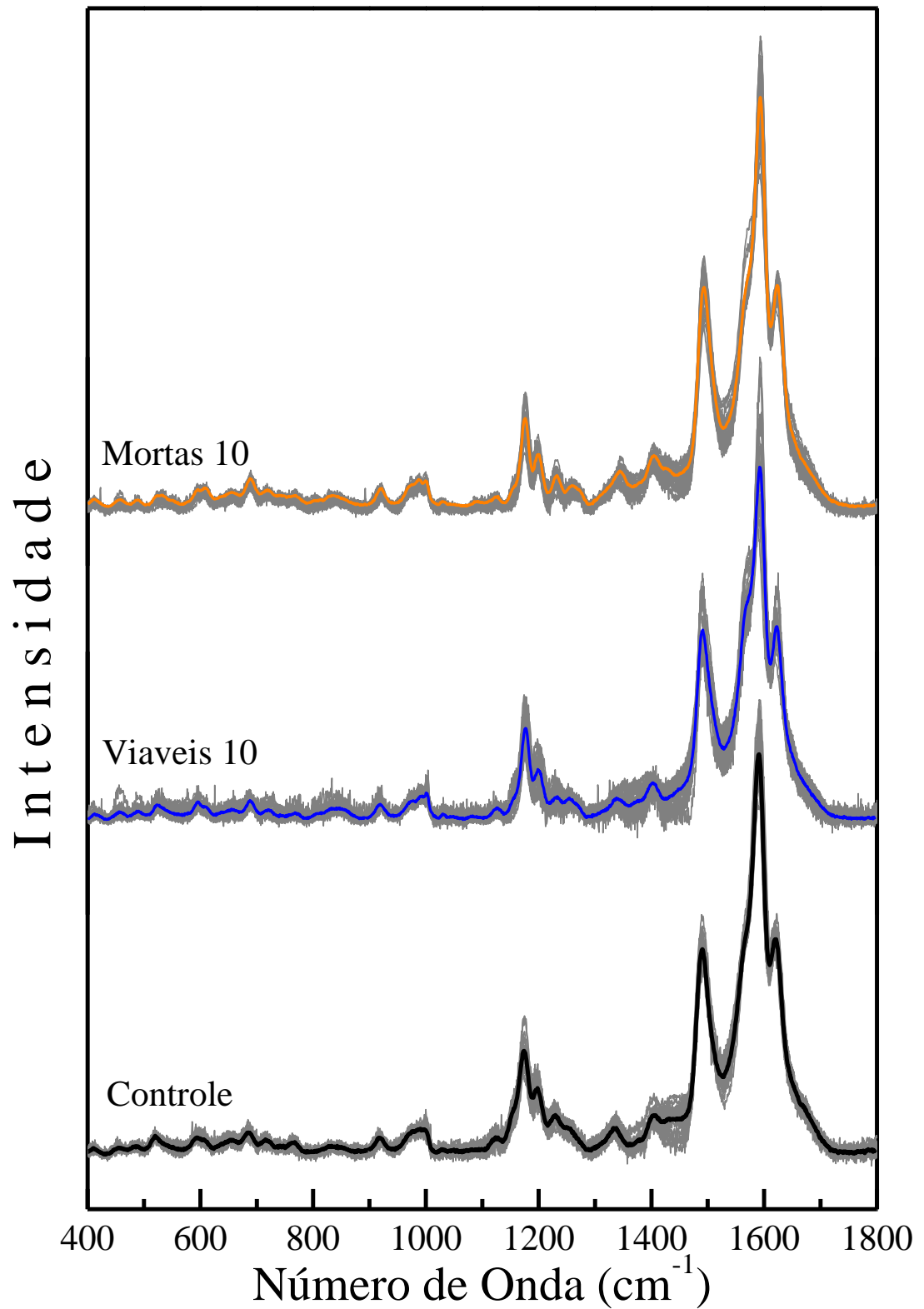


Figura 5.3: Espectros SERS para os grupos de células 4T1 controle, viáveis e mortas ambas tratadas por TFD mediadas por NP/AlClPc com dosagem de 10 $\mu\text{mol/L}$. As linhas cheias mostram as médias espectrais.

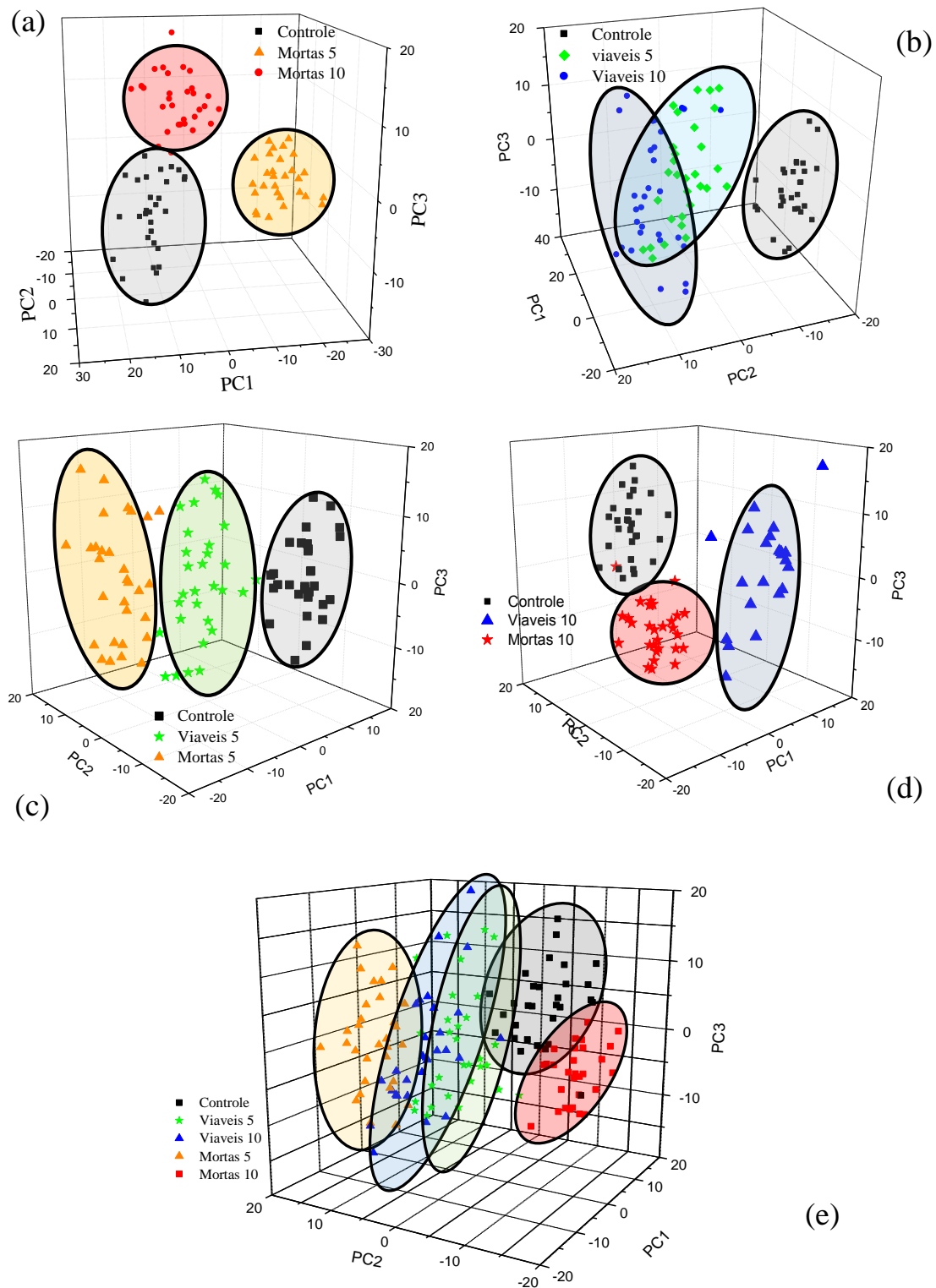


Figura 5.4: PCA dos grupos de células controle e tratadas por TFD mediadas por NP/AICIPc com dosagem de 5 e 10 $\mu\text{mol/L}$: mortas (a); viáveis (b) e tratadas com 5 $\mu\text{mol/L}$ (c) e 10 $\mu\text{mol/L}$ (d) de NP/AICIPc. Em (e) é mostrada a comparação entre os cinco grupos celulares.

5.4 - Discussão

Em situação de estresse a célula pode reagir de diversas formas, desde a ativação de mecanismos de sobrevivência à indução da morte celular. Inicialmente, a resposta da célula a estímulos estressantes é voltada para a defesa e/ou recuperação dos danos sofridos (FULDA et al., 2010). No entanto, se esse estresse for muito severo ou prolongado, a célula não será capaz de se defender, levando a ativação de mecanismos de morte. A maneira como a célula responde às situações de estresses depende do tipo de célula e do tipo e nível de estresse. No caso de morte celular, a maneira com que a célula morre (apoptose, necrose ou autofagia) depende muitas vezes de sua capacidade em lidar com as condições expostas. Enquanto a sobrevivência depende da capacidade da célula em criar uma resposta adequada ao estímulo (FULDA et al., 2010).

A apoptose é um complexo mecanismo de morte programada que é geneticamente codificado em todas as células do corpo. Inicia-se por meio de ativação dos receptores de morte ou a libertação de citocromo c na mitocôndria. Ambos os eventos conduzem à formação de cascatas de caspases, enzimas que levam à clivagem de substratos celulares. Essa ação induz a mudanças bioquímicas e morfológicas como fragmentação do DNA, fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos. O processo apoptótico é rigorosamente controlada por várias proteínas (MROZ et al., 2011). A necrose, por sua vez, é um processo de morte celular não programado que ocorre de maneira rápida e violenta. Ela é caracterizada pelo inchaço citoplasmático, destruição de organelas e ruptura da membrana plasmática, que conduz à libertação de conteúdos intracelulares (MROZ et al., 2011). A autofagia é um mecanismo de morte celular catabólico que permite que a célula mantenha um equilíbrio entre a síntese, a degradação, e reciclagem de produtos celulares. O processo de morte por autofagia envolve a degradação lisossomal de organelas celulares e de proteínas. Esse processo facilita a eliminação de proteínas, organelas e microorganismos invasores indesejados. Além disso, a autofagia

permitindo que os nutrientes das células mortas sejam realocados para as células sobreviventes em situação de estresse (MROZ et al., 2011).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão entre as ameaças mais potentes enfrentadas pelas células. As EROs podem causar danos as principais classes de macromoléculas biológicas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, hidratos de carbono e lipídios (FULDA et al., 2010). Quando as defesas antioxidantes das células estão sobrecarregadas, as EROs podem induzir a morte celular. O desequilíbrio entre os agentes oxidantes e os anti-oxidantes não só determina o destino celular, como também o tipo de morte. Diversos estudos mostram que EROs, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO), são capazes de induzir a morte por apoptose (FULDA et al., 2010). No entanto, as EROs também podem interferir no programa de morte por apoptose, fazendo com que a células morra por necrose (FULDA et al., 2010).

A espectroscopia Raman tem sido empregada na identificação dos processos de morte de vários tipos celulares, tais como células de leucemia (CHAN et al., 2008), linfócitos T (PUPPLES et al., 1991) (PULLY; LENFERINK; OTTO, 2011), células de melanoma (MEL-28) (KUNAPAREDDY; FREYER; MOURANT, 2008) entre outras (BRAUCHE et al., 2014; VERRIER et al., 2004). Nesses estudos, os efeitos físicos, agentes quimioterápicos ou outras substâncias farmacêuticos foram usadas para induzir variantes de eventos de morte celular que revelem os diferentes impactos sobre a constituição molecular das células. Todos esses estudos identificaram diferenças significativas nos espectros Raman de células individuais quando comparadas com células não tratadas (controle). Em trabalho recente (BRAUCHE et al., 2014), ao estudar morte celular por apoptose e necrose induzidas por exposição à diferentes temperaturas, os autores verificaram aumentos de intensidade dos picos Raman associados ao DNA (em 795 e 1375 cm^{-1}), para ambos os casos de mortes, quando comparado com o grupo controle. Contudo, os modos vibracionais em 786 e 1315 cm^{-1} , também atribuído ao DNA,

apresentaram comportamento inverso. Ou seja, redução de intensidade em ambos os casos. Os autores também constataram que o pico em 1375 cm^{-1} estava praticamente ausente nos espectros Raman das células controle e presentes nos espectros das células mortas. De acordo com o trabalho, o aumento de intensidade do pico em 1375 cm^{-1} poderia ser explicado considerando a condensação do núcleo celular, associado a ambos os processos de morte. Esta conclusão foi baseada em observações relatadas em outros trabalhos da literatura (PUPPLES et al., 1991; PULLY; LENFERINK; OTTO, 2011). Em complemento a esses resultados, foi também observado que o pico em 1003 cm^{-1} , associado a Fenilalanina das proteínas, apresenta intensidade aumentada para as células necróticas e reduzidas para as células apoptóticas. Também foi observado que o pico em 1437 cm^{-1} , associado a lipídios, mostra suas intensidades aumentadas para as células apoptóticas e reduzidas para as necróticas. Resultados semelhantes foram observados por Ioan Notingher et al. (2004) e Verrier et al. (2004) ao estudarem processos de morte celular por apoptose. Ambos os trabalhos observaram decréscimos de intensidades dos picos associados ao DNA ($\sim 788\text{ cm}^{-1}$) e proteínas (1005, 1322, 1342 cm^{-1}) e aumentos de intensidades dos picos associados a lipídios ($1301, 1449\text{ e }1660\text{ cm}^{-1}$).

Resultados também em acordo com os obtidos por Brauche et al. (2014) foram reportados no trabalho de Kunapareddy e colaboradores (KUNAPAREDDY; FREYER; MOURANT, 2008). Esses autores verificaram que para o caso de morte por necrose há reduções de intensidades dos picos associados a lipídios ($935, 1085\text{ e }1448\text{ cm}^{-1}$) e aumentos de intensidades dos picos associados a proteínas ($642, 875, 1230, 1395\text{ e }1425\text{ cm}^{-1}$). Assim como nos trabalhos anteriores, os picos relacionados aos modos vibracionais do DNA/RNA não apresentaram comportamento único. Foram observados aumentos de intensidades dos picos em $781, 985, 1575\text{ cm}^{-1}$ e reduções dos picos em $667, 990\text{ e }1305\text{ cm}^{-1}$.

A despeito da divergência dos comportamentos observados para as intensidades Raman das bandas Raman do DNA/RNA, pode-se concluir que a morte por apoptose é caracterizada

pelo aumento de intensidade dos modos vibracionais relacionados a lipídios e decréscimos de intensidades dos modos associados a proteínas. Por outro lado, a morte por necrose leva ao aumento de intensidade dos modos vibracionais associados à proteínas e redução das intensidades das bandas atribuídas aos lipídios.

Infelizmente, são poucos os trabalhos da literatura que discutem as possíveis origens dos diferentes comportamentos relativos às variações de intensidades dos modos vibracionais de lipídios e proteínas. Por exemplo, no trabalho de Verrier et al. (2004) é argumentado que o decréscimo de intensidades dos picos Raman associados às proteínas, observado no processo de morte por apoptose, estaria relacionado a diminuição do teor de proteínas nas células apoptóticas devido a ativação da cascata das caspases responsável pela clivagem das mesmas. Hipótese semelhante é defendida por BRAUCHE et al. (2014). Já no processo de morte por necrose, o aumento dos sinais de proteínas, nos espectros de Raman, pode ter sido desencadeado pelo lançamento de proteínas dos núcleos necrosados para o citosol (BRAUCHE et al., 2014). Ainda de acordo com esses autores o aumento do sinal Raman em 1375 cm^{-1} pode indicar mudança na arquitetura da cromatina, desencadeada pela liberação do HMGB1, uma proteína de ligação da cromatina que é realocada em células necróticas. Por outro lado, no trabalho de Kunapareddy e colaboradores, foi sugerido que o decréscimo nas intensidades dos sinais Raman associados a lipídios estaria consistente com o processo de morte por necrose de coagulação, onde a destruição das estruturas citoplasmáticas e a degradação das membranas celulares, que ocorrem nas primeiras 24 horas, seriam os responsáveis pela diminuição do teor de lipídio (KUNAPAREDDY; FREYER; MOURANT, 2008). Com isso, o aumento da intensidade dos picos Raman associados às proteínas estaria diretamente associado à forma como os espectros foram por eles analisados. Na análise, todos os espectros foram normalizados, assim, a diminuição de uma componente espectral (no caso os lipídios)

implicaria no aumento de outra (proteínas). Apesar dessa observação os autores relatam que há evidências espectrais indicando mudanças na conformação ou na composição das proteínas.

Com base na discussão acima e nos resultados apresentados na Figura 5.2, onde é verificado o aumento dos sinais SERS relacionados às proteínas e diminuição dos modos vibracionais associados a lipídios, pode-se concluir com segurança que a necrose é o processo responsável pela morte celular dos dois grupos de células 4T1 tratadas com TFD mediada por NP/AICIPc (5 e 10 μM). Esse resultado está de acordo com o relatado no trabalho de colegas do nosso grupo pesquisa (MUEHLMANN et al., 2014), onde foi estudado a eficácia do tratamento de células tumorais (4T1 e MCF7) e não tumorais (NIH/3T3 e MCF-7) por TFD mediada por AICIPc associado a nanopartículas poliméricas de PVM/MA (poli(vinil metil éter-co-anidrido maleico)). Nesse trabalho, foi observado que o tratamento por TFD induz morte celular por apoptose, quando as células são irradiadas sob a condição de baixa densidade de energia ($0,48 \text{ J/cm}^2$) e por necrose quando iluminado com alta densidade de energia ($1,38 \text{ J/cm}^2$). Para o caso de morte por necrose, a degradação da membrana celular das células tumorais foi comprovada por meio de análise morfológica de células coradas com brometo de etídio (MUEHLMANN et al, 2014). Resultado em acordo com a redução do teor de lipídio, como aqui observado. Vale ressaltar que a densidade de energia utilizada no presente trabalho foi de 10 J/cm^2 , portanto é de se esperar que o processo de morte por necrose seja dominante.

Apesar dos modos vibracionais do DNA/RNA não apresentarem um comportamento único, na morte por apoptose ou por necrose, a redução das intensidades dos modos vibracionais relacionados às ligações fosfodiéster (O-P-O) da estrutura do DNA foi recentemente atribuído a morte celular por apoptose (KANG; AUSTIN; EL-SAYED, 2014). Nesse trabalho, os autores utilizaram nanopartículas de ouro para intensificação do sinal Rayleigh e Raman de células de câncer de boca humano (SH-3) para investigar o processo de morte por apoptose induzida por peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Observou-se que durante a apoptose havia um o decréscimo do

modo vibracional em 838 cm^{-1} , associado a ligações fosfodiéster (O-P-O), e um aumento do modo em 1585 cm^{-1} , associado vibração de N₇-H das bases de DNA (guanina/adenina). Segundo os autores, este comportamento está associado a fragmentação da estrutura do DNA nas ligações fosfodiéster, a qual possibilita a exposição das bases da cadeia do DNA à intensificação do campo plasmonico das nanopartículas de ouro.

Os dados aqui mostrados diferem dos resultados relatados na referencia (KANG; AUSTIN; EL-SAYED, 2014). O fato de observar um aumento de intensidade do pico em 813 cm^{-1} e redução da banda em 1565 cm^{-1} sugere que no presente caso, a fragmentação do DNA se dá principalmente pela quebra dos pares de base do DNA em vez da quebra da ligação fosfodiéster, como relatado por Kang e colaboradores. A quebra dos pares de base promove a exposição do esqueleto da cadeia dorsal do DNA ao substrato de prata, resultando na intensificação do seu sinal Raman (efeito SERS). O fato da banda em 813 cm^{-1} ser mais intensa nos espectros SERS das células mortas, tratadas com a dosagem de $5\text{ }\mu\text{M}$, quando comparadas com as tratadas com $10\mu\text{M}$, pode ser explicado considerando o maior grau de fragmentação do DNA deste último grupo celular. Neste caso, além da quebra dos pares de base do DNA sugere-se também quebras das ligações dos fosfodiéster.

Além das modificações espectrais relacionadas a fragmentação do DNA, verificou-se também, como relatado anteriormente, um decréscimo das intensidades das bandas em 520 e 549 cm^{-1} , associadas a vibrações (-S-S-) das proteínas, nos espectros SERS das células mortas (ver Figura 5.1). Este comportamento pode ser explicado levando-se em conta a quebra das pontes dissulfeto intramolecular responsável pelo enovelamento das proteínas terciárias (KANG; AUSTIN; EL-SAYED, 2014).

É conhecido da literatura que um dos principais catalizadores das pontes dissulfeto são as enzimas ERO- α (retículo endoplasmático oxidoreductase alfa) que são produzidas nos retículos endoplasmáticos (ARAKI; NAGATA, 2011). Kutomi et al. (2013) observaram um

aumento expressivo de ERO- α nas células de câncer de mama 4T1 *in vitro* e em pacientes como câncer de mama quando comparados com células/tecidos não cancerígenos. Portanto é esperado que células cancerígenas tenham uma maior concentração de pontes dissulfeto. Em trabalho mais recente foi observado uma redução drástica do crescimento tumoral em células 4T1 quando privadas de ERO- α (TANAKA et al., 2015). Os autores concluíram que o ERO- α contribui para supressão da imunidade antitumoral através da regulação das citocinas G-CSF e CXCL1/2 por facilitar a dobragem de proteínas, sugerindo que a inibição dos ERO- α dificulta a progressão do câncer.

Explicar as variações espectrais observadas para as células viáveis, com relação às células dos grupos controle e mortas (como relatadas anteriormente) não é uma tarefa simples. Contudo, pode-se inferir que os expressivos aumentos de intensidades dos modos vibracionais Raman associados às proteínas das células viáveis estejam relacionados com os mecanismos de defesa intracelular. Entre esses mecanismos as alterações de síntese de proteínas codificadas por genes induzidos ou suprimidos durante o estresse celular, causado pela TFD, tem se destacado (AGOSTINIS et al. 2011). Nesse processo, os genes que codificam os sinais indutores de proliferação celular, promove a produção de proteínas (fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, fatores de transcrição e reguladores de apoptose) responsáveis pela proliferação celular. Uma vez estimulada a proliferação celular, diversos mecanismos moleculares são acionados na tentativa de controlar o processo de divisão celular. Para isso, novas proteínas são sintetizadas, tais como as proteínas cíclicas. Apesar do estresse celular estimular reações protetoras para neutralizar os efeitos deletérios, com a produção de proteínas, essa produção será suprimida com a morte celular. Como resultado, verifica-se que as células mortas apresentam um teor menor de proteínas quando comparadas com as viáveis. Assim, justifica-se que o aumento expressivo nas intensidades das bandas Raman atribuídas às proteínas, observadas nos espectros das células viáveis, estão relacionados ao aumento do teor

de proteínas devido a ativação dos mecanismos de defesa induzido pelo estresse oxidativo proveniente terapia fotodinâmica.

Uma análise cuidadosa dos espectros SERS mostrados na Figura 5.1 revela que é possível observar variações espectrais entre os três grupos celulares aqui estudados (controle, mortas e viáveis) e entre as duas diferentes dosagens da NP/AlCl₃Pc (5 e 10 µmol/L) utilizadas nos tratamentos por TFD. Este fato é reforçado pela análise estatística PCA, como mostrado na Figura 5.4. As Figuras 5.4 (a) e (e) mostram que os pontos provenientes dos espectros SERS das células mortas estão em agrupamentos bem separados nos espaços da PC's, de acordo com as dosagens de NP/AlCl₃Pc recebidas. Além do mais, os pontos referentes aos dados do grupo de células mortas tratadas com 10 µmol/L (pontos em laranja) encontram-se mais próximos do grupo de células controle que do grupo de células mortas tratadas com 5 µmol/L (pontos em vermelho). Essa proximidade no espaço da PC's indica maior semelhança entre os espectros SERS provenientes do grupo de células mortas tratadas com 10 µM com as do grupo controle, sugerindo uma maior similaridade entre as estruturas bioquímicas desses dois grupos celulares. Tal similaridade pode ser um indicativo de que as células tratadas com 10 µmol/L, realizam um número menor de mudanças bioquímica antes do início do processo de morte. Por outro lado, entre as células viáveis, é observada uma superposição de seus pontos no espaço da PC's (Figura 5.4.b e 5.4.e). Contudo, também é verificado que há uma tendência de maior distanciamento dos dados relativos ao grupo de células viável tratada com 10 µmol/L com relação aos dados do grupo controle, indicando que esse grupo celular apresenta maior variação bioquímica que ao grupo de células viáveis tratadas com dosagem de 5 µmol/L.

5.5 – Conclusões

Neste trabalho a técnica SERS foi utilizada com sucesso no estudo de células de câncer de mama tratadas por terapia fotodinâmica. Os dados SERS em conjunto com análise multivariacional evidenciaram que o tratamento por TFD, com diferentes concentrações do fotossensibilizador, leva a significantes mudanças bioquímicas relacionadas aos teores de proteínas, lipídios e DNA. Por meio dessas mudanças, foi possível utilizar o SERS como ferramenta para identificar o processo de morte celular e as principais mudanças bioquímicas das células viáveis. Nas condições empregadas nessa pesquisa, a necrose foi identificada como o principal mecanismo de morte celular após tratamento por TFD. Enquanto que nas células viáveis, observou-se um aumento expressivo da magnitude das intensidades dos picos SERS relacionados a proteínas (~80 %) com relação ao grupo controle. Sugerindo que os mecanismos de defesa celular, induzidos pelo estresse oxidativo proveniente da terapia fotodinâmica, levou a produção de proteínas as quais podem estar associadas com proliferação e controle do processo de divisão celular.

Capítulo 6

Conclusão e Perspectivas

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Esse trabalho teve como objetivo geral avaliar, por meio da técnica SERS, nanoemulsões a base de alumínio-cloro-ftalocianina (AlClPc), com diferentes concentrações de AlClPc, e estudar seus efeitos quando empregadas na terapia fotodinâmica (TFD) para o tratamento de câncer de mama *in vitro*. Para isso foram utilizados substratos SERS ativos contendo prata nanoestruturada na forma coloidal e filmes eletrodepositados.

O uso do coloide de prata no estudo da solubilização do fotossensibilizador AlClPc em meio aquoso e em nanoemulsões com diferentes concentrações do fotossensibilizador demonstrou, como se esperava, que as moléculas de AlClPc são mais solúveis em meio oleoso, o que possibilitou seu uso na terapia fotodinâmica. Os dados mostraram que apesar da molécula de AlClPc, na forma de pó, apresentar modos vibracionais altamente acoplados, é verificado que o espectro de Raman convencional desta amostra é dominado por vibrações do grupo do benzeno, macrociclo e pirrol. Contudo, o espectro SERS da AlClPc quando solubilizada em meio aquoso apresentou mudanças significativas quando comparado com o espectro de Raman convencional da AlClPc em pó. As principais mudanças são a quase completa ausência dos modos vibracionais provenientes da região central da molécula de AlClPc (macrociclo e pirrol) e deslocamentos dos modos vibracionais dos anéis de benzeno. Além do mais, não foi verificado a formação de ligações químicas entre a molécula de AlClPc e o substrato de prata.

No estudo das nanoemulsões, verificou-se que o aumento da concentração de AlClPc nas nanopartículas leva a redução das intensidades dos modos vibracionais provenientes da região central da molécula (macrociclo e do pirrol), o que indica agregação das moléculas de AlClPc devido à forte interação AlClPc-AlClPc. Esta interação é decorrente do sistema de anéis aromáticos planar, que conduz à formação de estruturas ordenadas com os anéis de benzeno da

molécula de AICIPc preferencialmente localizado na superfície externa do sistema agregados. Esse resultado foi comprovado por meio do decréscimo da razão I_c/I_{ex} com o aumento da concentração de AICIPc.

A potencialidade da técnica SERS no estudo *in vitro* de células de câncer de mama de camundongos (linhagem 4T1) tratadas por terapia fotodinâmica mediada pelo sistema NP/AICIPc, com diferentes concentrações de fotossensibilizador, foi demonstrada. Para esse estudo foram utilizados substratos SERS ativo a base de filmes nanoestruturados de prata eletrodepositados. A partir dos espectros SERS e da análise multivariacional, foi possível distinguir os diferentes grupos celulares obtidos após tratamento por TFD (grupos controle, viáveis e mortas) com diferentes concentrações de NP/AICIPc. Os resultados mostraram significantes mudanças bioquímicas relacionadas ao teor de proteínas, lipídios e DNA. Por meio do aumento (redução) das intensidades das bandas relacionados a proteínas (lipídios) foi possível identificar a necrose como o principal mecanismo de morte celular após tratamento por TFD, nas condições aqui empregadas. Em complemento, foi verificado que os espectros SERS dos grupos de células mortas quando comparadas com o grupo controle, apresentaram significativas mudanças com relação aos modos vibracionais do DNA. O aumento das intensidades dos modos vibracionais das ligações fosfodiéster (O-P-O), bem como a redução das bandas atribuídas às bases guanina/adenina sugeriram que a fragmentação do DNA se dá principalmente pela quebra de seus pares de base, a qual promove a exposição do esqueleto da cadeia dorsal do DNA ao substrato de prata.

Por outro lado, os dados SERS referentes aos grupos de células viáveis, quando comparadas com o grupo controle, mostraram que o grande aumento da magnitude das intensidades dos picos SERS relacionados a proteínas estão associados aos mecanismos de defesa celular, induzidos pelo estresse oxidativo proveniente da terapia fotodinâmica.

Por último, as análises de PCA's permitiram verificar que as mudanças bioquímicas observadas para o grupo de células mortas tratadas com a concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$ são menores que as observadas para o grupo de células mortas tratadas com 5 $\mu\text{mol/L}$. Esse fato pode ser explicado levando-se em conta que o processo de morte por necrose nas células tratadas com 10 $\mu\text{mol/L}$ de NP/AICIPc se inicia em tempo anterior às tratadas com 5 $\mu\text{mol/L}$.

Tem-se como perspectiva desse trabalho:

- Estudo SERS das células de câncer de mama (linha 4T1) variando o tempo de análise (de 0 a 72 horas) após tratamento por terapia fotodinâmica.
- Aperfeiçoamento da análise estatística por meio de análises complementares ao PCA, como, análise funcional discriminante (DFA), análise discriminante linear (LDA), ou redes neurais.
- Estudo SERS *in vivo* do tratamento de câncer de mama pela terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS¹

ABRAMCZYK, H.; BROZEK-PLUSKA, B.; SURMACKI, J.; JABLONSKA, J.; KORDEK, R. The label-free Raman imaging of human breast cancer. **Journal of Molecular Liquids**, v. 164, p. 123–131, 2011.

AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K. A.; FOSTER, T. H.; GIROTTI, A. W.; ALBRECHT, M. G.; CREIGHTON, J. A. Anomalous intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 99, p. 5215-5217, 1977.

ALESSIO, P.; RODRIGUEZ-MÉNDEZ, M. L.; SAEZC, J. A. S.; CONSTANTINO, C. J. L. Iron phthalocyanine in non-aqueous medium forming layer-by-layer films: growth mechanism, molecular architecture and applications. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 12, p. 3972–3983, 2010.

ALLAIN, L.R.; VO-DINH, T. Surface-enhanced Raman scattering detection of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 using a silver-coated microarray platform. **Analytica Chimica Acta.**, v. 469, p. 149 – 154, 2002.

AMIN, R. M.; HAUSER, C.; KINZLER, I.; RUECKB, A.; SCALFI-HAPP, C. Evaluation of photodynamic treatment using aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride as a photosensitizer: new approach. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v. 11, p. 1156–1163, 2012.

ARAGON, F. H.; COAQUIRA, J. A.; HIDALDO, P.; DA SILVA, S. W.; BRITO, S. L. M.; GOUVE, D.; MORAIS, P. C. Evidences of the evolution from solid solution to surface segregation in Ni-doped SnO₂ nanoparticles using Raman spectroscopy. **J. Raman Spectrosc.**, v. 42, p. 1081 – 1086, 2011.

ARAKI, K.; NAGATA, K. Functional in vitro analysis of the ERO1 protein and protein-disulfide isomerase pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 286, 32705–32712, 2011.

AUSTIN, L. A.; KANG, B.; EL-SAYED, M. A. A new nanotechnology technique for determining drug efficacy using targeted plasmonically enhanced single cell imaging spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 135, p. 4688–4691, 2013.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

BASOVA, T. V. ; Kiselev, V. G.; Plyashkevich, V. A.; Cheblakov, P. B.; Latteyer, F.; Peisert, H.; Chasse, T. Orientation and morphology of chloroaluminum phthalocyanine films grown by vapor deposition: Electrical field-induced molecular alignment. **Chem. Phys.**, v. 380, p. 40–47, 2011.

BINOY, J.; ABRAHAM, J. P.; JOE, I. H.; JAYAKUMAR, V. S.; PETIT, G. R.; NIELSEN, O. NIRFT Raman and FTIR spectral studies and ab initio calculations of the anticancer drug combretastatin A4. **J. Raman Spectroscopy**, v. 35, p. 939-946, 2004.

BRAUCHE, E; THUDE, S.; BRUCKER, S. Y.; SCHENKE-LAYLAND, K. Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. **Scientific Reports**, 4, 4698, 1-9, 2014.

BROZEK-PLUSKA, B.; MUSIAL, J.; KORDEK, R.; BAILOD, E.; DIEINGE, T.; ABRAMCZYK, H. Raman spectroscopy and imaging: applications in human breast cancer diagnosis. **Analyst**, v. 137, p. 3773-3780, 2012.

BROZEK-PLUSKA, B.; PLACEK, I.; KURCZEWSKI, K.; MORAWIEC, Z.; TAZABIR, M.; ABRAMCZYK, H. Breast cancer diagnostics by Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Liquids**, v. 141, p. 145–148, 2008.

CHAN, J. W.; TAYLOR, D. S.; LANE, S. M.; ZWERDLIN, T.; TUSCANO, J.; HUSER, T. Nondestructive Identification of Individual Leukemia Cells by Laser Trapping Raman Spectroscopy. **Anal. Chem.**, v. 80, 2180-2187, 2008.

CHAN, W. S.; MARSHALL, J. F; SVENSEN, R.; BEDWELL, J.; HART, I. R. Effect of sulfonation on the cell and tissue distribution of the photosensitizer aluminum phthalocyanine. **Cancer research**, v. 50, n. 15, p. 4533-4538, 1990.

CHEN, H. J.; WANG, Y. L.; QU, J. Y.; DONG, S. J.. Self-assembled silver nanoparticle monolayer on glassy carbon: an approach to SERS substrate. **J. Raman Spectrosc.**, v. 38, p. 1444 – 1448, 2007.

CHEN, K.; QIN, Y.; ZHENG, F.; SUN, M.; SHI, D. R. Diagnosis of colorectal cancer using Raman spectroscopy of laser-trapped single living epithelial cells. **Opt. Lett.**, v. 31, n. 13, p. 2015-2017, 2006.

CHEN, Y.; CHEN, G.; ZHENG, X.; HE C.; FENG, S.; CHEN, Y.; LIN, X.; CHEN, R.; ZENG, H. Discrimination of gastric cancer from normal by serum RNA based on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) and multivariate analysis. **Med. Phys.**, v. 39, n. 9, p. 5664 – 5668, 2012.

CHOWDARY, M. V.; KUMAR, K. K.; KURIEN, J.; MATHEW, S.; KRISHNA, C. M. Discrimination of normal, benign, and malignant breast tissues by Raman spectroscopy. **Biopolymers**, v. 83, p. 556-569, 2006.

DA PAZ, M. C.; SANTOS, M. F.M. A.; SANTOS, C. M. B.; DA SILVA, S. W.; SOUZA, L. B.; LIMA, E. C. D.; SILVA, R. C.; MORAIS, P. C.; AZEVEDO, R. .B.; LACAVALA, Z. G. M. Anti-CEA loaded maghemite nanoparticles as a theragnostic device for colorectal cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5271-5282, 2012.

DA SILVA, S. W.; NAKAGOMI, F; SILVA, M. S.; FRANCO, A. Jr.; GARG, V. K.; OLIVEIRA, A. C.; MORAIS, P. C. Effect of the Zn content in the structural and magnetic properties of $Zn_xMg_{1-x}Fe_2O_4$ mixed ferrites monitored by Raman and Mössbauer spectroscopies. **J. Appl Phys.**, v. 107, p. 09B503, 2010.

DARWENT, J. R.; DOUGLAS, P.; HARRIMAN, A.; PORTER, G.; RICHOUX, M.-C. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 44, n. 1, p. 83-126, 1982.

DE PAULA, A. A. N. **Estudo de estrutura eletrônica e análise multivariada de candidatos a inibidores da AChE**. 2009. 104 folhas. Tese de doutorado. Instituto de Física, Universidade de Brasília, 2009.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic Therapy: Review. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, No. 12, p. 889 – 905, June 17, 1998.

EL-SAID, W. A.; KIM, T. H.; KIM H.; CHOI, J. W. Detection of effect of chemotherapeutic agents to cancer cells on gold nanoflower patterned substrate using surface-enhanced Raman scattering and cyclic voltammetry. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 1486 – 1492, 2010.

FARIA, D. L.; TEPERINI, M. L. A.; SALA, O. Vinte anos de efeito SERS. **Química Nova**, v. 22, n.4, p. 1 – 20, 1999.

FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physical Letters**, v. 26, p. 163-166, 1974.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology*, article ID 214074, p.: 1-23, 2010.

GAO, X.; DAVIES, J. P.; WEAVER, M. J. Test of surface selection rules for surface-enhanced Raman scattering: the orientation of adsorbed benzene and monosubstituted benzenes on gold. **J. Phys. Chem.**, v. 94, p. 6858-6864, 1990.

GOLLNICK, S. O.; HAHN, S. M.; HAMBLIN, M. R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; GONZÁLEZ-SOLÍS, J. L.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, J. C.; SALGADO-ROMÁN, J. M.; PALOMARES-ANDA, P. Monitoring of chemotherapy leukemia treatment using Raman spectroscopy and principal component analysis. **Lasers Med. Sci.**, v. 29, p. 1241–1249, 2014.

HAKA, A. S.; SHAFER-PELTIER, K. E.; FITZMAURICE, M.; CROWE, J.; DASAR, R. R.; FELD, M. S. Diagnosing breast cancer by using Raman spectroscopy. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 102, p. 12371-12376, 2005.

HAKA, A. S.; VOLYNSKAYA, Z.; GARDECKI, J. A.; NAZEMI, J.; LYONS, J; HICKS, D.; FITZAMAURICE, M.; DASARI, R. R.; CROWE, J. P.; FELD, M. S. In vivo margin assessment during partial mastectomy breast surgery using Raman spectroscopy. **Cancer Res.**, v. 66, p. 3317-3322, 2006.

HAYASHI, S.; SAMEJIMA, M. Surface-enhanced Raman scattering from copper phthalocyanine thin films. **Surface Science**, v. 137, p. 442-462, 1984.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, **Cancer Incidence and Mortality Worldwide**: CancerBase. Lyon, France, n. 11 [Internet], 2013. Disponivel em: <http://globocan.iarc.fr>, acessado em 21/01/2015.

JEANMAIRE, D. L.; DUYNE, R. P. V. Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 84, p. 1-20, 1977.

KAMEMOTO, L. E.; MISRA, A. K.; SHARMA, S. K.; GOODMAN, M. T.; LUK, H.; DYKES, A. C.; ACOSTA, T. Near-infrared micro-Raman spectroscopy for in vitro detection of cervical cancer. **Appl Spectrosc.**, v. 64, n. 3, p. 255-261, 2010.

KANG, B.; AUSTIN, L. A.; EL-SAYED, M. A. Observing Real-Time Molecular Event Dynamics of Apoptosis in Living Cancer Cells using Nuclear-Targeted Plasmonically Enhanced Raman Nanoprobes. **ACSNano**, v. 8, n. 5, p. 4883–4892, 2014.

KANG, B.; AUSTIN, L. A.; EL-SAYED, M. A. Real-time molecular imaging throughout the entire cell cycle by targeted plasmonic-enhanced Rayleigh/Raman spectroscopy. **Nano Lett.**, v. 12, p. 5369–5375, 2012.

KAST, R. E.; SERHATKULU, G. K.; CAO, A.; PANDYA, A. K.; DAI, H.; THAKUR, J. S.; NAIK, V. M.; NAIK, R.; KLEIN, M.; AUNER, G. W.; RABAH, R. Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model. **Biopolymers**, v. 89, n. 3., p. 235-241, 2007.

KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, J.; WILSON, B. C.; GOLAB, J. PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE. **CA CANCER J CLIN**, v.61, p. 250–281, 2011.

KOTZ, R.; YEAGER, E. Raman Spectroscopy of cobalt phthalocyanine on silver electrode. **J. Electroanal. Chem.**, v. 113, p. 113 – 125, 1980.

KUNAPAREDDY, N.; FREYER, J.; MOURANT, J. Raman spectroscopic characterization of necrotic cell death. **Journal of Biomedical Optics**, 13, 5, 054002 1-9, 2008.

KUTOMI, G.; TAMURA, Y.; TANAKA, T.; KAJIWARA, T.; KUKITA, K.; OHMURA, T.; SHIMA, H., TAKAMARU, T.; SATOMI, F.; SUZUKI, Y. Human endoplasmic reticulum oxidoreductin 1- α is a novel predictor for poor prognosis of breast cancer. **Cancer Sci.**, v. 104, 1091–1096, 2013.

LATTEYER, F.; PEISERT, H.; AYGUL, U.; BISWAS, I.; PETRAKI, F.; BASOVA, T.; VOLLMER, A.; CHASSE, T. Laterally resolved orientation and film thickness of polar metal chlorine phthalocyanines on Au and ITO. **J. Phys. Chem. C**, v. 115, p. 11657–11665, 2011.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **Journal Physics Chemical**, v. 86, p. 3391-3395, 1982.

LEE, S.; CHON, H.; LEE, J.; KO, J.; CHUNG, B. H.; LIM, D. W.; CHOO, J. Rapid and sensitive phenotypic marker detection on breast cancer cells using surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 51, p. 238–243, 2014.

LINSS, V.; STENZEL, O.; ZAHN, D. R. T. Correlation between linear optical constants and Raman enhancement in phthalocyanine thin solid films with incorporated silver clusters. **J. Raman Spectrosc.**, v. 30, p. 531–536, 1999.

LONGO, J. P. F. **Avaliação da aplicação da Terapia Fotodinâmica mediada pela Alumínio-Cloro-Ftalocianina em formulação lipossomal sobre o Câncer Bucal em modelos experimentais in vivo e in vitro.** 2008. 92 folhas. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2008.

LONGO, J. P. F.; MUEHLMANN, L. A.; VELLOSO, N. V.; SIMIONI, A. R.; LOZZIL, S. P.; CAVALCANTI, C. E. O; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Effects of photodynamic therapy mediated by liposomal aluminum-phthalocyanine chloride on chemically induced tongue tumors. **Chemotherapy**, v. 1, n. 2, p. 1-4, 2012.

LU, H. L.; SYU, W. J; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K; LAI, P. S. Dendrimer phthalocyanine-encapsulated polymeric micelle-mediated photochemical internalization extends the efficacy of photodynamic therapy and overcomes drug-resistance in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 155, n. 3, p. 458-464, 2011.

MAITI, K. K.; DINISHA, U. S.; SAMANTA, A.; VENDRELLA, M.; SOHA, K. S.; PARKA, S. J.; OLIVOA, M.; CHANG, Y. T. Multiplex targeted in vivo cancer detection using sensitive near-infrared SERS nanotags. **Nano Today**, v. 7, p. 85-93, 2012.

MATOUSEK, P.; STONE, N. Prospects for the diagnosis of breast cancer by noninvasive probing of calcifications using transmission Raman spectroscopy. **J. Biomed. Opt.**, v. 12, p. 024008, 2007.

MIJAN, M. C.; LONGO, J. P. F.; MELO, L. N. D.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Vascular Shutdown and Pro-inflammatory Cytokine Expression in Breast Cancer Tumors after Photodynamic Therapy Mediated by Nano-sized Liposomes Containing Aluminium-Chloride-Phthalocyanine. **J Nanomed Nanotechnol**, v. 5, n. 218, p. 1-9, 2014.

MO, J.; ZHENG, W.; LOW, J. J.; NIG, J.; ILANCHERAN, A.; HUANG, Z. High wavenumber Raman spectroscopy for in vivo detection of cervical dysplasia. **Anal Chem.**, v. 81, p. 8908-8915, 2009.

MOHS, A. M.; MANCINI, M. C.; SINGHAL, S.; PROVENZALE, J. M.; LEYLAND-JONES, B.; WANG, M. D.; NIE, S. Hand-held Spectroscopic Device for In Vivo and Intraoperative Tumor Detection: Contrast, Enhancement, Detection Sensitivity, and Tissue Penetration. **Anal. Chem.**, v. 82, p. 9058–9065, 2010.

MROZ, P.; YAROSLAVSKY, A.; KHARKWAL, G. B.; HAMBLIN, M. R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. **Cancers**, v. 3, p. 2516-2539, 2011.

MUEHLMANN, L. A.; JOANITTI, G. A.; SILVA, J. R.; LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 8, p. 729-737, 2011.

MUEHLMANN, L. A.; MA, B. C.; LONGO, J. P. F.; MENEZES, M. F.; SANTOS, A.; AZEVEDO, R. B. Aluminum–phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **International Journal of Nanomedicine**, 9, 1199-1213, 2014.

MUEHLMANN, L. A.; RODRIGUES, M. C.; LONGO, J. P. F.; GARCIA, M. P.; PY-DANIEL, K. R.; VELOSO, A. B.; SOUZA, P. E. N.; DA SILVA, S. W.; AZEVEDO, R. B. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, p. 36, 13 de maio de 2015. doi:10.1186/s12951-015-0095-3.

NIE, S.; EMORY, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. **Science**, v. 275, p. 1102 - 1106, 1997.

NOGUEIRA, G. V.; SILVEIRA, L. Jr.; MARTIN, A. A.; ZÂNGARO, R. A.; PACHECO, M. T. T.; CHAVANTES, M. C.; PASQUALUCCI, C. A. Raman spectroscopy study of atherosclerosis in human carotid artery. **Journal of Biomedical Optics**. V. 10, n. 3, p. 031117, maio/junho 2005.

NOTINGHER, I.; GREEN, C.; DYER, C; PERKINS, E.; HOPKINS, N.; LINDSAY, C.; HENCH, L. L. Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy, *J. R. Soc. Interface*, 1, 79–90, 2004.

O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053-1074, 2009.

OLIVEIRA, L. T.; G. M. Garcia, G. M.; Kano, E. K.; Tedesco, A. C.; Moesqueira, V. C. HPLC-FLD methods to quantify chloroaluminum phthalocyanine in nanoparticles, plasma and tissue: application in pharmacokinetic and biodistribution studies. **J. Pharm. Biomed. Anal**, v. 56, n. 1, p. 70– 77, 2011.

OSHIMA, Y.; SHINZAWA, H.; TAKENAKA, T.; FURIHATA, C.; SATO, H. Discrimination analysis of human lung cancer cells associated with histological type and malignancy using Raman spectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 15, n. 1, p. 017009-1-8, 2010.

PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A; SIMIONI, A. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, n. 14, p. e211-e214, 2008.

PULLY, V. V.; LENFERINK, A. T. M.; OTTO, C. Time-lapse Raman imaging of single live lymphocytes. **Journal of Raman Spectroscopy**, 42, 167–173, 2011.

PUPPLES, G. J.; OLMINKHOF, J. H. F.; SEGERS-NOLTEN, G. M. J.; OTTO, C.; DE MUL, F. F. M.; GREVE, J. Laser Irradiation and Raman Spectroscopy of Single Living Cells Chromosomes: Sample Degradation Occurs with 514.5 nm but not with 660 nm Laser Light. **Experimental Cell Research**, 195, 361–367, 1991.

QIAN, X.; PENG, X.; ANSARIL, D. O.; YIN-GOEN, Q.; CHEN, G. Z.; SHIN, D. M.; YANG, L.; YOUNG, A. N.; WANG, M.; NIEL, S. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. **Nature biotechnology**, v. 26, p. 83 – 90, 2008.
REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Critical Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, p. 47 – 60, 2003.

RODRIGUES, G. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; BRAGA, G. U. In vitro photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans* melanized cells with chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photochemistry and photobiology**, v. 88, n. 2; p. 440-447, 2012.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho**. 2^a ed. São Paulo: Unesp, 2008.

SANTOS, C. M. B. **Estudo pela técnica SERS do arranjo de moléculas bioativas adsorvidas em nanopartículas de óxido de ferro e de suas aplicações em sistemas biológicos**. 2012. 166 f. Tese de Doutorado – Instituto de Física, Universidade de Brasília, 2012.

SANTOS, C. M. B.; DA SILVA, S. W.; GUILHERME, L. R.; MORAIS, P. C. SERRS study of molecular arrangement of amphotericin B adsorbed onto iron oxide nanoparticles precoated with a bilayer of lauric acid. **J. Phys. Chem. C.**, v. 115, p. 20442–20448, 2011.

SANTOS, C. M. B.; DA SILVA, S.W.; SALDANHA, C. A.; SANTOS, M. F.; GARCIA, M. P.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C. SERS as a valuable tool for detection and treatment follow-up of fungal infection in mice lungs: use of amphotericin B and its nanoencapsulation onto magnetic nanoparticles. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 44, n. 5, p. 695-702, 2013.

SEQUARIS, J. M.; KOGLIN, E.; MALFOY, B. Inner and outer complexes of pt-coordination compounds with DNA probed by SERS spectroscopy. **FEBS Letters.**, v. 173, n. 1, p. 95 – 98, 1984.

SI, M. Z.; Kang, Y. P.; Zhang, Z. G.. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra of Methyl Orange in Ag colloids prepared by electrolysis method. **Appl. Surf. Sci.**, v. 255, n. 11, p. 6007 – 6010, 2009.

SIMIC-GLAVASKI, B.; ZECEVIC, S.; YEAGERS, E. Study of phthalocyanines in aqueous solutions and adsorbed on electrode surfaces. **J. Electroanal. Chem.**, v. 150, p. 469-479, 1983.
SMITH, E.; DENT, G. **Modern Raman spectroscopy: A practical approach.** England: Wiley, 2005.

SU, L.; SUN, Y. F.; CHEN, Y.; CHEN, P.; SHEN, A. G.; WANG, X. H.; JIA, J.; ZHAO, Y. F.; ZHOU, X. D.; HU, J. M.; Raman Spectral Properties of Squamous Cell Carcinoma of Oral Tissues and Cells. **Laser Physics.**, v. 22, n. 1, p. 311–316, 2012.

TANAKA, T.; KAJIWARA, T.; TORIGOE, T.; OKAMOTO, Y.; SATO, N.; TAMURA, Y. Oxidative Protein Folding Myeloid-Derived Suppressor Cells via Drives the Production of Tumor-Promoting Cancer-Associated Oxidoreductase ERO1- α . **The Journal of Immunology**, v. 194, 2004-2010, 2015.

THAKUR, J. S.; DAI, H.; SERHATKULU, G. K.; NAIK, R.; NAIK, V. M.; CAO, A.; PANDYA, A.; AUNER, G. W.; RABAH, R.; KLEIN, M. D.; FREEMAN, C. Raman spectral signatures of mouse mammary tissue and associated lymph nodes: normal, tumor and mastitis. **J. Raman Spectrosc.**, v. 38, p. 127–134, 2007.

THE, S. K.; ZHENG, W.; Ho, K. Y.; THE, M.; YEOH, K. G.; HUANG, Z. Diagnostic potential of near-infrared Raman spectroscopy in the stomach: differentiating dysplasia from normal tissue. **British Journal of Cancer**, v. 98, p. 457 – 465, 2008.

TIE, Y.; LIU, B.; FU, H.; ZHENG, X. Circulating miRNA and cancer diagnosis. **Sci. China Ser. C: Life Sci.**, v. 2, p. 1117 – 1122, 2009.

TU, Q.; CHANG, C. Diagnostic applications of Raman spectroscopy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 8, p. 545 – 558, 2012.

UDAL'TSOV, A. V.; BOLSSHAKOVA, A. V.; VOS, J. G. Highly ordered surface structure of large-scale porphyrin aggregates assembled from protonated TPP and water. **Journal of Molecular Structure**, v. 1065, p. 170-178, 2014.

VERRIER, S.; NOTINGHER, I.; POLAK, J. M.; HENCH, L. L. In Situ Monitoring of Cell Death Using Raman Microspectroscopy. **Biopolymers**, v. 74, p.157-162, 2004.

WANG, C.; TAO, H.; CHENG, L.; LIU, Z. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, p. 6145 – 6154, 2011.

WIDJAJA, E.; ZHENG, W.; HUANG, Z. Classification of colonic tissues using near-infrared Raman spectroscopy and support vector machines. **Int. J. Oncol.**, v. 32; p. 653-662, 2008.

ZHOU, J.; GUO, J.; CAI, W.; LUI, B; WANG, Z.; SUN, Z. Surface-enhanced Raman spectroscopy investigation on human breast cancer cells. **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 37, p. 1-5, 2013.