

# UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

**Lobo, A. O.<sup>1</sup>, Martin, A. A.<sup>1</sup> e Martinho, H.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica - LEVB, Av. Shishima Hifumi, 2911. CEP: 12244-000, São José dos Campos – SP, Tel: 3947-1165. anderson@univap.br

**Resumo-** Neste projeto materiais biológicos (tecido hepático e dentes) foram estudados pela técnica de Espectroscopia Raman. Nosso principal objetivo foi identificar os modos vibracionais de cada composto utilizando como excitação lasers operando na região espectral do Visível (514 nm), Infravermelho Próximo (785 nm) e Infravermelho (1064 nm). Para aplicações biológicas, a espectroscopia Raman, pode ser utilizada como uma técnica de biópsia óptica e apresenta várias aplicabilidades. Por esta técnica, as informações moleculares podem ser obtidas *in situ*. Visto que, a espectroscopia Raman investiga os constituintes moleculares e estruturais das amostras, esta técnica, permite detectar modificações bioquímicas na morfologia e arquitetura celular que ocorrem na presença de patologias. Como conclusão do trabalho, encontramos diferenças vibracionais com a mudança de energia de excitação, podendo desta forma definir os limites de cada técnica e as diferenças espectrais que podem apresentar com a mudança da energia de excitação.

**Palavras-chave:** Espectroscopia Raman, biópsia óptica e materiais biológicos.

**Área do Conhecimento:** III - Engenharias

## Introdução

A espectroscopia Raman informa estuda os modos rotacionais e vibracionais de uma molécula. As vibrações e rotações em moléculas ou redes sólidas na espectroscopia Raman são excitadas pelo espalhamento de fótons, sendo que este espalhamento é inelástico devido à perda de energia do fóton com a excitação de modos vibracionais na amostra [1]. Podemos concluir que as frequências Raman estão relacionadas com a mudança de energia das excitações elementares de cada amostra. Mais especificamente, as frequências Raman correspondem às transições entre estados quânticos de excitações elementares da matéria em estudo [2].

Na década de 80, a introdução do uso do Raman no infravermelho próximo, permitiu que a mesma fosse utilizada em grande escala. Ao mesmo tempo, o uso do método da transformada de Fourier, o acoplamento do espectrômetro aos sistemas de aquisição de dados e o processamento em computadores, permitiu as investigações rotineiras de sistemas biológicos pela espectroscopia Raman. A espectroscopia, como técnica de biópsia óptica, proporciona

a avaliação da composição bioquímica e morfológica do tecido em tempo real, tornando-se desta forma uma nova ferramenta para rápidos diagnósticos. A possível aplicabilidade da espectroscopia Raman na Medicina é ampla como, exemplos podem citar investigações patológicas no diagnóstico de câncer de pele, (gastrointestinal), mama, pulmão, próstata, laringe, identificações de placas de aterosclerose, estudo de células, ácidos nucléicos, vírus e bactérias [3-7]. Os espectros Raman para análises biológicas exibem seus picos característicos na região entre 700 e 1800  $\text{cm}^{-1}$ , onde estão representadas as vibrações moleculares dos principais constituintes biomoleculares.

Desta forma o objetivo deste trabalho é caracterizar materiais e biológicos utilizando a espectroscopia Raman dispersiva e FT-Raman, demonstrando as diferenças espectrais presentes em cada técnica.

## Materiais e Métodos

### *Tecido hepático normal*

Utilizou-se 2 ratos machos da raça Wistar com peso aproximado de 250 g e 12 semanas de vida. Aplicou-se, via

intramuscular, 0,4 ml de anestésico, Zoletil 50 (VIRBAC), no membro posterior dos animais. Após esta etapa, os animais foram anestesiados e sacrificados com injeção intracardíaca Hipnol (0,4ml). Para a preparação das amostras, foram retirados aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> do tecido hepático.

### **Dentina Humana**

Neste estudo foram utilizados doze dentes terceiros molares humanos erupcionados e hígidos. Todos os dentes foram extraídos de pacientes que necessitavam de extrações como parte de seu tratamento na clínica Odontológica da Universidade do Vale do Paraíba. O protocolo para extração dos dentes e o termo de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em pesquisa da UniVap (Protocolo nºL102/2003/CEP). Os dentes foram limpos e armazenados em solução aquosa de Timol a 0,1% até o momento do uso. Para preparar as amostras de dentina, os dentes foram lavados em água corrente por 24 horas para remover os traços de Timol. Em seguida, os dentes foram seccionados na altura do terço oclusal com o auxílio de um disco diamantado montado em uma máquina de corte (Isomet 1000 - BUEHLER) com uma velocidade de 250rpm e um peso de 100g. A superfície exposta da dentina foi então polida por 1 minuto com uma lixa d'água (nº 600 - 3M) em uma politriz (Knuth Rotor – Struers) com refrigeração constante para produzir uma camada de *smear layer* padrão (Arrais, 2002). Os dentes foram lavados em água destilada em um aparelho de ultra-som (Cole - Parmer 8891) por 5 minutos para remover os resíduos. Os dentes foram novamente seccionados, produzindo discos de dentina com uma espessura de 4 mm.

### **Instrumentação Raman**

O sistema Raman no infravermelho próximo (785nm) utiliza um laser de Argônio de 5W (Spectra Physics, Modelo 2017 514,5 nm) para bombear um laser de estado sólido de Ti: Safira (Spectra Physics, Modelo 3900S), sintonizado no comprimento de onda de 785 nm. A potência de saída do laser de Ti: Safira foi ajustada a 55mW, registrando 25mW de potência na amostra. Para a

obtenção dos espectros Raman das amostras, foram feitas 60 acumulações em 5 segundos, totalizando 300 segundos de exposição da amostra por espectro adquirido.

O espectrômetro FT- Raman (BRUKER RFS/100), utiliza-se um laser de Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm, e um interferograma para calcular a transformada de Fourier. Com a utilização de comprimentos de ondas maiores elimina-se a fluorescência presente em amostras biológicas. Para a coleta dos espectros, as amostras foram posicionadas no porta amostra e o laser foi ajustado a uma potência de 100 mw de saída, registrando 77 mw na amostra. Utilizou-se 250 scans, totalizando aproximadamente 5 minutos. Foram coletados 2 espectros por amostra, em diferentes pontos.

### **Resultados**

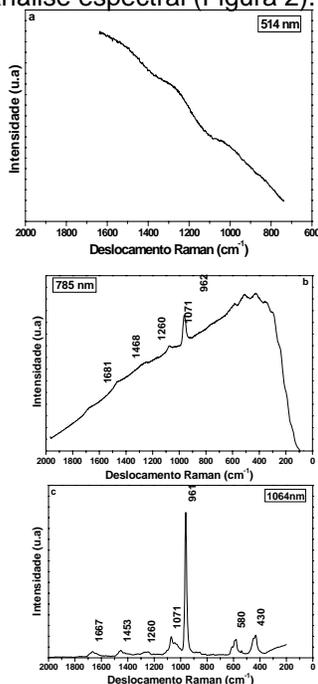
A Figura 1a mostra o espectro de dentina obtido pelo sistema Raman dispersivo no visível (514,5 nm). Observa-se neste espectro, a alta intensidade da radiação de fluorescência, referente aos componentes biomoleculares da dentina, sobrepondo-se aos modos vibracionais Raman, não sendo, portanto indicado para este estudo.

Com o sistema Raman dispersivo no infravermelho próximo 785 nm (figura 1c), foi possível identificar as bandas referentes aos componentes inorgânicos e orgânicos como, por exemplo, o íon fosfato  $\nu_1$  da Hidroxiapatita ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) em  $962\text{cm}^{-1}$ , o íon carbonato  $\nu_1$  (CO) em  $1071\text{cm}^{-1}$  e orgânicos como, por exemplo, bandas referentes ao colágeno tipo III, II e I em 1257, 1463 e  $1681\text{cm}^{-1}$  respectivamente [8-10]. Observa-se novamente a alta intensidade de radiação de fluorescência, porém, com menor intensidade de que a obtida pelo sistema no visível (514,5 nm).

Os modos vibracionais nos espectros coletados pelo sistema FT-Raman 1064 nm apresentaram-se com maior definição (Figura 2c), sendo que a radiação de fluorescência foi totalmente eliminada.

Para a análise dos resultados foi realizada a média aritmética dos três pontos coletados por amostra. Para a calibração dos espectros coletados pelo sistema no infravermelho próximo (785 nm), fez-se o ajuste polinomial de ordem três do tipo linear

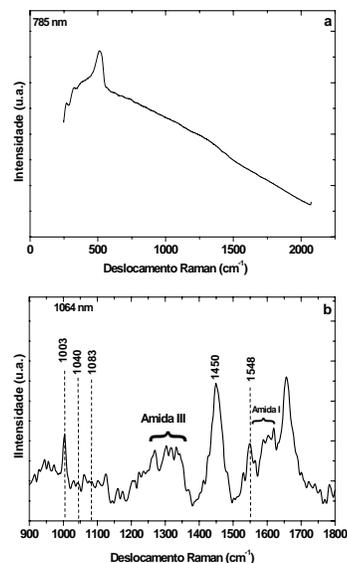
no programa Excel® 2000. A remoção da fluorescência (*background*) e correção de linha de base dos espectros (*baseline correction*), foram realizados através de subtração do tipo parabólico, utilizando o programa MicroicalOrigin® 7.0, melhorando desta forma a relação sinal-ruído e, portanto a análise espectral (Figura 2).



**Figura 1:** Espectros Raman de dentina coletados pelos sistemas Raman nos três comprimentos de onda. (a) 514 nm, (b) 785 nm, (c) 1064 nm

### Tecido Hepático

Para estudar os espectros coletados no sistema Raman dispersivo (785 nm), foram necessários fazer a retirada da banda de fluorescência, presente em tecidos biológicos (Figura 2a). Para o tratamento utilizou-se linha de correção (*baseline correction*) e filtro de grau 3 (*smoothing filter*), utilizando o programa Origin 5.0 (Figura 3). Para a análise dos espectros coletados pelo sistema FT-Raman (Figura 2b) não foram necessários tratamentos. Para as análises espectrais foram coletados dois espectros cirróticos e quatro espectros normais. Para a demonstração dos resultados foram calculadas as médias dos espectros [11].

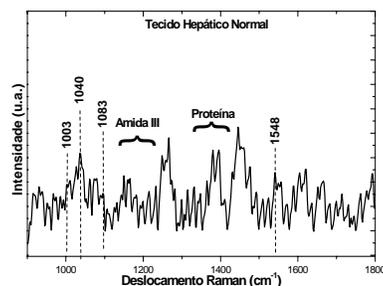


**Figura 2:** Espectro original cirrótico obtido pelo sistema Raman dispersivo (785 nm).

A tabela 1 mostra os principais deslocamentos Raman referentes a compostos moleculares que sofreram alterações na região de interesse biológico.

**Tabela 1:** Compostos moleculares com alteração em tecidos hepáticos normais e cirróticos.

Composto Molecular	Posição (cm <sup>-1</sup> )
Fenilalanina	1003
Resíduos de Fenilalanina	1040
DNA	1083
Lipídeos e Proteína	1122
Amida III	1200-1350
Proteínas e lipídeos	1452
Triptofano	1548
Amida I	1600



**Figura 3:** Espectros Raman tratados com linhas de correção e filtros polinomiais coletados pelo sistema Raman dispersivo (785 nm).

## Discussões

Foram possíveis identificar com o sistema FT-Raman (figura 1c) bandas na região de 430 e 580  $\text{cm}^{-1}$  referentes ao íon fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ )  $\nu_2$  e  $\nu_4$  da hidroxiapatita respectivamente [8-10].

As diferenças espectrais entre os sistemas Raman dispersivo (785 nm) e FT-Raman (1064 nm) estão relacionadas basicamente à intensidade da radiação de fluorescência (*background*). Como descrito anteriormente, este fenômeno consiste em um dos maiores problemas quando se estudam materiais biológicos utilizando a espectroscopia Raman dispersiva no infravermelho próximo.

A subtração da radiação de fluorescência, observada no espectro obtido pelo sistema Raman dispersivo (785 nm), é realizada através de tratamentos espectrais baseados na construção de linhas de base, ajustadas com o auxílio do software Microcal Origin® 7.0. Nesta etapa de tratamentos de dados, pode-se evidenciar muitos erros relacionados ao estudo analítico ou quantitativo dos componentes da dentina, principalmente para se estabelecer à relação entre as intensidades dos modos vibracionais Raman para o cálculo da área de cada banda do espectro, já que são necessários ajustar linhas de correções espectrais.

Estes erros estão relacionados ao ajuste das linhas de base aos espectros, não sendo possível estabelecer padrões, pelo fato das taxas de variações dos pontos de deslocamentos Raman serem diferentes entre cada espectro coletado, ocasionando distorções nos posicionamentos dos modos vibracionais, ou mesmo evidenciando deslocamentos de frequências não relacionados aos componentes biomoleculares presentes nas amostras.

Quanto as diferenças espectrais referentes aos sistemas Raman, podemos observar quando as amostras são excitadas no sistema Raman dispersivo (785 nm) apresentam-se espectros mais ruidosos, devido a maior absorção do tecido, se comparado ao sistema FT-Raman (1064 nm). Este efeito está relacionado ao comprimento de onda de excitação, inversamente proporcional a energia que excita as moléculas. Para amostras biológicas prefere-se utilizar comprimentos de onda maiores, pois desta forma diminuem as bandas de

fluorescência, muita presentes em tecidos biológicos.

## Conclusão

A interação laser-tecido biológico está relacionada ao comprimento de onda de excitação, onde se evidencia a utilização de comprimentos de onda na região do infravermelho (1064nm) para não excitar a radiação de fluorescência, associada aos níveis de energia das camadas eletrônicas das moléculas. O sistema de espectroscopia FT-Raman apresentou melhores resultados no estudo dos componentes biomoleculares da dentina e do tecido hepático, identificando com maior resolução a presença de bandas relacionadas aos biocomponentes dos tecidos biológicos. Com a técnica de espectroscopia FT-Raman, não é necessário a manipulação e tratamento dos espectros, como por exemplo a remoção do background, obtendo dados importantes para pesquisas na área de engenharia Biomédica.

No geral, a espectroscopia FT-Raman com laser de excitação de longo comprimento de onda, Nd:YAG 1064 nm, possui menor energia, e conseqüentemente os estados eletrônicos não são excitados. Esta característica do laser de excitação é de grande importância para evitar a interferência de fluorescência em amostras biológicas, uma das dificuldades do estudo por esta técnica.

## Referências Bibliográficas

- [1] SALA, O., "Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho". Páginas 14-30. São Paulo, 1997.
- [2] SCHRADER, B. "Practical Fourier Transform Infrared Spectroscopy" (J. R. Ferraro and K. Krishnan, eds.) Academic Press. 1990.
- [3] SCHUT, T. C. B.; WOLTHUIS, R.; CASPERS, G. J. **Real-time tissue characterization on the basis of in vivo Raman spectra**. J Raman Spectrosc, v.33, n.7, p.580-585, 2002.
- [4] MAHADEVAN-JANSEN, A.; RICHARDS-KORTUM, R. **Raman Spectroscopy for cancer detection: A review**. Proceedings - 19<sup>th</sup> International Conference, p.2722-2828, 1997.

- [5] SILVEIRA Jr. L. **Correlação entre a técnica de espectroscopia raman e a análise histopatológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas.** 2001. 109 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Fisiopatologia Experimental - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).
- [6] STONE, N. **Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers.** J Raman Spectrosc, v.33, 564-573, 2002.
- [7] NUNES, L.D.; MARTIN, A.A.; SILVEIRA, L.; ZAMPIERI, M.FT-**Raman spectroscopy study for skin cancer diagnosis** SPECTROSCOPY INT. J. 17 (2-3): 597-602 2003.
- [8] Majaron, R.; Sustercic, D.; Lukac, M.; Skaleric, U.; Funduk, N. **Heat diffusion and debris screening in Er:YAG laser ablation of hard biological tissues.** Applied Physics. 1998, 66, 479.
- [9] Tsuda, H.; Ruben, J.; Arends, J. **Raman spectra of human dentin mineral.** Eur. J. Oral Sci., 1996, 104, 123-131.
- [10] Tsuda, H.; Jongebloed, W. L.; Stokroos, I.; Arends, J. **Combined Raman and SEM study on CaF<sub>2</sub> formed on/in enamel by APF treatments.** Caries Research, 1993, 27, 445-454.
- [11] HAWI S.H.ET AL. **Characterization of normal and malignant human hepatocytes by Raman microspectroscopy.** Cancer Letters 110 (1996) 35-.