



FRANCISCO MARIA DE SOUSA NUNES MARQUES PINTO
Licenciado em Ciências de Engenharia Física

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE UM DISPOSITIVO DE JATO DE PLASMA COM MOLÉCULAS DE DNA

MESTRADO EM CIÊNCIAS DE ENGENHARIA FÍSICA
Universidade NOVA de Lisboa
Março, 2023



ESTUDO DA INTERAÇÃO DE UM DISPOSITIVO DE JATO DE PLASMA COM MOLÉCULAS DE DNA

FRANCISCO MARIA DE SOUSA NUNES MARQUES PINTO

Licenciado em Ciências de Engenharia Física

Orientadores: Prof. Dr. Susana Isabel dos Santos Silva Sérgio Venceslau

Professor Auxiliar, NOVA School of Science and Technology University, Lisbon

Prof. Dr. Maria de Fátima Guerreiro da Silva Campos Raposo

Professor Associada com Agregação, NOVA School of Science and Technology University, Lisbon

Júri

Presidente: Prof. Dr. André João Maurício Leitão do Vale Wemans

Professor Auxiliar, NOVA School of Science and Technology University, Lisbon

Arguente: Dr. Ana Filipa Soares Pires

Investigadora, Instituto de Telecomunicações, Lisbon

Estudo da interação de um dispositivo de Jato de Plasma com moléculas de DNA

Copyright © Francisco Maria de Sousa Nunes Marques Pinto, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Para todos aqueles que estiveram presentes.
Obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todos aqueles que estiveram presentes e que me apoiaram durante a minha vida e mais especificamente me incentivaram e motivaram durante esta fase da minha formação acadêmica.

Em primeiro lugar quero agradecer às minhas orientadoras, a Professora Susana Sério e a Professora Maria Raposo, por me terem dado as ferramentas para conseguir encarar este desafio e por mostrarem sempre disponibilidade para resolver os problemas com que me deparei ao longo desta dissertação. Quero também agradecer ao Professor Paulo Ribeiro por se mostrar sempre disponível no auxílio da resolução de problemas. Quero realçar e agradecer a imensa ajuda que a Thais demonstrou para o começo do meu trabalho laboratorial, penso que foi verdadeiramente importante para o desenvolvimento desta dissertação.

Em segundo lugar quero agradecer a todos os amigos e colegas que conheci ao longo do curso, mais especificamente o Sebastião, o Cláudio, o Alcides, o Loja e a Sofia. Tenho a certeza de que sem eles a conclusão do curso teria sido muito mais difícil e com certeza não tão satisfatória. Desde a partilha de apontamentos a simples conversas, tudo isto contribuiu para o melhoramento da minha experiência pessoal e com cada um deles aprendi bastante, mudaram a minha forma de pensar.

Em terceiro lugar os amigos que vinham de trás, e que se mantiveram presentes, ou mesmo aqueles que depois por consequências da vida tiveram de se afastar, agradeço todo o apoio, desde as mais pequenas coisas, foi importantíssimo para mim, principalmente o João Tiago e o José Maria que já conheço desde sempre, mas também o Dinis e o Telmo que hoje são componentes importantes na minha vida. O Marco, o Cisco, o Guilherme, o Francis, o Gustavo, o Tiago Filipe e a Marta, são amigos que de uma forma ou de outra contribuíram para este percurso.

Um agradecimento ao meu amigo David Gaspar, que quando eu não consegui entrar neste curso inicialmente, foi o primeiro a criar alternativas. A ele estou-lhe grato por isso, e por ser um amigo importante.

Finalmente, direciono o mais importante agradecimento à minha família, que sempre me apoiaram, sou eternamente grato. Obrigado por sempre acreditarem em mim, por

todo o investimento feito e por me darem a oportunidade de concluir esta etapa.

”” «*“If we want to solve a problem that we have never solved before, we must leave the door to the unknown ajar.”*»

— **Richard Feynman**, In a lecture to the National Academy of Sciences, 1955

RESUMO

O cancro é um problema importante de saúde pública, pois é uma das principais causas de morte em todo o mundo. O impacto económico do cancro também é significativo, pois pode levar a elevados custos de saúde e perda de produtividade. Deste modo, é uma área importante de pesquisa e interesse na área da saúde. A abordagem proposta nesta dissertação é o uso de plasma atmosférico frio como um método de tratamento ou como técnica de tratamento secundário. Este tipo de tecnologia é interessante devido à sua seletividade, ou seja, tem a capacidade de atingir especificamente células cancerígenas, não afetando as células sãs. Para entender melhor o mecanismo de seletividade e validar a segurança da aplicação desta tecnologia, este estudo teve como objetivo observar o efeito de exposição entre o jato de plasma e as moléculas DNA e DNA encapsulado por lipossomas.

Com o objetivo de estudar a interação entre o CAP (do inglês, Cold Atmospheric Plasma) e o DNA, prepararam-se amostras de DNA em concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em solução aquosa e em emulsão aquosa com lipossomas. Foram realizados diferentes estudos para se obter mais informações sobre essa interação.

Inicialmente, foi analisado o impacto do tempo de exposição ao jato de plasma e observou-se um aumento da absorvância em todo o espectro. Concluiu-se que esse aumento foi resultado da introdução de espécies de RONS (do inglês, Reactive Oxygen and Nitrogen Species) no meio. Em seguida, foram realizados estudos de longevidade do efeito da exposição ao jato de plasma, onde se verificou que as espécies RONS podem manter-se presentes em igual concentração após 72 horas, nas condições de preservação utilizadas. Para avaliar a capacidade dos lipossomas de proteger o DNA de possíveis danos, foram realizadas análises que, devido às complicações introduzidas pelas espécies RONS, não foram conclusivas. Realizou-se um estudo de distância entre as soluções de controlo ao CAP, bem como a possibilidade de evaporação durante o período de exposição. Concluiu-se que, para que o CAP atue na solução de forma não negligenciável, é necessário que este se encontre diretamente acima da solução, não tendo sido verificado qualquer impacto do CAP nas soluções controlo ou qualquer evaporação nas condições utilizadas. Por fim, foi analisado o impacto da mistura das espécies RONS com as moléculas de água para

se perceber a sua relevância na medição dos espectros de absorvância. Concluiu-se que a ativação da água tem um papel determinante na alteração dos espectros de absorvância das soluções/emulsões medidas ao longo do estudo.

Palavras-chave: Cancro, plasma frio atmosférico, tratamento de DNA, RONS, seletividade

ABSTRACT

Cancer is a significant public health problem as it is one of the leading causes of death worldwide. The economic impact of cancer is also significant as it can lead to high healthcare costs and loss of productivity. Therefore, it is an important area of research and interest in the healthcare field. The approach proposed in this dissertation is the use of CAP as a treatment method or as a secondary treatment technique. This type of technology is interesting due to its selectivity, i.e., it has the ability to specifically target cancer cells, without affecting healthy cells. To better understand the selectivity mechanism and validate the safety of applying this technology, this study aimed to observe the effect of exposure between the plasma jet and DNA molecules and DNA encapsulated by liposomes.

In order to study the interaction between CAP (Cold Atmospheric Plasma) and DNA, samples of DNA were prepared in a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in aqueous solution and in aqueous emulsion with liposomes. Different studies were carried out to obtain more information about this interaction.

Initially, the impact of exposure time to the plasma jet was analyzed, and an increase in absorbance was observed throughout the spectrum. It was concluded that this increase was a result of the introduction of RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) in the medium. Next, longevity studies of the effect of exposure to the plasma jet were carried out, where it was found that RONS species can remain present at the same concentration after 72 hours under the preservation conditions used. To evaluate the ability of liposomes to protect DNA from possible damage, analyses were carried out that, due to the complications introduced by RONS species, were inconclusive. A study of the distance between control solutions and CAP, as well as the possibility of evaporation during the exposure period, was carried out. It was concluded that for CAP to act on the solution in a non-negligible way, it is necessary for it to be directly above the solution, and no impact of CAP on the control solutions or any evaporation under the conditions used was observed. Finally, the impact of the mixture of RONS species with water molecules was analyzed to understand their relevance in measuring absorbance spectra. It was concluded that water activation plays a decisive role in changing the absorbance spectra

of the solutions/emulsion measured throughout the experiments.

Keywords: Cancer, cold atmospheric plasma, DNA treatment, RONS, selectivity

ÍNDICE

Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvi
Siglas	xvii
1 Introdução	1
1.1 Motivação	1
1.2 Estrutura da Dissertação	2
2 Conceitos Teóricos	3
2.1 Ácido Desoxirribonucleico	3
2.2 Lipossomas	4
2.3 Plasma	5
3 Estado da Arte	7
3.1 Contextualização Histórica	7
3.1.1 Eletrofisiologia	7
3.1.2 Descoberta do Plasma	11
3.1.3 Aplicação do Plasma na Medicina	11
3.2 Utilização do CAP no tratamento do Cancro	14
3.3 Estudos relacionados com a interação entre o CAP e DNA	20
4 Materiais e Técnicas	22
4.1 Princípio de funcionamento da fonte	22
4.2 Descrição do Dispositivo	22
4.3 Princípio de produção do jato de plasma CAP	23
4.4 Caracterização da Pluma do Plasma por Espetroscopia Ótica de Emissão	25
4.5 Preparação das Soluções de DNA	26
4.6 Preparação de Emulsões de Lipossomas	26

4.7	Preparação de Emulsões de DNA Encapsulado	27
4.8	Descrição do tipo de tratamento realizado em cada ensaio	28
4.9	Funcionamento do espectrofotômetro	30
5	Resultados e Discussão	31
5.1	Estudo preliminar do impacto do CAP na solução de DNA	31
5.2	Estudo da absorvância da solução tratada com diferentes tempos de exposição ao CAP	32
5.2.1	Análise da área dos picos em relação ao tempo de exposição ao CAP	33
5.2.2	Análise do deslocamento dos picos em relação ao tempo de exposição ao CAP	36
5.3	Estudo da absorvância da solução ao longo de 72 horas após exposição ao CAP	37
5.3.1	Estudo da absorvância da solução de DNA exposta ao CAP ao longo de 72 horas	37
5.3.2	Estudo da absorvância da emulsão de lipossomas ao longo de 72 horas após exposição ao CAP	39
5.3.3	Estudo da absorvância da emulsão de DNA encapsulado ao longo de 72 horas após exposição ao CAP	41
5.3.4	Estudo da interação entre o CAP e o DNA encapsulado	44
5.4	Estudo da absorvância da solução controlo variando a distância ao CAP	46
5.5	Estudo da absorvância da água após o tratamento com o CAP	47
5.5.1	Estudo da água após o tratamento com o CAP	47
5.5.2	Estudo da água 72 horas após o tratamento	48
5.5.3	Estudo da influência da água nos espectros de absorvância da solução de DNA	49
6	Conclusões e Trabalho Futuro	51
6.1	Conclusões Finais	51
6.2	Trabalho Futuro	52
	Bibliografia	54

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1	Ilustração simplificada de uma molécula de DNA, e das suas respetivas bases azotadas. Adaptado de [6].	4
2.2	Ilustração simplificada de um lipossoma, e dos seus componentes. Adaptado de [8].	4
3.1	Figura que ilustra tratamento por administração de descarga elétrica utilizando uma garrafa de Leyden, no século 18. Adaptado de [10].	8
3.2	Fotografia de uma <i>Violet Wand</i> portátil assim como as suas diferentes pontas, para diferentes usos. Adaptado de [12].	9
3.3	Conjunto de gráficos apresentados por Napp et al., ilustram o impacto dos diferentes dispositivos de plasma no tratamento de diferentes espécies de bactérias. Cada letra representa uma espécie diferente da seguinte forma a) CA , b) SA, c) SE, d) PA, e e) EC. Adaptado de [12].	10
3.4	Cronograma da utilização do plasma na medicina. Adaptado de [15].	12
3.5	Figura que compara o funcionamento de um plasma <i>pencil</i> com uma plasma <i>needle</i> . Adaptado de [27].	13
3.6	Figura que compara o funcionamento de um DBD com um FE-DBD. Adaptado de [27].	13
3.7	Histograma que demonstra, que mesmo quando utilizando agentes inibidores dos agentes reativos, continua a haver uma redução da viabilidade das espécies após interação com o plasma. Adaptado de [33]. Do lado esquerdo do gráfico estão representadas as células identificadas com marcadores cancerígenas, do lado direito, as mesmas células após tratamento com o CAP. Foram estudados três meios celulares com diferente concentrações de N-acetil-L-cisteína (NAC), o <i>scavenger</i> utilizado.	15
4.1	Fotografias da caneta de CAP, onde: 1) Craveira digital; 2) Placa de alumínio; 3) Extensor; 4) Entrada de argon; 5) Eléctrodo interno; 6) Eléctrodo externo; 7) Posicionador vertical; 8) Suporte de acrílico. Adaptado de [65].	23

4.2	Nesta figura são ilustrados tanto o DBD, apresentado à direita como o APPJ, à esquerda. A similaridade das estruturas é evidenciada pela caracterização das mesmas, da seguinte forma. 1) Fonte de alimentação; 2) Eléttodos; 3) Barreira dielétrica; 4) Fluxo de gás; 5) Plasma. Adaptado de [68].	24
4.3	Curvas de Paschen que ilustram a lei de Paschen. Adaptado de [69].	24
4.4	Espectro do jato de plasma para o eléttodo de fio de cobre. Adaptado de [65].	26
4.5	Processo de tratamento das soluções. Utilizando uma micropipeta, as soluções/emulsões são transportadas dos fracos onde são conservadas, para os poços com igual volume de 3mL, seguidamente as soluções/emulsões são expostas ao CAP por um determinado período de tempo. Adaptado de [66]	28
4.6	Diagrama de funcionamento de um espetrofóttmetro de duplo feixe. Adaptado de [74]	30
5.1	Comparação de dois espectros de absorvância de soluções de DNA, a preto soluções de DNA controlo e a vermelho soluções de DNA exposto à pluma de plasma durante 16 minutos.	31
5.2	Espectro de absorvância das soluções de DNA em função do comprimento de onda, para diferentes tempos de exposição.	32
5.3	Espectro de absorvância das soluções de DNA em função do comprimento de onda, para 2 e 16 minutos de exposição, incluindo o espectro de absorvância da solução controlo de DNA, para comparação.	32
5.4	Área do pico a 200 nanóttmetros em relação ao tempo de exposição ao CAP. .	33
5.5	Área do pico a 250 nanóttmetros em relação ao tempo de exposição ao CAP. .	34
5.6	Área do pico a 270 nanóttmetros em relação ao tempo de exposição ao CAP. .	34
5.7	Área total dos picos em relação ao tempo de exposição ao CAP.	35
5.8	Deslocação percentual do pico aos 200 nanóttmetros em relação com o tempo de exposição	36
5.9	Deslocação percentual do pico aos 250 nanóttmetros em relação com o tempo de exposição	36
5.10	Deslocação percentual do pico aos 270 nanóttmetros em relação com o tempo de exposição	37
5.11	Espectros de absorção da solução controlo de DNA ao longo de 72 horas medidos com intervalo de 24 horas.	38
5.12	Espectros de absorção da solução de DNA exposta ao CAP ao longo de 72 horas após exposição com medidos com intervalo de 24 horas. A solução foi inicialmente exposta ao CAP durante 16 minutos.	38
5.13	Espectros de absorvância das emulsões de controlo de lipossomas ao longo de 72 horas.	39
5.14	Espectros de absorvância das emulsões de lipossomas ao longo de 72 horas após exposição ao CAP. A emulsão foi inicialmente exposta ao CAP durante 2 minutos	39

5.15	Espectros de absorvância das emulsões de lipossoma de controlo e expostas ao CAP no dia de exposição ao CAP.	40
5.16	Espectros de absorvância das emulsões de lipossoma de controlo e expostas ao CAP 72 horas após a exposição ao CAP.	40
5.17	Gráfico que combina as duas figuras 5.15 e 5.16.	41
5.18	Espectros de absorvância das emulsões de controlo de DNA encapsulado por lipossomas ao longo de 72 horas.	42
5.19	Espectros de absorvância das emulsões de DNA encapsulado por lipossomas ao longo de 72 horas após exposição ao CAP.	42
5.20	Espectros de absorvância das emulsões controlo e expostas ao CAP de DNA encapsulado por lipossomas no dia de exposição ao CAP.	43
5.21	Espectros de absorvância das emulsões controlo e expostas ao CAP de DNA encapsulado por lipossomas 72 horas após a exposição ao CAP.	43
5.22	Gráfico que combina os espectros de absorção das figuras 5.20 e 5.21	44
5.23	Espectros de absorvância das soluções/emulsões de controlo de DNA, de lipossomas e de DNA encapsulado.	44
5.24	Espectros de absorvância das soluções/emulsões de DNA, de lipossomas e de DNA encapsulado expostas ao CAP durante 2 minutos.	45
5.25	Gráfico que combina as duas figuras 5.23 e 5.24.	45
5.26	Espectros de absorção de cada grupo controlo de DNA. O grupo 1 foi mantido na mesma placa durante o tratamento, o grupo 2 foi mantido numa placa afastada durante o tratamento e o grupo 3 foi mantido no frasco original onde estava mantido o DNA	46
5.27	Gráfico do espectro de absorvância da água tratada com CAP durante 16 minutos	47
5.28	Espectro de absorção da água tratada ao longo de 72 horas após a exposição ao CAP.	48
5.29	Espectros de absorção da solução de DNA e da água, ambos com tempo de exposição ao CAP de 16 minutos, com o objetivo de comprovar a influência da água ativada por exposição ao CAP no espectro de absorção da solução de DNA.	49
5.30	Comparação entre o espectro de absorção da solução de controlo de DNA e o espectro resultante da subtração entre os dois espectros representados na figura 5.29, identificado na legenda da figura por EDS.	49

ÍNDICE DE TABELAS

3.1	Tabela que ordena a utilização do plasma na medicina desde o século 18 com a sugestão do uso de descargas para tratamento médico até ao século 21 com a invenção dos dispositivos de produção de plasma contemporâneos.	14
3.2	Apresenta um resumo dos principais trabalhos referenciados na literatura sobre a exposição de células cancerígenas ao CAP	18
3.3	Apresenta um resumo dos principais trabalhos referenciados na literatura que analisam a exposição do DNA ao CAP	20
4.1	Na tabela são apresentados os três tipos de soluções utilizadas e os respectivos volumes de cada substância, assim como a sua proporção em percentagem em relação à solução produzida.	27
4.2	Na tabela são apresentados e descritos, os quatro tipos de ensaio realizados, com os respectivos objetivos.	28

SIGLAS

- AC** *Alternating Current (p. 5)*
- AFOSR** *Air Force Office of Scientific Research (p. 11)*
- APPJ** *do inglês, Atmospheric Pressure Plasma Jet (pp. 9, 18–20, 23)*
- CA** *Candida albicans (p. 9)*
- CAP** *do inglês, Cold Atmospheric Plasma (pp. 5, 7, 11–13, 16–21, 23, 28, 29, 31–33, 35, 37–39, 41, 44, 46, 47, 49, 51, 52)*
- DBD** *Dielectric-barrier discharge (pp. 9, 13, 19, 23)*
- DC** *Direct Current (p. 5)*
- DNA** *do inglês, Deoxyribonucleic Acid (pp. 3, 4, 7, 16, 19–22, 25–27, 29–33, 35, 37, 38, 41, 42, 44–47, 49–53)*
- DPPC** *1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (pp. 26, 27)*
- DPPG** *1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (pp. 26, 27)*
- EC** *Escherichia coli (p. 9)*
- FE-DBD** *Floating electrode Dielectric-barrier discharge (p. 13)*
- NAC** *N-acetil-L-cisteína (pp. xiii, 15)*
- PA** *Pseudomonas aeruginosa (p. 9)*
- PAL** *Plasma Activated Liquid (p. 17)*
- PAM** *Plasma Activated Medium (p. 17)*
- PCM** *Plasma Conditioned Medium (p. 17)*
- RNS** *Reactive Nitrogen Species (p. 25)*
- RONS** *Reactive Oxygen and Nitrogen Species (pp. 14–21, 33, 35, 37, 41, 48, 51, 52)*
- ROS** *Reactive Oxygen Species (pp. 16, 21, 25, 48)*

SA	Staphylococcus aureus (p. 9)
SE	Staphylococcus epidermidis (p. 9)
slm	standard liter per minute (p. 29)
SOD	Superóxido dismutase (p. 16)
VW	<i>Violet Wand</i> (pp. 9, 14)

INTRODUÇÃO

1.1 Motivação

O cancro é um conjunto de mais de 100 doenças que têm um fator em comum, o crescimento descontrolado de células. Uma célula normal tem um ciclo de vida bem definido que é composto pelo seu crescimento e consequente divisão da mesma pelo processo de mitose. Já as células cancerígenas crescem e dividem-se incontrolavelmente, pois conseguem utilizar a telomerase para adicionar telómeros aos terminais do DNA durante a sua fase de replicação (fase S). Para uma célula se tornar cancerígena terá que primeiro sofrer uma mutação genética, do DNA da célula. Esse processo, pode acontecer a qualquer pessoa, de qualquer idade e por essa razão apresenta-se também como a segunda causa de morte a nível mundial ficando apenas atrás das doenças cardiovasculares, tendo resultado num total de 9,6 milhões de mortes em 2017 [2]. Existem múltiplos fatores que podem contribuir para o aparecimento de uma doença maligna, nomeadamente: o tipo de dieta, o tabaco, a exposição excessiva à radiação solar, predisposição genética, exposição a certos agentes químicos, entre outros. Além disso, estes fatores podem atuar isoladamente ou em conjunto durante vários anos até se declarar doença. Em alguns tipos de cancro, se a exposição for evitada ou limitada, é possível que a doença oncológica se manifeste. Um exemplo é o cancro da pele que pode ser evitado limitando a exposição solar e/ou usando protetores solares.

Por ser uma doença tão devastadora e comum, este trabalho de dissertação pretende contribuir para um estudo que visa utilizar um equipamento não invasivo, portátil e económico baseado na tecnologia de plasma com o objetivo de verificar a possibilidade da sua aplicação como complemento às técnicas existentes atualmente ou até mesmo ser utilizado como tratamento alternativo. Pretende-se ainda validar a segurança da aplicação desta tecnologia, uma vez que os estudos referenciados na literatura mostram uma grande seletividade para as células cancerígenas, não afetando as células sãs. Neste sentido será realizado o estudo da interação do dispositivo de jato de plasma e soluções de DNA e DNA encapsulado por lipossoma de forma a avaliar eventuais danos que possam ser causados na estrutura do DNA.

1.2 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação encontra-se dividida em 6 capítulos que são brevemente apresentados a seguir.

No capítulo 1, é descrita a motivação para o trabalho realizado assim como os objetivos que se pretendem alcançar.

No capítulo 2, são apresentados os conceitos teóricos que são relevantes à dissertação. Aqui, são explicados os três conceitos fundamentais do trabalho: o DNA, os lipossomas e o plasma. É explicado cada conceito incluindo a sua importância para a compreensão do estudo apresentado na dissertação e a sua relação com os outros conceitos.

No capítulo 3, é apresentada a revisão da literatura da tecnologia de plasma na medicina. Começando por uma contextualização histórica onde são abordados tópicos como: o início da eletrofisiologia, a descoberta do plasma como estado físico, concluindo com a história da utilização do plasma na medicina, incluindo as principais descobertas e avanços neste campo. Após a contextualização histórica, é apresentada uma revisão da literatura relacionada com a utilização do plasma no tratamento do cancro, assim como é abordada a literatura relativamente à interação entre o plasma e o DNA, que é especialmente relevante para a dissertação.

No capítulo 4, é explicado o princípio de funcionamento do dispositivo de jato de plasma e a sua descrição. É apresentado o processo de produção do CAP, a caracterização da pluma de plasma, a preparação do DNA, dos lipossomas e das soluções de DNA e lipossomas. Finalmente, é descrito o tratamento realizado para cada ensaio.

No capítulo 5, são apresentados os resultados obtidos para cada estudo realizado e uma discussão sobre os resultados e as suas implicações para a área de pesquisa.

No capítulo 6, é apresentada a conclusão geral da dissertação e o trabalho futuro para obter melhores resultados, ou aprofundar o estudo realizado.

CONCEITOS TEÓRICOS

Como introduzido anteriormente, este trabalho pretende contribuir para uma série de estudos conduzidos com o intuito de melhorar o conhecimento sobre a possibilidade de aplicar tecnologia de plasma na medicina. Mais especificamente para tentar perceber os efeitos e possíveis consequências da interação entre o plasma e o DNA e tentar perceber o papel da membrana celular na proteção aquando desta interação, através de células primitivas. Devido à semelhança das estruturas, para simular uma membrana celular é realizado o encapsulamento do DNA com lipossomas. Para perceber este processo é importante, antes disso, perceber as estruturas e mecanismos que o envolvem.

2.1 Ácido Desoxirribonucleico

O Ácido desoxirribonucleico (*do inglês, Deoxyribonucleic Acid (DNA)*) é um composto orgânico, constituído por quatro bases azotadas nomeadamente: adenina (A), guanina(G), citosina(C) e timina (T). A estrutura molecular de cada uma destas bases azotadas encontra-se esquematizada na figura 2.1. O DNA contém as instruções genéticas para o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos, e por essa razão, a sua integridade é fundamental para o bem estar dos mesmos. Qualquer dano não reparado no DNA pode eventualmente causar mutações genéticas. Apesar de ser verdade de que o ser humano tem a capacidade de auto-reparação de DNA através de uma reparação direta do dano ou mais comumente, a remoção das bases danificadas seguida da re-síntese dessas regiões, porém se a replicação do DNA ocorrer mais rapidamente do que a reparação, este dano, irá propagar-se. Por essa razão é importante prevenir este tipo de danos, e é esse o foco desta dissertação. Assim, de modo a avaliar a segurança da aplicação da tecnologia de plasma na medicina é importante validar se esta técnica pode provocar danos na estrutura do DNA [3][4][5].

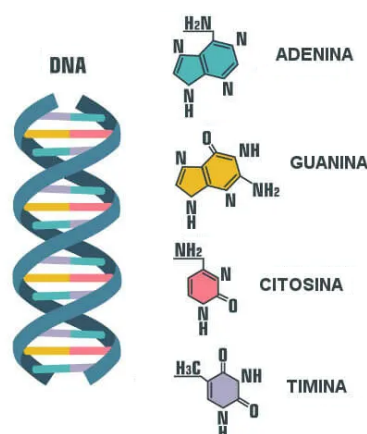


Figura 2.1: Ilustração simplificada de uma molécula de DNA, e das suas respetivas bases azotadas. Adaptado de [6].

2.2 Lipossomas

Os lipossomas são vesículas de geometria esférica compostas por uma ou mais camadas fosfolípídicas. Este tipo de camadas é formada pelo acoplamento de uma extremidade hidrofílica coloquialmente denominada como cabeça e outra hidrofóbica, denominada de cauda. Aproveitando estas características e tendo em conta a sua geometria esférica, os lipossomas têm a capacidade de encapsular e transportar compostos aquosos no seu interior, como é possível observar na figura 2.2. Neste trabalho esta capacidade será usada para encapsular moléculas de DNA [7]. Como introduzido anteriormente, o encapsulamento do DNA com lipossomas, simula a estrutura de uma célula básica sem organelos, isto é, apenas composta por DNA onde a membrana celular é substituída pelos lipossomas. O papel dos lipossomas nesta dissertação é proteger o DNA de eventuais danos resultantes da interação do mesmo com o jato de plasma.

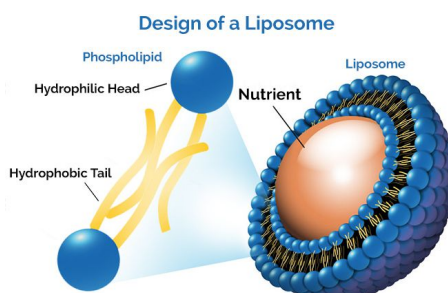


Figura 2.2: Ilustração simplificada de um lipossoma, e dos seus componentes. Adaptado de [8].

2.3 Plasma

O plasma é um dos quatro estados fundamentais da matéria, consiste num gás ionizado com elétrons livres que apresenta quase neutralidade e que, ao contrário de um gás neutro, comporta-se de forma coletiva, isto deve-se à sua capacidade de interagir com campos eletromagnéticos. Este conceito de quase neutralidade, refere-se ao facto de que a distâncias suficientemente grandes o plasma é eletricamente neutro, mas na escala do comprimento de Debye pode existir desequilíbrio de cargas. Todos os gases ao receberem quantidades suficientemente elevadas de energia podem ter os seus átomos e moléculas ionizadas. Ou seja, ter os seus elétrons distanciados de tal forma, que estes sentem uma atração Coulombiana por parte do núcleo atómico relativamente negligenciável, e assim tornam-se elétrons livres. A esta energia chamamos de energia de ionização, esta depende da atração entre os elétrons do átomo e o núcleo, e da repulsão entre elétrons (efeito de blindagem). Por esta razão, a energia de ionização varia com o elemento.

Excluindo a matéria negra, o plasma é a forma de matéria mais abundante no universo conhecido. Quando comparando com os restantes três estados fundamentais, o plasma é sem dúvida o mais abundante traduzindo-se em 99% do universo conhecido. O plasma é mais comumente associado com as estrelas, auroras boreais ou até a famosa "bola" de plasma. Neste último exemplo, o plasma é gerado de forma artificial.

Existem dois possíveis métodos de gerar um plasma, sendo o primeiro, a manipulação da temperatura de um gás neutro, já o segundo método, implica submeter um gás neutro a um campo eletromagnético forte. Ambos os métodos têm o mesmo objetivo, ionizar o gás neutro.

O primeiro método usa altas temperaturas com o objetivo de ionizar o gás e ocorre de acordo com a seguinte sequência de acontecimentos. Inicialmente, injeta-se uma quantidade específica de energia em forma de calor (calor latente, que representa a energia necessária para fazer transitar o estado físico da matéria). Esta traduz-se em colisões entre partículas aceleradas e as partículas do material que se pretende aquecer. Ao colidirem, os átomos gasosos transitarão de estado físico, neste caso o processo dá-se do estado gasoso para o estado de plasma. Este tipo de plasma apresenta um grau elevado de ionização e dá-se-lhe o nome de plasma térmico ou plasma quente.

Já o segundo método, ocorre a temperaturas relativamente baixas (aproximadamente a 30° C, próxima da temperatura ambiente) utiliza dois elétrodos (cátodo e ânodo) e uma diferença de potencial *Direct Current (DC)* ou *Alternating Current (AC)* entre eles; o cátodo emite elétrons que colidem com as moléculas do gás, ionizando-o. A este tipo de plasma dá-se o nome de plasma não térmico, ou plasma frio, ou como é mais conhecido plasma atmosférico frio (*do inglês, Cold Atmospheric Plasma (CAP)*).

Quando comparando os dois tipos de plasma, é possível retirar uma conclusão chave, o grau de ionização entre os dois tipos de plasma é muito diferente, isto é, o número de átomos ionizados é muito superior no plasma térmico do que no *CAP*. Assim é, pois, no *CAP*, o campo elétrico elevado utilizado para a ionização resulta na aceleração dos

eletrões, desse modo dotando-os de energia, resultando numa grande diferença energética entre os eletrões livres e os iões do gás. Por outro lado, no caso do plasma térmico, todo o gás é aquecido, e, como tal os iões do gás e os seus eletrões livres encontram-se em equilíbrio térmico.

É importante também referir que, os átomos do plasma ao desexcitarem para o seu estado fundamental, libertam radiação numa banda energética entre os 350 nm e os 1050 nm, no caso do árgon [9]. O tamanho da banda de emissão, depende do elemento que gera o plasma.

ESTADO DA ARTE

Este capítulo foca-se na evolução tecnológica no que diz respeito à utilização de eletricidade na medicina, nomeadamente como começou, o seu desenvolvimento, e a relação entre as tecnologias primordiais com a tecnologia de plasma aplicado na medicina.

O capítulo está dividido em três secções: a primeira onde é aprofundada a contextualização histórica, a segunda secção onde é abordado o conhecimento existente relativo à utilização do CAP no tratamento do cancro, e uma terceira secção onde são apresentados estudos sobre a interação do DNA com o jato de plasma.

No final do capítulo são dados a conhecer os trabalhos referenciados na literatura, antecedente a este estudo, importante para a construção de conhecimento necessário à realização do mesmo.

3.1 Contextualização Histórica

Esta secção foca-se na evolução tecnológica no que diz respeito à utilização de eletricidade na medicina, nomeadamente como começou, o seu desenvolvimento, e a relação entre as tecnologias primordiais com a tecnologia de plasma aplicado na medicina.

3.1.1 Eletrofisiologia

Devido à notoriedade que o uso da eletricidade estava a ganhar no início do século 18, muitos académicos começaram a meditar sobre a sua aplicabilidade, entre eles, Johann Gottlob Krüger, a primeira pessoa a considerar a utilização de eletricidade na medicina. Em 1743 sugeriu que a existência de uma "aura gasosa" denominada por *efflevium* que envolvia o corpo humano e que podia ser gerada e manipulada utilizando dispositivos capazes de gerar descargas elétricas da época como, por exemplo, a garrafa de Leyden. Era crença da altura que esta manipulação teria fins terapêuticos. É relevante frisar que não existe qualquer evidência da existência de *efflevium* [10].

Neste período a eletricidade estava a ser abordada como uma descoberta recente, e por isso foram surgindo questões. Daqui nasce a necessidade de realizar experiências que respondam a estas mesmas questões. Entre elas, as mais importantes foram realizadas

inicialmente por Abbé Nollet, Sauveur François Morand e Joseph Marie François de la Sône, onde tentaram utilizar uma garrafa de Leyden para tentar curar partes do corpo afetadas por paralisia. Este tipo de tratamento foi concluído sem sucesso mas abriu as portas a este tipo de utilidade [10].

Mais tarde, Jean Jallabert utiliza eletricidade para curar um paciente que tinha ficado paralisado do seu lado direito do corpo. Após este tratamento, o paciente conseguia coxear, falar, e levemente mexer o braço. Jallabert também realizou uma série de experiências que lhe permitiram perceber como desencadear uma reação muscular involuntária através da utilização de eletricidade. Jallabert acabou por demonstrar também que a eletroterapia tem a capacidade de restaurar propriedades como a sensibilidade térmica, e a flexibilidade muscular. Mais tarde, em 1785, através de inúmeras experiências de diversos cientistas, já é possível observar um tratamento bastante semelhante ao contemporâneo, utilizando equipamento rudimentar, como pode ser observado na figura 3.1 [10].

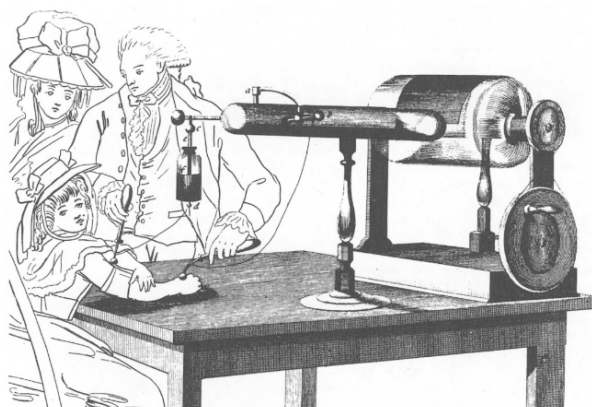


Figura 3.1: Figura que ilustra tratamento por administração de descarga elétrica utilizando uma garrafa de Leyden, no século 18. Adaptado de [10].

Em 1835, Guillaume Benjamin Armand Duchenne demonstrou a capacidade de estimular músculos individualmente, auxiliando na capacidade de diagnóstico [11].

Mais tarde entre 1890 e 1983, D'Arsonval e Nikola Tesla demonstram que utilizando correntes a frequências elevadas, não são visíveis quaisquer danos ao invés de quando são utilizadas correntes a frequências mais baixas [10].

Em 1897, utilizando um dispositivo criado por D'Arsonval, de nome *D'Arsonval cage*, Paul Odin demonstrou a capacidade anestésica, assim como a capacidade de destruir pequenos tumores superficiais. Antes de Paul Odin, em 1890, William Steavenson, chefe do departamento elétrico no *Bartholomew's Hospital* em Londres, publicou *The Uses of Electrolysis in Surgery* onde recomendou procedimentos de utilização de eletricidade em cirurgias. Um destes procedimentos foi, baseado no trabalho de Robert Newman, que nas suas publicações disse que teria tratado casos de cancro no útero [10].

Em 1900, Joseph Rivière, utilizando correntes de alta frequência reportou conseguir destruir ou reduzir o tamanho de tumores malignos [10].

Devido ao desenvolvimento científico, entre 1890 e 1960, a eletroterapia foi perdendo prevalência, porque esta área foca-se na cura de doenças, que através desta evolução se tornaram menos relevantes, com o desenvolvimento de vacinas, antibióticos e vitaminas, substituintes muito mais práticos e fáceis de administrar [10].

É importante também realçar que, comparativamente com os dispositivos de plasma *do inglês*, *Atmospheric Pressure Plasma Jet (APPJ)* e *Dielectric-barrier discharge (DBD)*, a *Violet Wand (VW)* apresenta resultados muito semelhantes ao *APPJ* mesmo em diferentes modos de utilização (pulsado e não pulsado) no tratamento de culturas bacterianas *in vitro*, enquanto que o *DBD* apresenta resultados superiores. Desta forma, pode-se concluir que a *VW*, apesar de ser um instrumento do século 20 apresenta resultados impressionantes [12]. Uma fotografia deste dispositivo pode ser observada na figura 3.2



Figura 3.2: Fotografia de uma *Violet Wand* portátil assim como as suas diferentes pontas, para diferentes usos. Adaptado de [12].

Na figura 3.3, é possível observar a comparação realizada por Napp et al., onde este procura estudar o impacto de uma *VW* no tratamento de bactérias de diferentes espécies, nomeadamente: *Staphylococcus epidermidis (SE)*; *Staphylococcus aureus (SA)*; *Candida albicans (CA)*; *Escherichia coli (EC)* e *Pseudomonas aeruginosa (PA)*. Cada tratamento foi feito com períodos de exposição de 0, 3, 9, 15, 30, 60 e 90 minutos. Neste estudo também foi comparado os resultados deste dispositivo com dispositivos mais modernos, nomeadamente *DBD*, e *APPJ* e as suas variantes, mais especificamente, dois dispositivos *DBD* com elétrodos de diferentes tamanhos e três variantes de *APPJ* sendo a primeira pulsada, e as restantes duas não pulsadas [12].

Deste estudo Napp et al., concluiu que o tratamento utilizando a *VW* foi o segundo melhor, em termos de eficácia de tratamento, atrás apenas do *DBD* de elétrodo maior, como é possível observar nos gráficos obtidos apresentados na figura 3.3 [12].

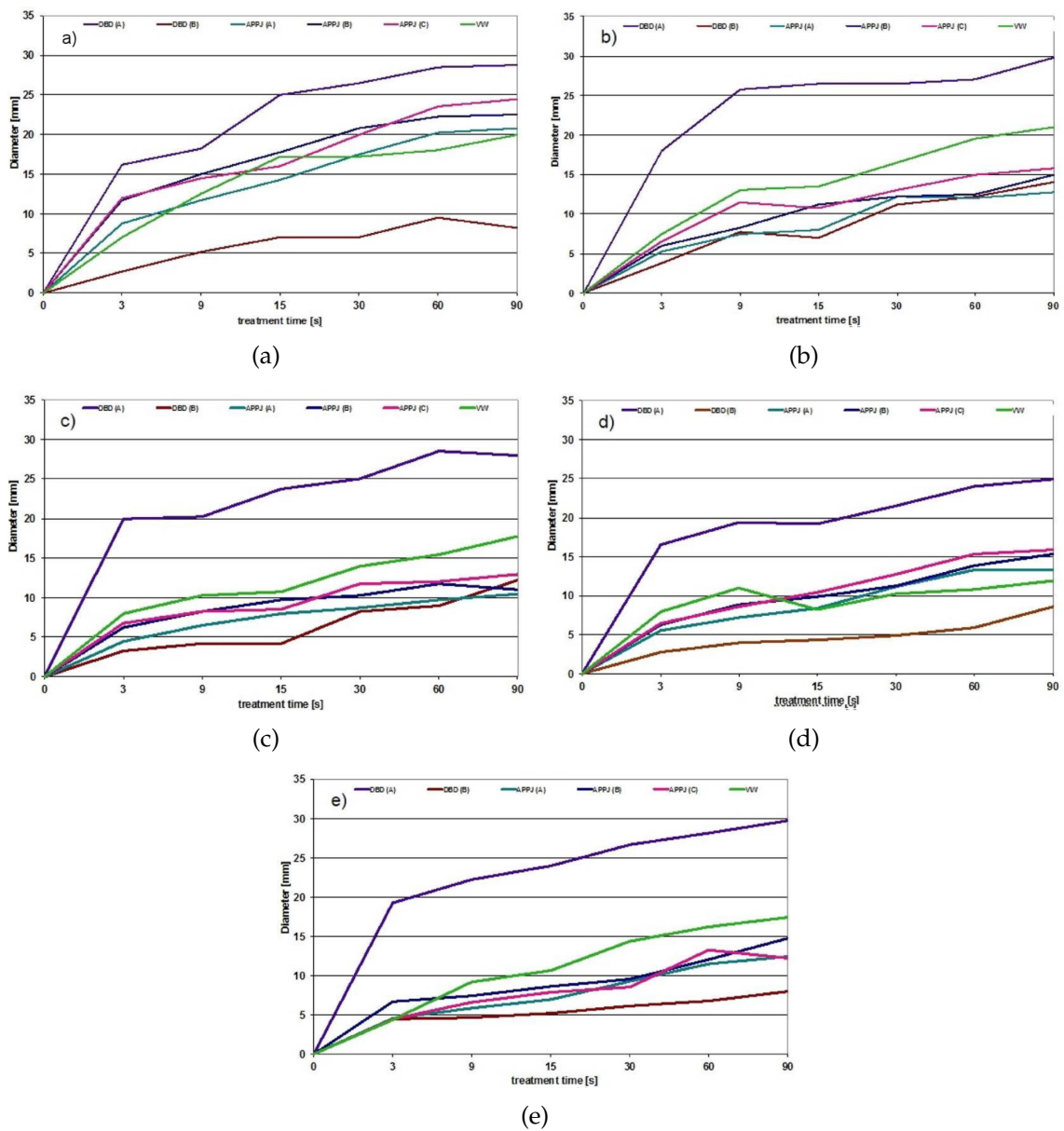


Figura 3.3: Conjunto de gráficos apresentados por Napp et al., ilustram o impacto dos diferentes dispositivos de plasma no tratamento de diferentes espécies de bactérias. Cada letra representa uma espécie diferente da seguinte forma a) CA , b) SA, c) SE, d) PA, e e) EC. Adaptado de [12].

3.1.2 Descoberta do Plasma

Entre 1869 e 1875 o estado plasma, foi identificado pela primeira vez em laboratório por *Sir William Crookes* utilizando o Tubo de Crookes. Inventado pelo mesmo, era uma ampola de vidro comprida com um formato de pera, que continha um gás a uma pressão muito baixa de modo a aumentar o livre percurso médio e tinha no seu interior, o ânodo e o cátodo. Em 1879, *Sir William Crookes* apresentou uma palestra sobre este conceito naquilo que ele identificou como sendo matéria radiante [13].

Em 1920, esta matéria radiante ganha interesse por parte de *Irving Langmuir* e seus colegas, que começam a estudar a mesma com o objetivo de tentar explicar o fenômeno observado. No entanto, apenas em 1928, *Irving Langmuir* introduz o termo plasma ao fazer uma analogia com o plasma do sangue uma vez que, a maneira como os elétrons são transportados através de filamentos, lembrava-lhe a maneira como o plasma sanguíneo transporta os glóbulos brancos e glóbulos vermelhos [13].

Ao longo do tempo o estudo do plasma revelou-se muitíssimo relevante devido à sua amplitude de aplicações nos mais diversos ramos, nomeadamente, na indústria automóvel, na medicina, microelectrónica, entre muitos outros [13].

O método escolhido para gerar o plasma é altamente relevante quando considerando a sua aplicação. Isto é, para diferentes tipos de aplicações, é necessário que haja uma escolha adequada do tipo de plasma a utilizar. Exemplificando de modo a ilustrar a escolha de métodos, para a soldadura de metais na indústria automóvel, o CAP não é de todo útil pois a temperatura máxima deste tipo de plasma não é capaz de fundir a solda, por outro lado, nos tratamentos médicos, o plasma quente pode resultar em ferimentos, como por exemplo queimaduras devido às elevadas temperaturas [13][14].

3.1.3 Aplicação do Plasma na Medicina

No final do século 20, *Mounir Laroussi* propôs uma maneira mais económica e prática de esterilização quando comparada com os processos da altura, nomeadamente radiação UV, incineração ou utilizando de auto-claves [14]. Neste artigo apresentou que plasma gerado à pressão atmosférica é um bom agente esterilizante. Devido aos resultados que apresentou, ganhou a atenção do *Physics and Electronics Directorate of the US Air Force Office of Scientific Research (AFOSR)*, que decidiu patrocinar este tipo de aplicação, com o objetivo de tratar soldados feridos, assim como para desinfeção e descontaminação [14]. Esta esterilização foi observada em bactérias, esporos, filmes, vírus e fungos [14]. Este financiamento, resultou na descoberta e publicação de diferentes artigos e aplicações deste modo trazendo de volta a aplicação da eletricidade na medicina como tratamento e mais tarde culminando na criação de um novo campo da ciência, o plasma aplicado à medicina [14].

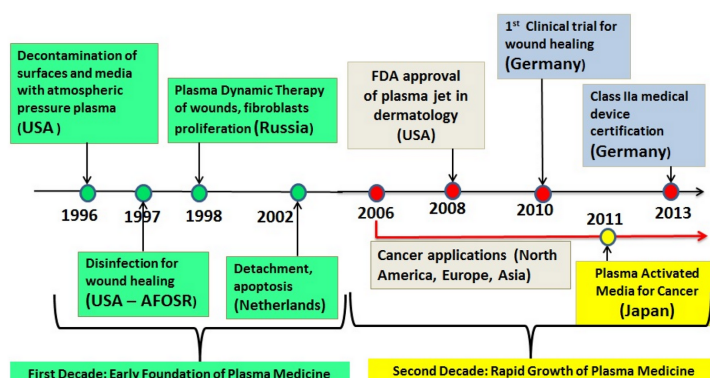


Figura 3.4: Cronograma da utilização do plasma na medicina. Adaptado de [15].

Com o enorme crescimento científico observado nas últimas décadas, este campo da ciência tem sido uma área emergente da investigação médica, onde muitos estudos clínicos estão particularmente focados nos efeitos não letais/estimulantes em células e tecidos vivos, englobando aplicações já anteriormente estudadas como a esterilização, desinfecção, descontaminação, tratamento de feridas, odontologia, oncologia, farmacologia, indústria alimentar, entre outros [16][17][18][19][20][21]. Esta multifuncionalidade apresentada, é um dos grandes incentivos ao estudo e desenvolvimento da área. Um breve sumário deste percurso pode ser observado na figura 3.4.

Tal como mencionado anteriormente, a utilização de eletricidade na medicina já data desde o século 18, pelo que não é uma tecnologia recente. O mesmo pode ser dito para a utilização do plasma na medicina uma vez que, já data de finais do século 20, ainda que mais recente do que a eletromedicina, mesmo assim traduz-se num campo já anteriormente explorado. No entanto, neste tipo de aplicações eram principalmente utilizadas os efeitos térmicos do plasma, como por exemplo tratamento de coagulações sanguíneas, algo já estudado pela eletromedicina no século 19. Mas tal como mencionado no capítulo anteriormente, o plasma térmico, utilizado na altura prevê alguns riscos, nomeadamente risco de queimadura, irritações e no caso de bactérias, possível aniquilação indiscriminada de culturas [16][17][18][19][20][21][22][23]. A descoberta do CAP, veio eliminar estes riscos.

Em 1992, Koinuma et al. desenvolve aquele que é o primeiro dispositivo de jato de plasma frio, CAP RF, resolvendo o problema térmico e ao mesmo tempo abre a possibilidade de conseguir aplicar tratamentos de uma maneira mais controlada e minuciosa do que o DBD [24][25]. Mais tarde em 2001, Stoffels et al. veio apresentar uma versão miniatura deste dispositivo, de nome agulha de plasma (do inglês, *plasma needle*), melhorando a portabilidade e acessibilidade do dispositivo [26]. Em 2005 desenvolvido por Mounir Laroussi et al., é desenvolvido o *plasma pencil* [22][23][27]. A escolha do dispositivo depende das necessidades específicas de cada aplicação. Cada dispositivo apresenta vantagens e desvantagens em relação ao outro. Como ilustrado na figura 3.5, a *plasma needle* tem um eletrodo com diâmetro menor em comparação com o *plasma pencil*. Essa diferença resulta

em jatos com maior densidade de plasma e maior precisão. No entanto, a menor densidade de plasma apresentada pelo *plasma pencil*, resulta num jato mais difuso e, portanto, mais seguro para o utilizador. A maior área de tratamento também é um fator a ser considerado.

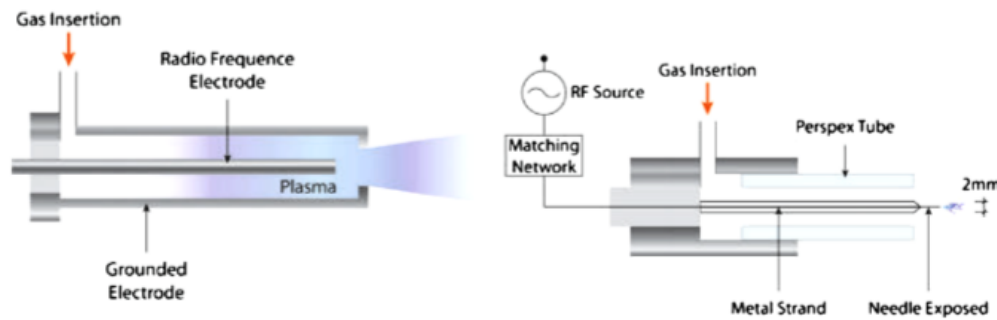


Figura 3.5: Figura que compara o funcionamento de um *plasma pencil* com uma *plasma needle*. Adaptado de [27].

À parte das invenções supracitadas também é importante salientar o aperfeiçoamento, e criação de variantes de dispositivos já anteriormente existentes como o DBD, criado pela empresa Siemens em 1857, o qual é o dispositivo de CAP mais popular apesar de que este dispositivo apenas tenha sido utilizado com fim medicinal no final do século 20 [28]. Uma das variantes do DBD é a descarga de barreira dielétrica de eletrodo flutuante (do inglês, *Floating electrode Dielectric-barrier discharge (FE-DBD)*), desenvolvido por Fridman et al.. Este dispositivo, apresenta apenas um eletrodo, isto porque o segundo eletrodo acaba por ser a amostra a tratar, como por exemplo a pele [29][27]. A diferença de configuração pode ser observada na figura 3.6.

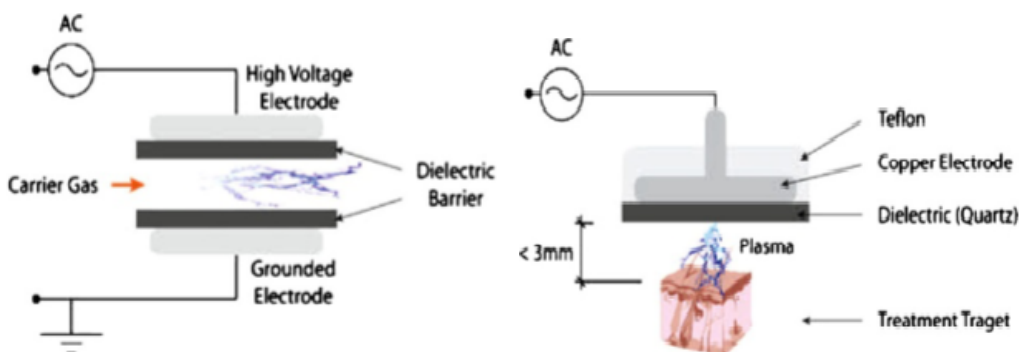


Figura 3.6: Figura que compara o funcionamento de um DBD com um FE-DBD. Adaptado de [27].

A tabela 3.1 apresenta de forma resumida a sequência cronológica da aplicação do plasma na medicina desde o século 18 até ao século 21.

Tabela 3.1: Tabela que ordena a utilização do plasma na medicina desde o século 18 com a sugestão do uso de descargas para tratamento médico até ao século 21 com a invenção dos dispositivos de produção de plasma contemporâneos.

Ordem Cronológica	
1743	Sugestão da manipulação da "effluvia" como tratamento médico, utilizando dispositivos de descarga elétrica.
1750	Primeiras experiências de utilização de eletricidade para uso médico.
1835	Guillaume Duchenne, contribui com uma série de experiências que demonstram a estimulação muscular utilizando eletricidade.
1857	Criação do dispositivo DBD.
1869-1875	Invenção e Desenvolvimento do tubo de Crookes.
1879	Identificação do plasma como matéria radiante.
1750	Estimativa de primeiras experiências de eletricidade para uso médico.
1890	Robert Newman reporta ter tratado casos de cancro no útero utilizando eletricidade nas cirurgias .
1897	Paul Odin mostra a capacidade de aniquilar pequenos tumores com "effluvia".
1928	Langmuir introduz o termo plasma devido à sua semelhança com o plasma do sangue.
1950	Utilização comum de <i>VW</i> .
1990	Aplicação do dispositivo DBD na medicina.
1992	Invenção do <i>primeiro jato de plasma</i> .
2001	Invenção da <i>plasma needle</i> .
2005	Invenção da <i>plasma pen</i> .

3.2 Utilização do CAP no tratamento do Cancro

Para perceber melhor esta secção é preciso relembrar da secção 2.3 que o plasma é composto por: partículas carregadas (eletrões e iões, resultado da ionização); partículas neutras; radicais; espécies altamente reativas (do inglês, *Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS)*); ozono; radiação UV, entre outros, sendo estes os principais protagonistas [30]. A interação destes constituintes, com micro-organismos pode originar os seguintes efeitos:

1. Efeito químico: o rompimento e oxidação da membrana celular devido à introdução de *RONS*;
2. Efeito físico: o aumento do potencial à superfície dos micro-organismos, pode levar à morte celular por disrupção eletrostática;
3. Efeito neutralizador: o plasma neutraliza a parede celular, a qual originalmente está negativamente carregada. Esta neutralização pode desencadear a morte celular;

4. Efeito dos fotões: radiação ultravioleta provoca danos na membrana celular podendo originar necrose celular;

Este tipo de efeitos ocorre tanto em células não-cancerígenas como em células cancerígenas. No entanto, existem alguns estudos que investigam estes efeitos ao pormenor. Keidar et al., demonstrou que o calor dissipado pelo plasma, pode causar um aumento da temperatura nas células sãs (não cancerígenas), mas que este aumento de temperatura (aumento de 2°C), não resultou em quaisquer danos observados [31].

Dos efeitos citados acima, acredita-se que aqueles que apresentam maior impacto são os efeitos neutralizadores e químicos [32]. Apesar disso, mais recentemente, Yan li et al., demonstra que a seletividade é independente dos RONS, utilizando *scavengers*, que são compostos que servem para inibir estas espécies e o mesmo comportamento seletivo é observado. Trazendo assim dúvida do acreditado anteriormente, e introduz a possibilidade do papel do efeito dos fotões na capacidade de seleção ter sido subestimado.

Na figura 3.7 é possível observar um histograma que demonstra o que foi dito anteriormente, a utilização dos *scavengers* não suprimiu a seletividade do plasma no tratamento [33].

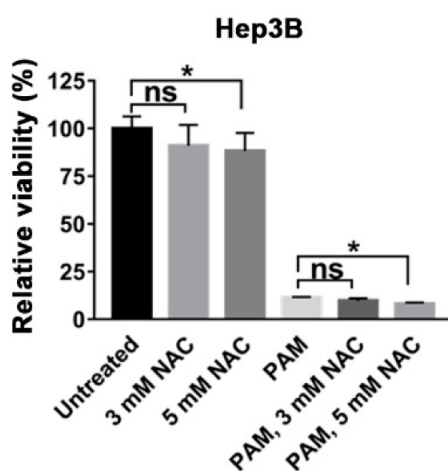


Figura 3.7: Histograma que demonstra, que mesmo quando utilizando agentes inibidores dos agentes reativos, continua a haver uma redução da viabilidade das espécies após interação com o plasma. Adaptado de [33]. Do lado esquerdo do gráfico estão representadas as células identificadas com marcadores cancerígenas, do lado direito, as mesmas células após tratamento com o CAP. Foram estudados três meios celulares com diferentes concentrações de NAC, o *scavenger* utilizado.

Apesar deste estudo, a possibilidade de que os RONS são o principal contribuinte na seletividade, continua a ser a hipótese mais aceite. Por essa razão é importante perceber o mecanismo pelo qual pensa-se que esta seleção esteja a ser feita.

A presença de espécies RONS numa célula é algo natural, resultado da respiração mitocondrial e essencial à sua defesa, sendo que, comunicam às células do sistema imunitário para combaterem invasões microbianas. Estas espécies, através da catálise

decompõem o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. No entanto, o oxigénio nesta concentração não apresenta perigo para a célula porque, naturalmente, compete com o **Superóxido dismutase (SOD)**, que trabalha como antioxidante.

No entanto, a exposição ao **CAP** aumenta significativamente o número das espécies **RONs**, aumentando a concentração de oxigénio nas células e tornando a competição com o **SOD** desproporcional, por outras palavras, a pressão oxidativa celular, ultrapassou o seu potencial antioxidante.

Este fenómeno resulta na ativação da cadeia apoptótica e consecutiva morte programada da célula (apoptose). No entanto, é importante frisar, que as células cancerígenas são mais sensíveis à acumulação de espécies **RONs** do que as células sãs, e por essa razão ao serem emitidas espécies reativas para um sistema com ambos os tipos de células, o número de células cancerígenas a morrer será superior; pelo que esta seletividade é o ponto base deste tipo de tratamento [16][34][35].

Esta diferença de vulnerabilidade entre as células cancerígenas e as células sãs é complexa e multifacetada.

Volotskova et al., publicou um artigo que revela a importância do ciclo celular quando comparando a sensibilidade entre células cancerígenas e células sãs ao **CAP**. A relevância deste artigo pode ser entendida da seguinte forma; (40-50)% das células cancerígenas encontram-se na fase-S de replicação do **DNA** e apenas (10-15)% das células sãs encontram-se nessa mesma fase-S de replicação do **DNA**, isto é explicado pela elevada taxa de proliferação das células cancerígenas quando comparando com uma célula sã. Tendo em conta que as células na fase-S são mais vulneráveis à acumulação de **RONs** e consequente apoptose, concluiu-se que a diferença em que as células cancerígenas e sãs encontram-se na fase-S, acaba por apresentar-se como um elemento de seleção [34].

Outra faceta desta seletividade pode ser atribuída à diferença de colesterol na membrana lipídica. As espécies reativas de oxigénio, (do inglês, *Reactive Oxygen Species (ROS)*) produzidos pelo **CAP** oxidam os lípidos da membrana celular e induzem a formação de poros com um tamanho médio de 15 Å. O aumento da concentração de **ROS** resulta numa maior quantidade de poros, e a quantidade de poros resulta num aumento de permeabilidade da membrana celular. Sendo que o colesterol tem um papel regulador na permeabilidade e fluidez da membrana celular e como tal a concentração desta substância é imperativa para, após a formação de poros, defender a célula de fatores externos. As células sãs têm uma maior concentração de colesterol do que as células cancerígenas, e por essa razão ficam menos vulneráveis à introdução de **RONs** [34].

Também é possível observar seletividade quando comparando a reação das células procarióticas com as eucarióticas. As células eucarióticas, devido à sua complexidade acrescida, também apresentam melhores mecanismos de defesa, e por essa razão necessitam de tempos de exposição ao **CAP** muito superiores para sofrerem o mesmo efeito relativamente ao tempo de exposição das células eucarióticas. Sendo essa a razão da eficácia do **CAP** na inibição bacteriana [36].

É devido a esta seletividade que, atualmente existem diversos estudos realizados no

sentido de tentar perceber a utilidade do plasma para terapia de células cancerígenas [34][37][38][39][40].

Outra questão que é de relevância é o modo pelo qual se usa o CAP para interagir com as células, existindo duas possíveis alternativas; a primeira consiste no contacto direto da pluma de plasma com as células e uma segunda, esta indireta, em que se procura utilizar o plasma para tratar o meio de cultura das células antes de as introduzir no mesmo, este método chama-se no inglês *Plasma Activated Liquid (PAL)*, *Plasma Conditioned Medium (PCM)* ou de *Plasma Activated Medium (PAM)*. De acordo com Labay et al. o método direto é uma técnica mais útil para tratamento de células e tumores localizados, enquanto que o método indireto é melhor para o tratamento de maiores áreas [39]. Isto foi observado utilizando placas de poços, de diferentes tamanhos [39]. Sendo que os para as placas de poços de menores dimensões a viabilidade celular era igual nos dois métodos, mas nas placas de maiores dimensões o método indireto apresentou melhores resultados ao longo do tempo[39].

É importante no entanto perceber como é que a descoberta do método indireto veio abrir novas possibilidades no ramo do plasma aplicado à medicina. A utilização do CAP de forma direta tem uma falha muito grande na sua aplicação. Para induzir a apoptose das células cancerígenas, o seu poder de penetração, está limitado aos 60 μm , por essa razão, caso este fosse o único método, tumores que estivessem localizados a profundidades superiores a essa não seriam possíveis de eliminar. Com a utilização do método indireto, é possível tratar o meio de cultura celular, obtendo-se uma solução com espécies reativas RONS, designada como solução ativada, que pode ser injetada e atingir zonas tumorais que não são acessíveis pelo método direto. Deste modo, as duas técnicas complementam-se, sendo o método direto mais útil para tumores superficiais, e o método indireto, para os restantes [40].

É relevante frisar que este tipo de tratamento não só é relevante em condições *in vitro*, mas que também apresenta seletividade *in vivo*. Este tipo de tratamento tem-se demonstrado eficaz na destruição ou diminuição de tumores malignos de diferentes tipos: melanoma; glioblastoma; pulmão; pâncreas, entre outros como pode se ver na tabela 3.2 [37][31][41][42].

Tabela 3.2: Apresenta um resumo dos principais trabalhos referenciados na literatura sobre a exposição de células cancerígenas ao CAP

Artigo	Fonte	Método	Aplicação	Resultado
M. Keidar et al. (2011) [43]	APPJ	direto	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	a) CAP elimina seletivamente as células cancerígenas sem danificar células sãs; (b) reduz significativamente o tamanho do tumor <i>in vivo</i> .
O. Volotskova et al. (2012) [41]	APPJ	direto	<i>in vitro</i>	A seletividade celular do CAP está relacionada com a probabilidade de uma célula se apresentar na fase-S.
R. Guerrero-Preston et al. (2014) [37]	APPJ	direto	<i>in vitro</i>	Há seleção celular por vias não apoptóticas.
S. Vermeylen et al. (2016) [44]	APPJ	direto e método indireto	<i>in vitro</i>	a) Tanto método indireto como o método direto são eficazes, sendo que o método indireto é mais viável para cirurgias b) a maioria das células não viáveis por via de tratamento sofreram necrose ou apoptose.
S. Mohades et al. (2016) [45]	APPJ	indireto	<i>in vitro</i>	a) método indireto mostra-se tão eficaz como o método direto a eliminar células cancerígenas; b) A eficácia do método indireto, é dependente da concentração de RONS; c) A eficácia do método indireto diminui com o tempo, esta pode ser atribuída à diminuição da quantidade de peróxido de hidrogénio, que ao fim de 8 horas reduz para 50% da quantidade inicial.
S.J. Kim et al. (2019) [46]	APPJ	direto	<i>in vitro</i>	Foi observado que as células cancerígenas são mais susceptíveis às RONS induzidas pelo plasma do que as células sãs, especialmente o óxido nítrico.
Lafontaine J et al. (2019) [47]	APPJ	direto	<i>in vitro</i>	a) Foi demonstrado que células sensíveis a radioterapia também são sensíveis a CAP; b) Em algumas células mamárias foi observada sinergia quando utilizando CAP juntamente com Radioterapia.

3.2. UTILIZAÇÃO DO CAP NO TRATAMENTO DO CANCRO

Artigo	Fonte	Método	Aplicação	Resultado
Biscop E et al. (2019) [48]	APPJ	direto e indireto	<i>in vitro</i>	Comparando método indireto com o método direto revelou-se que o método direto é menos dependente dos parâmetros de teste (tipo de célula, meio de cultura, tipo de cancro).
Liedtke KR et al. (2020) [49]	APPJ	indireto	<i>in vitro</i> e <i>in ovo</i>	É demonstrado que o CAP em conjugação com quimioterapia é melhor do que qualquer um dos tratamentos quando usados individualmente.
Park S et al. (2020) [50]	DBD	direto	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Foi observada a capacidade do CAP de quebrar a tolerância das células cancerígenas a químicos desenvolvidos para o tratamento de cancro, a sensibilidade restaurada ao químico testado (Paclitaxel) foi de 70%.
Akter M et al. (2020) [36]	APPJ	direto e indireto	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	É demonstrada a citotoxicidade dos compostos RONS na paragem de ciclo celular e na apoptose celular.
Vaquero J et al. (2020) [51]	APPJ	indireto	<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	a) O tratamento da cultura celular com o tratamento indireto resultou na morte de células cancerígenas. b) A nível molecular o CAP induziu danos no DNA, num aumento da fosforilação e ativação dos reguladores de ciclo celulares, levando à paragem de ciclo celular e na apoptose celular.
Griseti E et al. (2020) [52]	APPJ	indireto	<i>in vitro</i>	a) A citotoxicidade do método indireto está diretamente relacionada com a quantidade de peróxido de hidrogénio e nitrato b) A composição química do meio de cultura ativado por plasma é relevante para a rapidez e profundidade do tratamento.
Chung TH et al. (2020) [53]	APPJ	indireto	<i>in vitro</i>	Conjugar o uso de CAP com eletroquimioterapia pode ser uma boa alternativa à eletroquimioterapia. Obtendo resultados semelhantes com menos efeitos secundários.

Os resultados descritos na literatura permitem concluir que o CAP pode ser uma possível abordagem no tratamento do cancro. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o CAP é capaz de eliminar células cancerígenas sem prejudicar as células saudáveis. Alguns artigos também destacam a seletividade celular do CAP, o que significa que algumas células são mais suscetíveis aos efeitos do plasma do que outras. Alguns estudos também destacam a eficácia do CAP em conjunto com quimioterapia, e sua capacidade de quebrar a tolerância

das células cancerígenas aos tratamentos químicos. A nível molecular, o CAP é capaz de causar danos no DNA e ativar reguladores do ciclo celular, levando à paragem de ciclo celular e apoptose celular [54].

Em geral, os resultados dos estudos apontam para a potencial eficácia do CAP no tratamento do cancro, mas ainda são necessários mais estudos para compreender melhor o seu mecanismo de ação e o seu potencial como uma abordagem terapêutica viável. Os possíveis danos causados no DNA são a razão pela qual este estudo está a ser realizado, de modo a determinar este efeito, e a sua possível importância no tratamento de células cancerígenas e a sua segurança relativamente às células sãs.

3.3 Estudos relacionados com a interação entre o CAP e DNA

Para perceber o potencial impacto do dano causado pelo CAP no DNA na seletividade de tratamento é importante estudar esta interação de modo a perceber os mecanismos por detrás da mesma, para isso é importante salientar alguns estudos, que são apresentados na tabela 3.3:

Tabela 3.3: Apresenta um resumo dos principais trabalhos referenciados na literatura que analisam a exposição do DNA ao CAP

Artigo	Resultado
S. Ptasińska, et al. (2010) [55]	Foi determinado o dano induzido no DNA pelas espécies RONS, átomos excitados, partículas carregadas, eletrões e Radiação UV. Os resultados demonstram uma pequena fragmentação do DNA (abaixo de 10%). Estimam que os danos causados ao DNA podem ser distribuídos por: Radiação UV 10%; iões positivos 8%; eletrões e iões negativos 20%; espécies reativas 62%.
Morales-Ramírez P., et al. (2013) [56]	A distância da ponta do APPJ ao DNA é inversamente proporcional à sua capacidade destrutiva. São comparados os resultados da eletroforese entre distâncias de 0,1 cm e 0,5 cm, onde o primeiro caso inequivocamente apresenta resultados mais destrutivos. O número de exposições aumenta a desfragmentação do DNA.
Han, X., et al. (2014) [57]	Os danos no DNA aumentam com uma diminuição da distância entre o APPJ e a amostra de DNA, e o aumento do tempo de irradiação.
C. Yaopromsiri, et al. (2015) [58]	O CAP suscitou danos e quebrou as fitas de DNA, por ação das partículas carregadas e dos RONS.

3.3. ESTUDOS RELACIONADOS COM A INTERAÇÃO ENTRE O CAP E DNA

Artigo	Resultado
Kaushik N. et al. (2015) [59]	O plasma diminui a viabilidade das células assim como os valores de ATP intracelular através de um aumento da população apoptótica via ativação do mecanismo caspase. A utilização de <i>scavengers</i> de ROS atenua a atividade do plasma nas células. Radicais obtidos através de sistemas químicos aumentam a morte das células cancerígenas, assim como de células sãs, sendo que não é observada a seletividade celular apresentada pelos radicais obtidos através do plasma. Foi observado dano no DNA celular, após a interação com o CAP através da utilização de marcadores H2AX.
Szili, Endre J. et al (2017) [60]	O CAP induz quebras nas fitas de DNA tanto no modelo de tecido como no modelo celular, sem ser observada a rutura da membrana no último caso. No caso do modelo de tecido o tratamento de plasma demora mais tempo, e apenas foi observado dano no DNA superficial.
Kurita H. D., et al. (2020) [61]	A indução de danos no DNA foi induzida através de RONS formados pela interação do CAP. Este dano é medido através da quebra das fitas de DNA ou da modificação química das bases do DNA.
Braný D., et al. (2021) [62]	Apesar de haver muitos estudos que parecem indicar que o CAP causa danos no DNA esta ideia ainda é debatida sendo que não se sabe se o dano no DNA é causado diretamente pela interação do CAP ou apenas como consequência da apoptose da célula.
Gaur, N., et al (2021) [63]	É apresentada uma correlação entre a produção de radicais OH pelo CAP e os danos causados nas fitas de DNA. Os resultados indicam também que o grau de dano nas fitas de DNA aumentou quando a pluma de plasma entrou em contacto com a solução de DNA. A utilização de <i>scavengers</i> de ROS permitiu uma diminuição do dano observado no DNA.
Bethany L., et al (2021) [64]	O espectro de mutação induzida pela utilização do CAP parece ter um padrão mais semelhante ao padrão de amostras irradiadas com Raios-X do que tratamentos com UV. Deste modo a produção de RONS é o principal causador de danos no DNA.

Os estudos apresentados mostram que o plasma pode causar danos no DNA devido à presença de espécies reativas de ROS, partículas carregadas e radicais livres. A proximidade do plasma com a amostra de DNA e o tempo de exposição também podem afetar a quantidade de dano no DNA. Dos estudos descritos na tabela 3.3 é possível extrair uma conclusão importante para o estudo realizado nesta tese. De acordo com a literatura, parece que os RONS induzem de facto dano nas fitas de DNA. A grande questão é no entanto se o dano ao DNA é causado diretamente pela interação com CAP ou posteriormente como consequência da apoptose da célula. Com esta dissertação pretende-se complementar o conhecimento sobre o fenómeno.

MATERIAIS E TÉCNICAS

Neste capítulo são descritos os materiais e as técnicas utilizados nos estudos realizados. Este capítulo é dividido em 3 etapas: A caracterização da pluma do plasma por espectroscopia ótica de emissão; a preparação de soluções e o estudo da interação do jato de plasma com cada uma das soluções. As amostras utilizadas foram: soluções de DNA, emulsões de lipossomas e emulsões de DNA encapsulado por lipossomas.

Neste trabalho o dispositivo utilizado é um jato de plasma frio atmosférico, acoplado a uma fonte de alta tensão, anteriormente desenvolvida, na sua totalidade no laboratório da FCT, Portugal [65].

4.1 Princípio de funcionamento da fonte

Tal como o *jet*, a fonte de tensão utilizada também foi desenvolvida no laboratório de plasmas e aplicações da FCT [65]. Esta fonte de tensão contínua DC, é variável dos 0 aos 20 kV, e com corrente máxima aproximada de 20 mA [65].

Citando Érica Pinto et al., esta fonte é constituída por [66]:

- **Fonte de tensão DC** - Alimentada pela tensão da rede e dimensionada de modo a produzir uma tensão contínua variável de 20 kV;
- **Circuito oscilador** - Circuito condutor do transformador de linhas(também conhecido como ZVS, Zero-Voltage Switching);
- **Transformador de linhas (flyback)** - Transformador inversor de razão 1:1000 destinado a elevar a tensão até cerca e 20 kV;
- **Retificador** - Acoplado ao transformador de linhas, é responsável pela conversão da tensão alternada (AC), proveniente do transformador em tensão contínua;

4.2 Descrição do Dispositivo

Como é possível observar na figura 4.1 este dispositivo segue o princípio de funcionamento indicado na secção 4.3, no sentido em que uma diferença de potencial entre os elétrodos

suficientemente grande (de acordo com a lei de Paschen, figura 4.1), neste caso de 8 kV permite a ruptura da barreira dielétrica do argônio. A diferença de potencial, desencadeia uma ionização em avalanche, que quando complementada com um fluxo unidirecional do gás, (neste caso argônio) resulta numa pluma de plasma. Adicionalmente é possível verificar elementos como a craveira digital, o extensor e o posicionador vertical que procuram ajustar o posicionamento da sonda de forma precisa, nomeadamente a sua distância ao alvo [38].

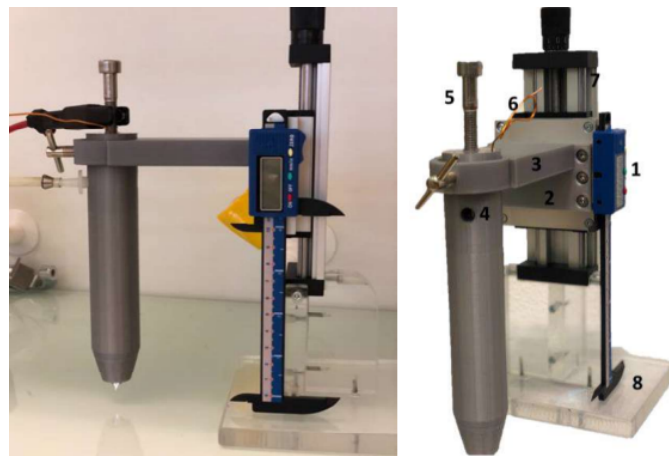


Figura 4.1: Fotografias da caneta de CAP, onde: 1) Craveira digital; 2) Placa de alumínio; 3) Extensor; 4) Entrada de argônio; 5) Eléctrodo interno; 6) Eléctrodo externo; 7) Posicionador vertical; 8) Suporte de acrílico. Adaptado de [65].

Embora o dispositivo se encontrasse em boas condições foi necessário fazer uma optimização à caixa que envolve o divisor de tensão, isto porque, a caixa anterior apresentava alguns problemas de isolamento eléctrico. Quando considerando o facto de que o trabalho experimental é realizado a altas tensões, foi importante criar uma nova caixa, com melhor isolamento eléctrico e aberturas estrategicamente localizadas para evitar sobreaquecimento.

4.3 Princípio de produção do jato de plasma CAP

Como já introduzido na secção 3.1.3, existem dois diferentes tipos principais de dispositivos que são bastante importantes no tratamento de bioestruturas através da utilização do CAP, nomeadamente o DBD e o APPJ, sendo que DBD foi o primeiro a ser utilizado com este intuito. Porém, os APPJ apresentam no entanto, grandes vantagens quando comparando com DBD, nomeadamente a sua alta portabilidade e direccionalidade e, por essa razão, é também um dispositivo mais adequado para tratamentos localizados.

A caneta que produz o jato de plasma, como é possível observar na figura 4.2, é composta por dois eléctrodos, e no seu interior fluí um gás neutro, normalmente azoto, hélio ou argônio [67]. O gás utilizado neste trabalho foi o argônio.

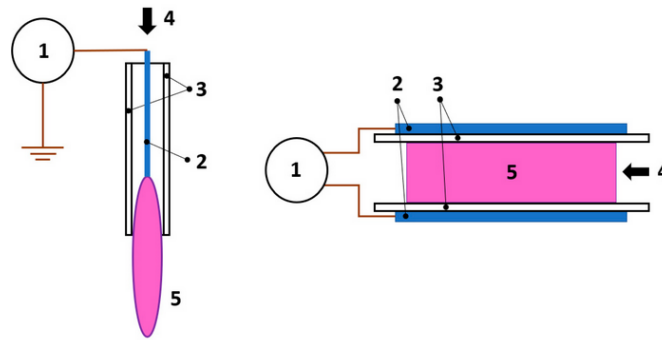


Figura 4.2: Nesta figura são ilustrados tanto o DBD, apresentado à direita como o APPJ, à esquerda. A similaridade das estruturas é evidenciada pela caracterização das mesmas, da seguinte forma: **1)** Fonte de alimentação; **2)** Eléttodos; **3)** Barreira dielétrica; **4)** Fluxo de gás; **5)** Plasma. Adaptado de [68].

A escolha do árgon para a produção de plasma segue um conjunto de requerimentos, nomeadamente: **a)** produz plasma facilmente, a baixos valores de tensão de disrupção, como é possível verificar na figura 4.3; **b)** ao contrário do azoto, é um gás nobre e como tal estável; **c)** possui elevada condutividade térmica relativamente a outros gases, permitindo uma maior dissipação de calor; **d)** baixo custo em comparação com o hélio ou o néon.

Embora o árgon não seja o melhor em todas as categorias anteriormente enumeradas, juntamente com o hélio, é o gás que apresenta melhor desempenho quando todas as categorias são consideradas em conjunto.

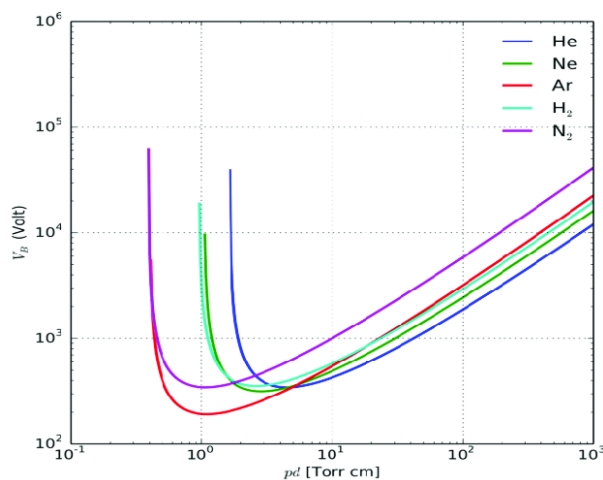


Figura 4.3: Curvas de Paschen que ilustram a lei de Paschen. Adaptado de [69].

A diferença de potencial mínima para a ionização do gás chama-se tensão de disrupção e varia de acordo com a constante do gás, assim como a pressão do gás e a distância entre eletrodos. Este fenómeno é descrito pela lei de Paschen que pode ser ilustrado pela curva de Paschen na figura 4.3 de modo a melhor compreender qual a tensão mínima para a formação do plasma tendo em conta as variáveis anteriormente descritas.

$$V_m = \frac{C_1 \cdot (p \cdot d)}{C_2 + \ln(p \cdot d)} \quad (4.1)$$

A equação 4.1 exprime a Lei de Paschen, sendo C_1 e C_2 , constantes do gás, p a pressão do gás e d a distância entre elétrodos. Assim, ao aplicar uma tensão igual ou superior à tensão de disrupção, ocorre ionização em avalanche dos átomos do gás, tornando-se assim o gás em questão num plasma. O tamanho da pluma de plasma é resultado da manipulação do fluxo de gás que por ela flui. O aumento do fluxo de gás, resulta numa maior pluma de plasma [65].

Como explicado anteriormente, o plasma contém uma grande quantidade de cargas livres, como eletrões e iões, que o tornam num excelente condutor e suscetível a campos eletromagnéticos. Para além disso, geram-se fotões desde o espectro IV (radiação térmica) até ao UV, e em contacto com o ar formam-se ainda espécies reativas de oxigénio e de azoto (ROS e *Reactive Nitrogen Species (RNS)* respetivamente). Estas espécies reativas em conjunto com a radiação UV emitida entram em contacto com o DNA e causam danos na sua estrutura, podendo levar à ativação da cadeia apoptótica (e consequente apoptose das células) [65].

4.4 Caracterização da Pluma do Plasma por Espetroscopia Ótica de Emissão

Neste método de monitorização o objetivo é captar a luz emitida pelos átomos neutros e/ou ionizados, radicais ou moléculas presentes no plasma. A luz emitida tem um comprimento de onda definido e é a sua medição que servirá para a caracterização das espécies que o compõem. A radiação emitida é coletada através de uma fibra ótica FC-UV600-2 da Avantes, e transportada até um espectrómetro (SPEC STD, Sarspec) [65][38].

Ao analisar o espetro é possível adquirir a informação relevante anteriormente referida, nomeadamente o comprimento de onda de cada espécie assim como o número contagens de cada espécie. Na figura 4.4, é possível verificar a caracterização do plasma gerado pelo dispositivo utilizado, esta caracterização foi realizada por Sara Pereira et al., e demonstra os picos medidos no plasma utilizado [65].

É importante salientar que o primeiro intervalo, dos 300 aos 400 nm pode ser dividido em dois tipos de radiação, UV-A (315-400 nm) e UV-B (280-315 nm), sendo estes dois tipos de radiação UV os menos energéticos, e consequentemente menos destrutivos. Os agentes reativos do argon por outro lado pertencem à gama da radiação visível e infravermelha, entre os 700 e os 850 nm, não apresentando um papel destrutivo relevante para as ligações da molécula de DNA [65].

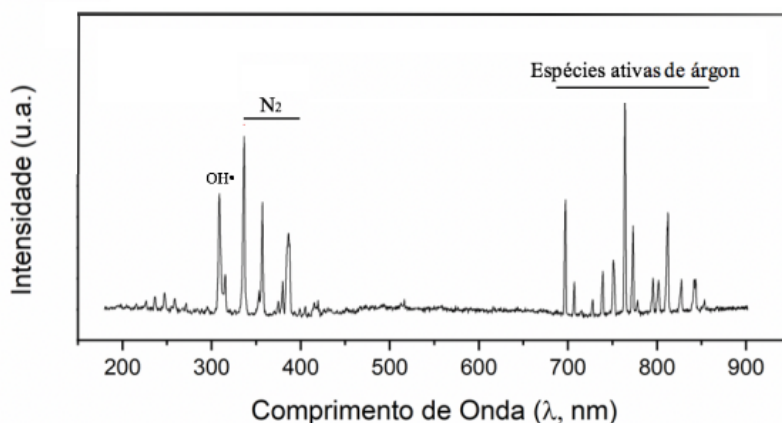


Figura 4.4: Espectro do jato de plasma para o eletrodo de fio de cobre. Adaptado de [65].

4.5 Preparação das Soluções de DNA

Para a preparação de soluções de DNA primeiro foi escolhida a espécie *Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus, D1501-500 MG* em fibras de tipo I da Sigma-Aldrich. De seguida o DNA foi extraído do frasco utilizando duas espátulas anteriormente esterilizadas de modo a conseguir separar as fibras de DNA até obter a massa de DNA pretendida de 1,25 mg. Por último o DNA foi dissolvido em 25 mL de água ultra pura para obter uma concentração de 50 µg/mL num copo de precipitação. Este copo foi colocado num agitador durante 24 horas, devidamente selado utilizando parafilme e papel de alumínio em todo o seu redor para evitar interações com a luz ambiente [70].

4.6 Preparação de Emulsões de Lipossomas

Para a preparação de lipossomas é importante primeiro escolher o tipo de lípidos a utilizar. Assim, devido à sua estabilidade duas espécies foram inicialmente propostas: O 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) e o 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DPPG) da Avanti.

O DNA é uma molécula negativamente carregada devido à presença de grupos fosfato na sua estrutura que possuem carga negativa. Por essa razão é importante que os lípidos escolhidos não possuam carga negativa, de modo a que as interações eletrostáticas possam ocorrer com o intuito de criar ligações entre o DNA e o lipossoma [71].

O DPPC é um fosfolípido zwitteriónico, ou seja, um composto químico eletricamente neutro, mas que tem cargas positivas e negativas na sua cabeça. A carga positiva deve-se à presença de um grupo colina, enquanto a carga negativa deve-se à presença de um grupo fosfato. Esta neutralidade permite formar estruturas de bicamada estáveis e rígidas, o que é vantajoso para a estabilidade do DNA encapsulado [72].

O DPPG tende a formar estruturas não lamelares, como fases hexagonais invertidas, em vez de estruturas de bicamada, o que pode afetar a estabilidade e as propriedades dos

lipossomas resultantes. Outro problema é o facto do DPPG, ser um lípido negativamente carregado e por essa razão é uma escolha pior em termos de interações eletrostáticas com o DNA [73].

Pelas razões acima descritas, o DPPC foi a escolha para o encapsulamento de moléculas de DNA. Para manter uma boa proporção (3:1), para encapsulamento do DNA, tanto para as emulsões de lipossomas como para as emulsões de DNA encapsulado foi mantida uma concentração de 150 µg/mL.

Os lipossomas podem ser preparados de diversos métodos e cada método resulta em lipossomas de diferentes características. O método escolhido foi o de hidratação de filmes finos. Neste método os lípidos são dissolvidos num solvente orgânico, nesta preparação o solvente é uma mistura de clorofórmio e metanol, com o clorofórmio a 80% de concentração. Após esta dissolução segue-se a evaporação do solvente orgânico, utilizando uma pistola de azoto comprimido e de seguida deixando os filmes a secar, em tubos de ensaio no interior de um excicador durante 24 horas. O resultado desta evaporação é a formação de filmes finos nas paredes do tubo de ensaio. No entanto para conseguir quebrar as ligações dos lípidos é necessário hidratar os filmes utilizando água ultra pura e posteriormente submetê-los a um dispositivo de ultrassons durante um total de 30 minutos a 50°C de modo a estar acima da temperatura de mudança de fase dos lípidos. A agitação provocada por este dispositivo não só provoca a quebra de ligações dos filmes como também produz vesículas. A utilização de um dispositivo de ultra sons ao invés de um agitador regular deve-se à necessidade de obter vesículas de pequenas dimensões [70].

4.7 Preparação de Emulsões de DNA Encapsulado

Para este tipo de emulsões, as soluções de DNA foram dissolvidas com os filmes de lípidos no processo de hidratação, ou seja, antes de serem submetidos à agitação no dispositivo de ultra sons. É importante realçar que para as 3 soluções/emulsões utilizadas, a concentração dos lipossomas e do DNA foram mantidas constantes como é possível verificar na tabela 4.1. Isto é, o DNA a 50% de concentração e os lipossomas a 25%, sendo a restante percentagem de água ultra pura, esta variável em cada solução.

Tabela 4.1: Na tabela são apresentados os três tipos de soluções utilizadas e os respetivos volumes de cada substância, assim como a sua proporção em percentagem em relação à solução produzida.

Tipo de Solução/Emulsão	DNA (mL)	Lipossomas (mL)	H2O (mL)
DNA	2,5 (50%)		2,5 (50%)
Lipossomas		1,25 (25%)	3,75 (75%)
DNA Encapsulado	2,5 (50%)	1,25 (25%)	1,25 (25%)

4.8 Descrição do tipo de tratamento realizado em cada ensaio

As soluções foram colocadas em frascos, que foram protegidos com folha de alumínio e parafilme para prevenir o derrame e o dano por ação luminosa e refrigeradas no frigorífico de modo a manter as soluções em boas condições.

Utilizando uma micropipeta de ponta descartável foi pipetado um volume de 3 mL para uma placa de 12 poços. Este volume foi escolhido propositadamente para prevenir erros de derrame ao pipetar as soluções para as cuvetes que são utilizadas no espectrofotómetro, uma vez que estas têm um volume total de 2mL. Este processo encontra-se esquematizado na figura 4.5:

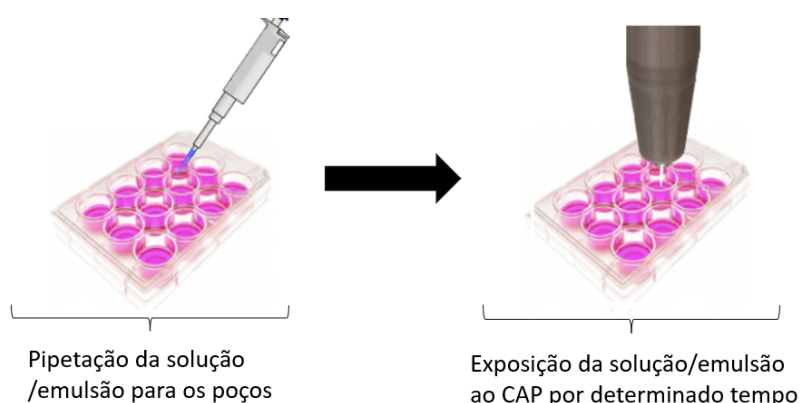


Figura 4.5: Processo de tratamento das soluções. Utilizando uma micropipeta, as soluções/emulsões são transportadas dos frascos onde são conservadas, para os poços com igual volume de 3mL, seguidamente as soluções/emulsões são expostas ao CAP por um determinado período de tempo. Adaptado de [66]

No processo esquematizado pela figura 4.5 foi utilizada uma micropipeta mecânica monocanal, BioPette Plus, da Labnet com capacidade de sucção de 1000 μ l e com incerteza de ± 6 μ l.

O número de poços utilizados e a distribuição das soluções pelos mesmos, variou com o propósito de cada tratamento. Os tratamentos realizados ao longo do trabalho, juntamente com a descrição de cada um e o seu objetivo encontram-se ordenados na tabela 4.2:

Tabela 4.2: Na tabela são apresentados e descritos, os quatro tipos de ensaio realizados, com os respetivos objetivos.

Tratamento	Descrição do Tratamento	Objetivo
Caso 1 : Estudo da absorvância da solução tratada com diferentes tempos de exposição ao CAP	Num total de 10 poços, 3 foram preenchidos com soluções controlo, e os restantes 7 poços com soluções tratadas. Tempos de exposição ao jato de plasma, em minutos: 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 16.	Tentar perceber se o tempo de exposição ao CAP tem impacto na integridade das soluções tratadas.

4.8. DESCRIÇÃO DO TIPO DE TRATAMENTO REALIZADO EM CADA ENSAIO

<p>Caso 2 : Estudo da absorvância da solução tratada ao longo de 72 horas após exposição ao CAP</p>	<p>Num total de 6 poços, 3 foram preenchidos com soluções de DNA controlo e 3 com soluções de DNA tratado com o CAP. Cada solução tratada, foi exposta ao CAP durante 16 minutos.</p>	<p>Tentar perceber se o tempo após exposição ao CAP tem impacto na integridade das soluções tratadas.</p>
<p>Caso 3 : Estudo da absorvância da solução controlo variando a distância ao CAP</p>	<p>Num total de 12 poços, 3 foram preenchidos com soluções de DNA tratadas com o CAP, sendo as restantes soluções controlo a distâncias diferentes do CAP. Cada solução tratada, foi exposta ao CAP durante 16 minutos.</p>	<p>Tentar perceber se a distância ao CAP tem impacto na integridade das soluções controlo.</p>
<p>Caso 4 : Estudo da absorvância da água após exposição ao CAP.</p>	<p>Num total de 6 poços, 3 foram preenchidos com água não tratada e os restantes 3 com água tratada pelo CAP. Cada solução tratada, foi exposta ao CAP durante 16 minutos.</p>	<p>Tentar perceber o impacto da ativação de espécies reativas na água nos estudos realizados.</p>

É importante referir que a configuração do caso 2 descrito na tabela 4.2, foi repetida para as emulsões de lipossomas e DNA encapsulado por lipossomas para o tempo de exposição de 2 minutos. Tendo em consideração que neste tratamento a solução/emulsão teve de ser conservada durante a noite algumas medidas tiveram de ser tomadas; após a leitura da última cuvete, estas são revestidas e colocadas no frigorífico para manter a sua integridade, e revestidas com parafilme e papel de alumínio para prevenir derrame e irradiação luminosa. No dia seguinte cada cuvete é lida novamente no espectrofotómetro e novamente preservada no frigorífico. Este processo é repetido 3 vezes de modo a perfazer as 72 horas do estudo.

Detalhando o caso 3 referido na tabela 4.2, nesta configuração 3 soluções controlo encontravam-se na placa de poços durante o tratamento de soluções, 3 soluções controlo encontravam-se numa placa exposta ao ar livre, longe do jato de plasma durante o tratamento e as restantes 3 soluções de controlo apenas foram retiradas do frasco aquando o momento de leitura no espectrofotómetro.

Finalmente, é importante salientar que para todos os casos descritos na tabela 4.2, foram mantidas as mesmas condições, nomeadamente: para todos os estudos foi empregue o método direto, a uma distância entre a ponta do jato de plasma e a amostra de 2 cm, com um fluxo constante de argon de 3 **standard liter per minute (slm)** a uma tensão de 8 kV entre os elétrodos do dispositivo.

Para caracterizar o efeito de exposição CAP em cada uma das soluções/emulsões anteriormente referidas foram medidos os espectros de absorvância entre os 190 e os 900 nm utilizando o espectrofotómetro Shimadzu UV-2101PC para medir .

4.9 Funcionamento do espectrofotômetro

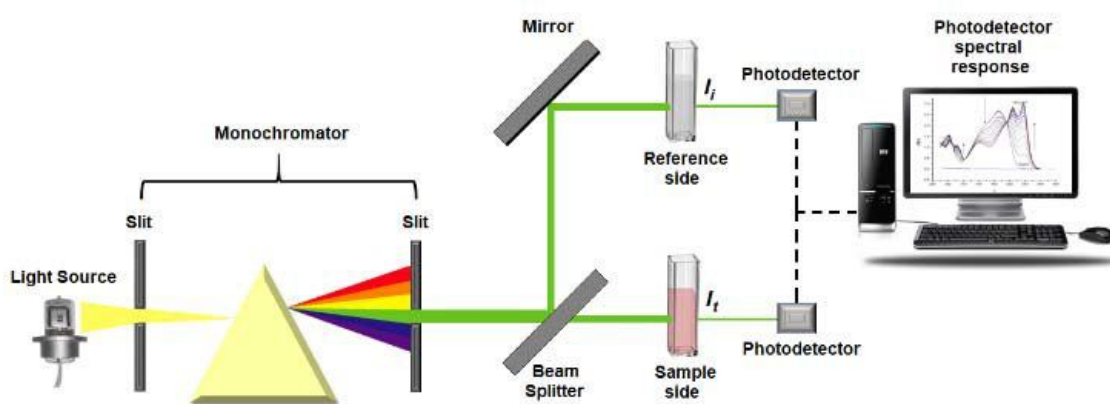


Figura 4.6: Diagrama de funcionamento de um espectrofotômetro de duplo feixe. Adaptado de [74]

Como pode ser observado na figura 4.6, o funcionamento básico de um espectrofotômetro de duplo feixe, consiste em irradiar uma amostra e uma referência, medir a intensidade da radiação transmitida através de ambas e compará-las.

Após ser irradiada pelas lâmpadas, a luz passa por uma fenda inicial para onde é colimada, de seguida, a luz atravessa um monocromador, que seleciona comprimentos de onda específicos e de seguida o feixe passa por uma fenda, desta vez com o propósito de filtrar outros comprimentos de onda. A luz monocromática é depois direcionada para um *beam splitter* que divide o feixe em dois. Um dos feixes é direcionado para a amostra a estudar e outro para uma amostra de referência [74]. Ao atravessar a amostra de referência são contados os fótons que chegaram ao foto-detector, similarmente, ao atravessar a cuvete da amostra são coletados, por um segundo foto-detector os fótons que atravessaram a amostra. Realizando a diferença entre o número de fótons incidentes na amostra de referência e o número de fótons incidentes na amostra, é possível obter o número de fótons absorvidos pela amostra. Tendo em consideração que estas medições são feitas por comprimento de onda, é possível obter informação detalhada sobre a absorvância por comprimento de onda da amostra, desse modo conseguindo distinguir diferentes compostos na mesma [74].

O espectrofotômetro utilizado foi um Shimadzu UV-2101PC, que permite fazer medições na gama dos 200 nm aos 900 nm. A absorvância de radiação é proporcional à concentração da substância absorvente na amostra. Desse modo, quanto maior a absorção da substância, maior a sua concentração na amostra. Neste trabalho este conceito é utilizado para tentar observar alterações na concentração tanto do DNA como dos lipossomas. A substância é identificada pelo comprimento de onda da radiação absorvida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os espectros de absorvância obtidos, nomeadamente os resultados correspondentes aos efeitos de exposição ao CAP para soluções de DNA, emulsões de lípidos e emulsões de DNA encapsulado em lípidos.

5.1 Estudo preliminar do impacto do CAP na solução de DNA

Foram utilizados 6 poços de uma placa: 3 para as soluções de DNA de controlo e 3 para soluções de DNA expostas ao CAP durante 16 minutos. Os espectros de absorvância observados na figura 5.1, foram medidos no espectrofotómetro e correspondem à solução de DNA de cada tipo de amostra, uma vez que todas as soluções do mesmo grupo apresentavam espectros de absorvância semelhantes.

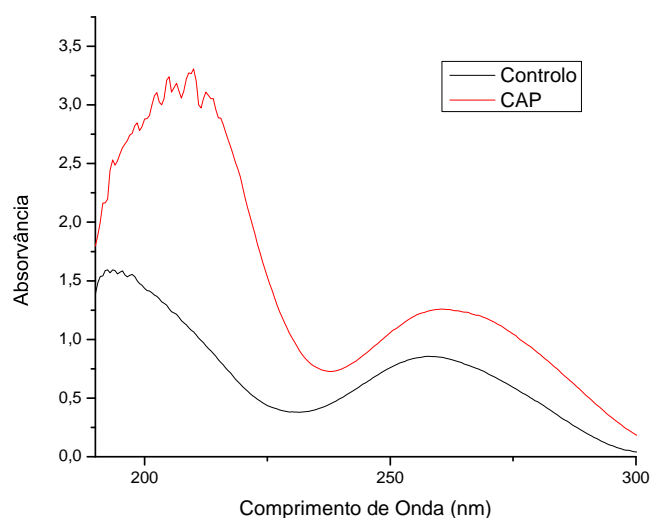


Figura 5.1: Comparação de dois espectros de absorvância de soluções de DNA, a preto soluções de DNA controlo e a vermelho soluções de DNA exposto à pluma de plasma durante 16 minutos.

5.2 Estudo da absorvância da solução tratada com diferentes tempos de exposição ao CAP

Para tentar perceber o impacto do CAP na molécula de DNA, os espectros de absorvância das soluções foram medidos com diferentes tempos de exposição ao CAP. Este estudo tem como interesse não só perceber se a alteração do tempo de exposição é um fator relevante, mas também perceber como é que o tempo de exposição faz a absorvância variar, ou seja qual o tipo de função de dependência.

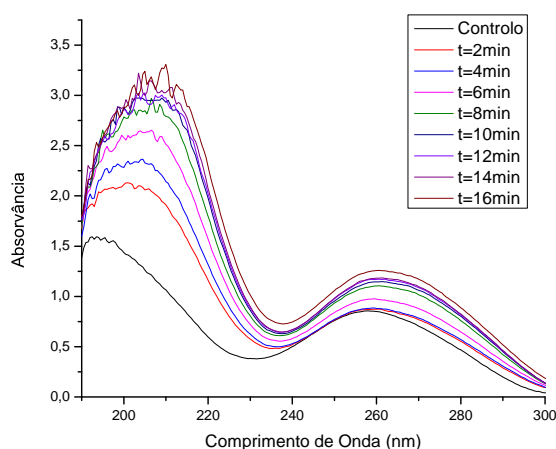


Figura 5.2: Espectro de absorvância das soluções de DNA em função do comprimento de onda, para diferentes tempos de exposição.

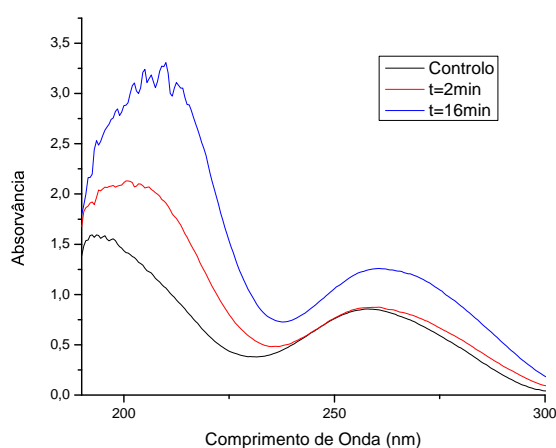


Figura 5.3: Espectro de absorvância das soluções de DNA em função do comprimento de onda, para 2 e 16 minutos de exposição, incluindo o espectro de absorvância da solução controlo de DNA, para comparação.

5.2. ESTUDO DA ABSORVÂNCIA DA SOLUÇÃO TRATADA COM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO CAP

Nos gráficos 5.2 e 5.3, é possível ler a influência do tempo de exposição ao CAP para a curva do espectro de absorvância da solução de DNA. No gráfico 5.2, são incluídos todos os ensaios realizados para os tempos de exposição CAP de 2,4,6,8,10,12,14 e 16 minutos.

No gráfico 5.3 apenas estão apresentados, os três casos mais "extremos", para melhor visualização e comparação, a solução controlo, a solução com menor tempo de exposição e a solução com maior tempo de exposição.

Tanto na figura 5.2 como na figura 5.3, é possível observar, tanto um aumento de absorvância, como um deslocamento do pico que se encontra na banda entre os 200 e 220 nm. O aumento da absorvância nesta zona parece indicar que, quanto maior o tempo de exposição maior o número de RONS produzidos e dissolvidos com a solução de DNA [75]. Existe também um aumento entre os 240 nm e os 300 nm, assim como deslocamento dos picos desta região.

5.2.1 Análise da área dos picos em relação ao tempo de exposição ao CAP

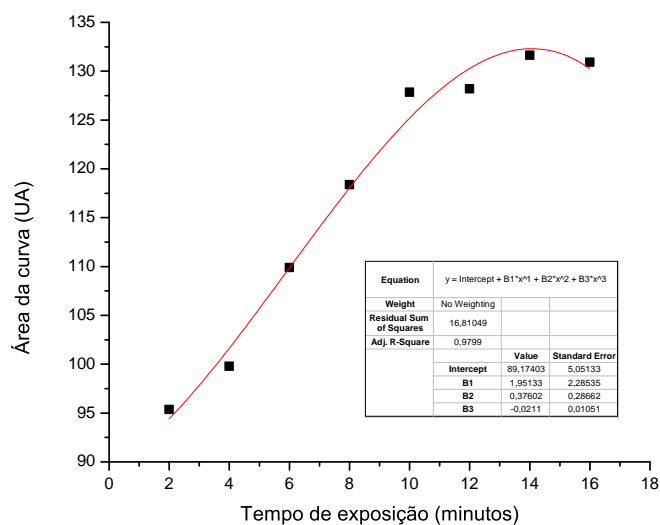


Figura 5.4: Área do pico a 200 nanómetros em relação ao tempo de exposição ao CAP.

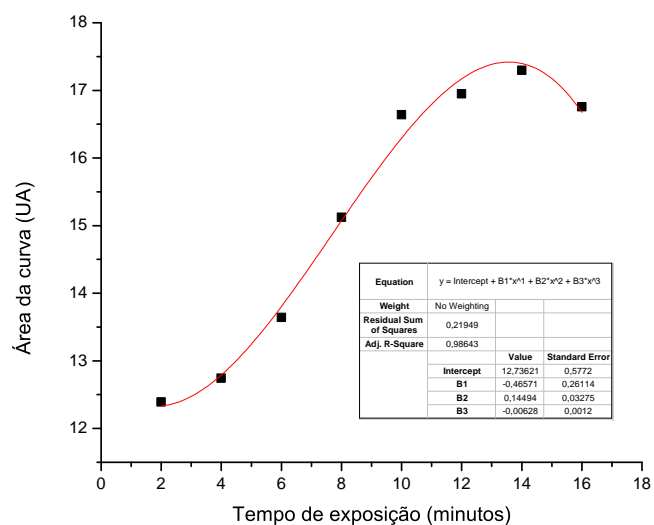


Figura 5.5: Área do pico a 250 nanómetros em relação ao tempo de exposição ao CAP.

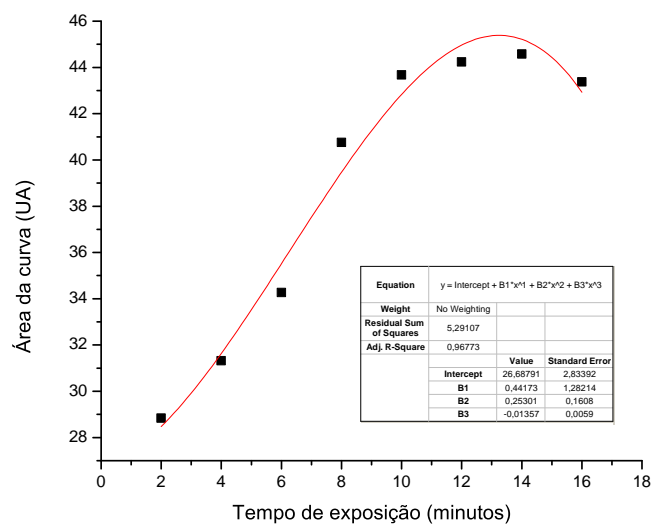


Figura 5.6: Área do pico a 270 nanómetros em relação ao tempo de exposição ao CAP.

5.2. ESTUDO DA ABSORVÂNCIA DA SOLUÇÃO TRATADA COM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO AO CAP

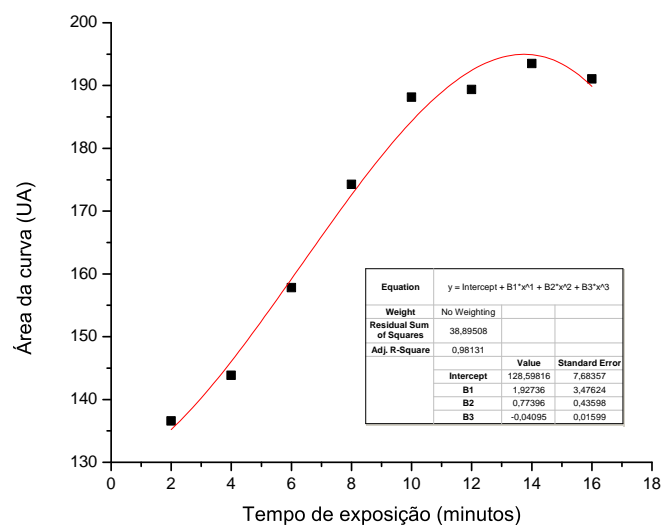


Figura 5.7: Área total dos picos em relação ao tempo de exposição ao CAP.

Na figuras figuras, 5.4, 5.5 e 5.6 é possível verificar a influência que o tempo de exposição ao CAP tem na área de cada pico. Cada um dos picos foi inicialmente obtido fazendo um *fitting* de três picos no espectro da figura 5.1 com o objetivo de tentar perceber se teria havido uma recombinação das moléculas de DNA, no sentido de averiguar se a concentração das bases azotadas foi alterada após possível quebra de ligações da molécula de DNA por parte do CAP.

No entanto, a existir de facto recombinação das bases azotadas do DNA, tal seria observável através da diminuição da área de um dos picos, e conseqüente aumento do restante, o problema aparece com a introdução das espécies RONS, ao interagir com o CAP, estas misturam-se com o meio aumentando a área dos três picos como é possível observar nas figuras 5.4, 5.5 e 5.6 e 5.7. Um dado que corrobora a introdução das espécies RONS, é a figura 5.7 que mostra o aumento da área total dos picos.

5.2.2 Análise do deslocamento dos picos em relação ao tempo de exposição ao CAP

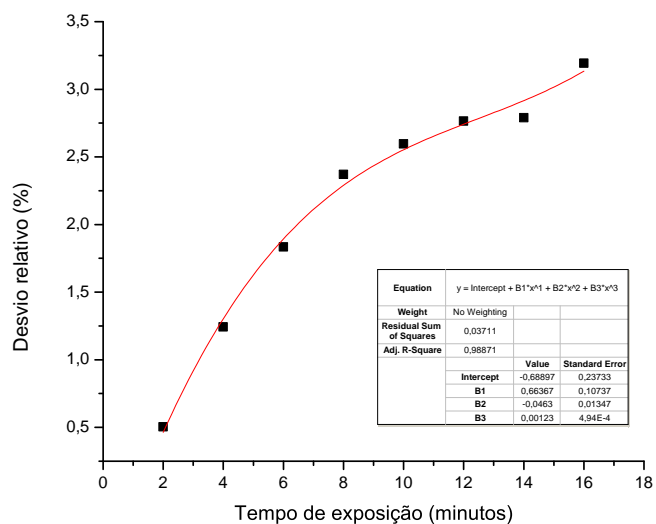


Figura 5.8: Deslocação percentual do pico aos 200 nanómetros em relação com o tempo de exposição

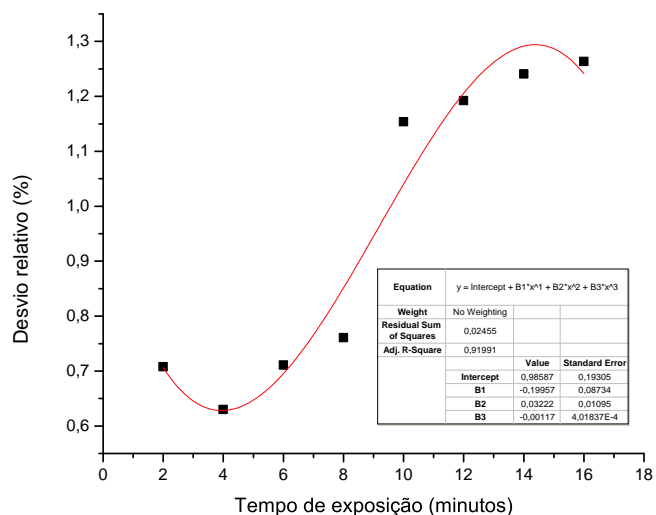


Figura 5.9: Deslocação percentual do pico aos 250 nanómetros em relação com o tempo de exposição

5.3. ESTUDO DA ABSORVÂNCIA DA SOLUÇÃO AO LONGO DE 72 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO AO CAP

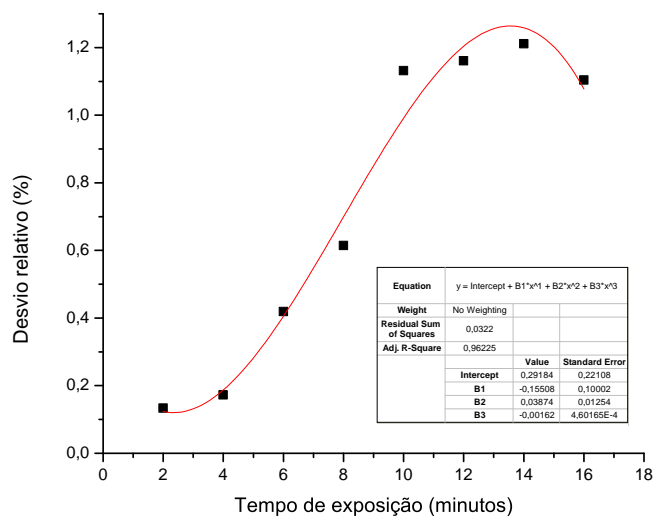


Figura 5.10: Deslocação percentual do pico aos 270 nanómetros em relação com o tempo de exposição

Pelos gráficos apresentados nas figuras 5.8, 5.9 e 5.10, é possível observar que todos os picos sofrem um deslocamento, mas que o deslocamento mais significativo apresenta-se no comprimento de onda dos 200 nm, este pico é obtido como explicado na secção 5.5, através da mistura das espécies RONS com a água presente na solução de DNA. Para determinar de facto, se a deslocação deste pico indica a recombinação molecular das espécies resultantes da mistura, seria necessário recorrer a técnicas como por exemplo: espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica, espectroscopia de massa ou fluorescência, que permitem identificar as espécies.

5.3 Estudo da absorvância da solução ao longo de 72 horas após exposição ao CAP

5.3.1 Estudo da absorvância da solução de DNA exposta ao CAP ao longo de 72 horas

Para se perceber o impacto da exposição ao CAP ao longo do tempo nas moléculas de DNA, a solução de DNA foi exposta durante 16 minutos ao CAP, de modo a apresentar a maior diferença em relação aos resultados obtidos com a solução controlo. Neste estudo, o espectro de absorvância da solução foi medido de 24 em 24 horas, até completar as 72 horas. Os resultados podem ser observados na figuras figuras 5.11 e 5.12. É importante mencionar que a solução era mantida no frigorífico selada com parafilme e tapada com papel de alumínio, de modo a não ser irradiada por luz durante este período de tempo. Ao retirar as soluções do frigorífico estas eram agitadas levemente, de modo a assegurar que as moléculas não permaneciam aglomeradas e aderentes às paredes das cuvets.

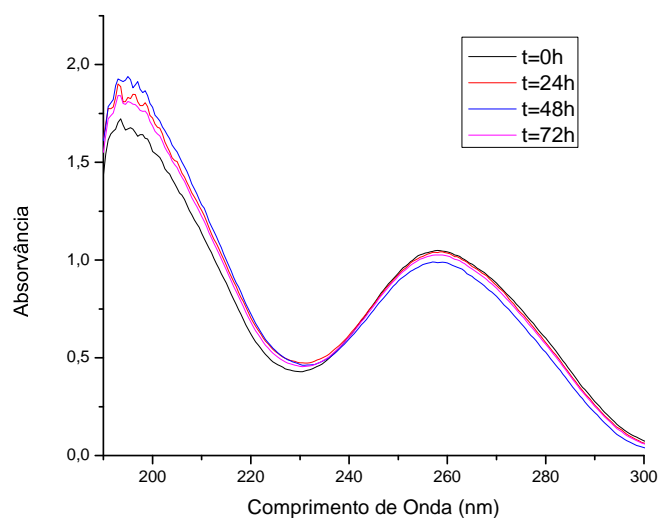


Figura 5.11: Espectros de absorção da solução de DNA em condições de controle ao longo de 72 horas medidos com intervalo de 24 horas.

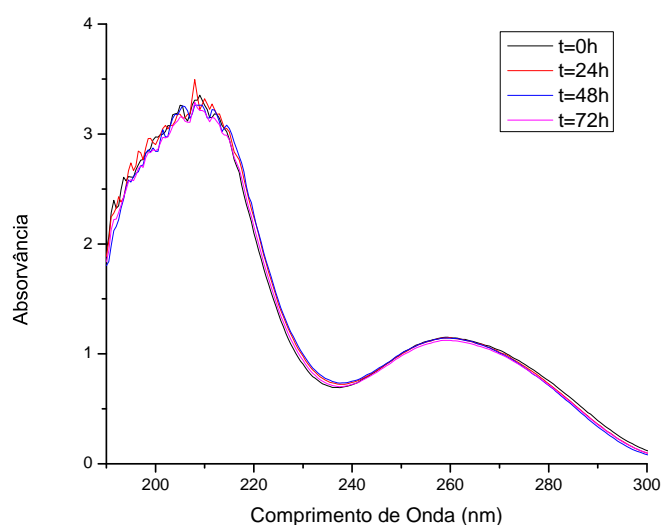


Figura 5.12: Espectros de absorção da solução de DNA exposta ao CAP ao longo de 72 horas após exposição com medidos com intervalo de 24 horas. A solução foi inicialmente exposta ao CAP durante 16 minutos.

Neste estudo foi possível observar que ao longo das 72 horas os resultados mantiveram-se constantes, principalmente nos espectros de DNA exposto ao CAP. É possível concluir que o tempo após tratamento não é uma variável a ter em conta, pelo menos nas condições utilizadas.

5.3.2 Estudo da absorvância da emulsão de lipossomas ao longo de 72 horas após exposição ao CAP

Para estudar o impacto da exposição ao CAP a longo prazo, nas emulsões de lipossomas, foram medidos espectros de absorvância com intervalo de 24 horas, até completar 72 horas. Os resultados podem ser observados nas figuras 5.13, 5.14, 5.15 e 5.16. As emulsões foram expostas ao CAP durante 2 minutos e armazenadas como descrito anteriormente.

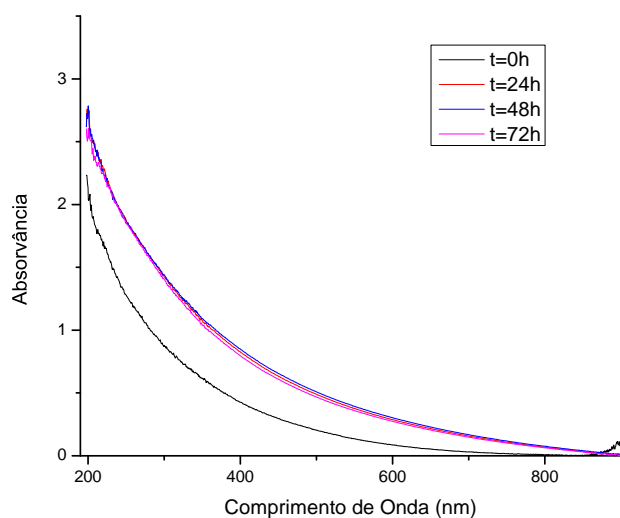


Figura 5.13: Espectros de absorvância das emulsões de controle de lipossomas ao longo de 72 horas.

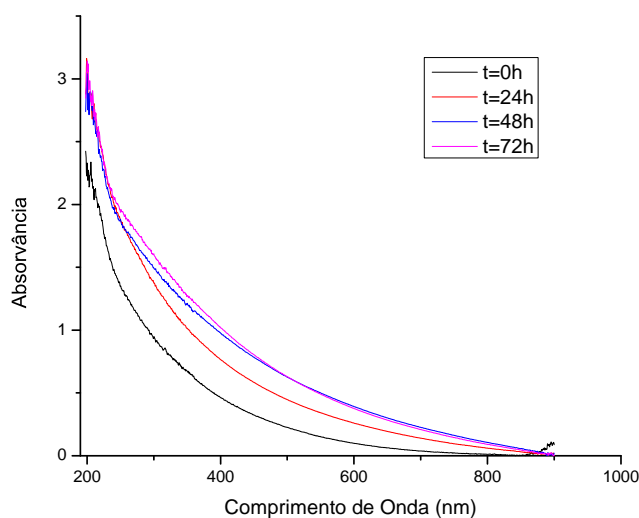


Figura 5.14: Espectros de absorvância das emulsões de lipossomas ao longo de 72 horas após exposição ao CAP. A emulsão foi inicialmente exposta ao CAP durante 2 minutos

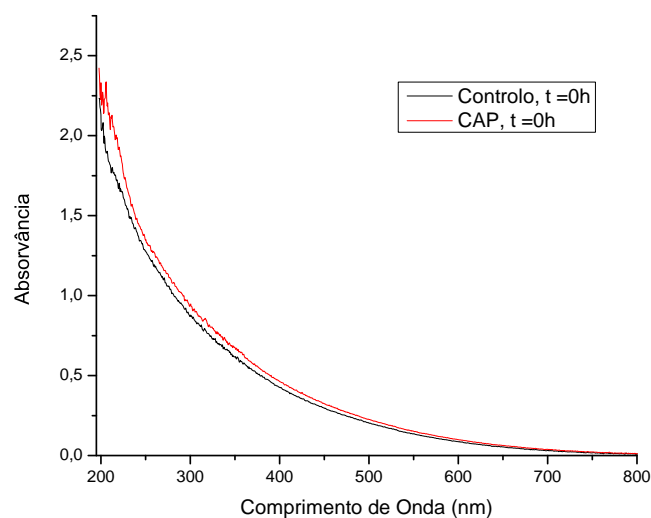


Figura 5.15: Espectros de absorvância das emulsões de lipossoma de controlo e expostas ao CAP no dia de exposição ao CAP.

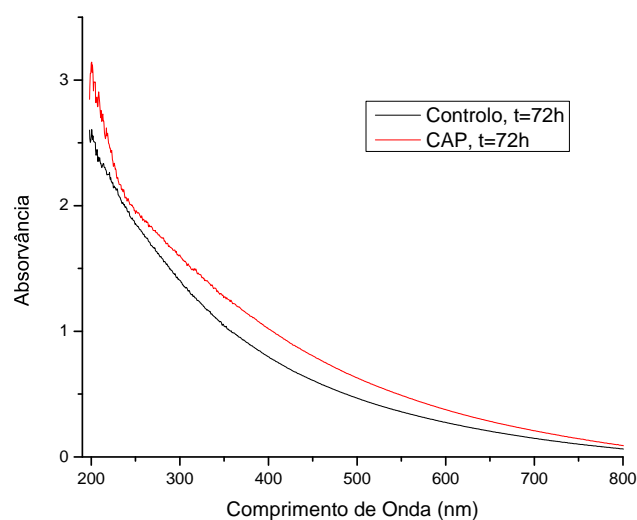


Figura 5.16: Espectros de absorvância das emulsões de lipossoma de controlo e expostas ao CAP 72 horas após a exposição ao CAP.

Nas figuras 5.13, 5.14, 5.15 e 5.16, é possível verificar que no dia de tratamento a curva apresenta menor absorvância em todo o seu espectro. Isto pode ser justificado por uma possível deposição dos lipossomas nas paredes das cuvets aquando da preservação das soluções para os dias seguintes. De notar que mesmo após ser agitada, é possível que alguns lipossomas tenham permanecido depositados nas paredes da cuvete, e que como tal haja a ilusão de um aumento de concentração. Um fator que talvez suporte esta

5.3. ESTUDO DA ABSORVÂNCIA DA SOLUÇÃO AO LONGO DE 72 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO AO CAP

ideia é o facto de que mantendo-se esta deposição, ao longo das medições seguintes, os espectros são mais semelhantes entre si, isto é, os espectros 24 horas, 48 horas e 72 horas. Este fenómeno é observado em ambos os espectros.

É também importante realçar que tal como na solução de DNA representada nas figuras 5.11 e 5.12, existe um aumento de absorvância, essa sim relevante, na faixa entre os 190 nm e os 230 nm. Mais uma vez, sendo a emulsão de lipossomas uma solução aquosa, o aumento nesta faixa pode ser explicado pelo aumento de RONS [75].

Para melhor leitura dos gráficos 5.13 e 5.14, são apresentadas as figuras 5.15 e 5.16 para realçar a distinção entre o dia de exposição das emulsões de lipossomas e após 72 horas.

Deve-se também referir que, segundo foi observado por Pereira et al, o aumento de absorvância dos lipossomas quando irradiados com luz ultra-violeta medindo a oxidação das moléculas dos lípidos [76].

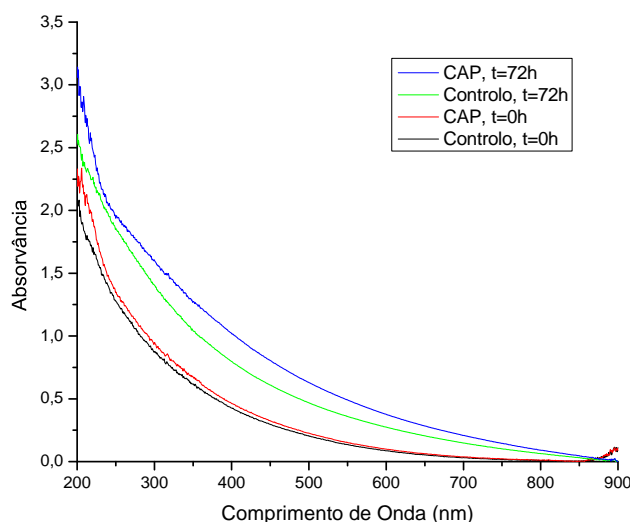


Figura 5.17: Gráfico que combina as duas figuras 5.15 e 5.16.

Na figura 5.17 é possível observar que os espectros de absorvância expostos ao CAP apresentam sempre uma absorvância superior aos espectros de controlo, tanto no dia de exposição como 72 horas depois, e que os espectros de absorvância da emulsão de lipossomas exposta ao CAP conserva o seu aumento na banda entre os 200 e os 230 nm 72 horas depois do dia de exposição.

5.3.3 Estudo da absorvância da emulsão de DNA encapsulado ao longo de 72 horas após exposição ao CAP

Nesta secção é analisado o efeito após exposição ao CAP durante 2 minutos ao longo de um período de 72 horas, em que a emulsão foi medida, de 24 em 24 horas, até completar as 72 horas, para as emulsões de DNA encapsulado, os resultados podem ser observados nas

figuras 5.18 e 5.19. Mais uma vez é importante realçar que as condições de armazenamento foram mantidas. Os resultados são semelhantes aos obtidos nas emulsões de lipossomas revelando um aumento na banda dos 190 e 300 nm, devido à adição de DNA nas emulsões. Mediu-se novamente que ao longo das 72 horas não houve uma mudança significativa no espectro de absorvância das emulsões.

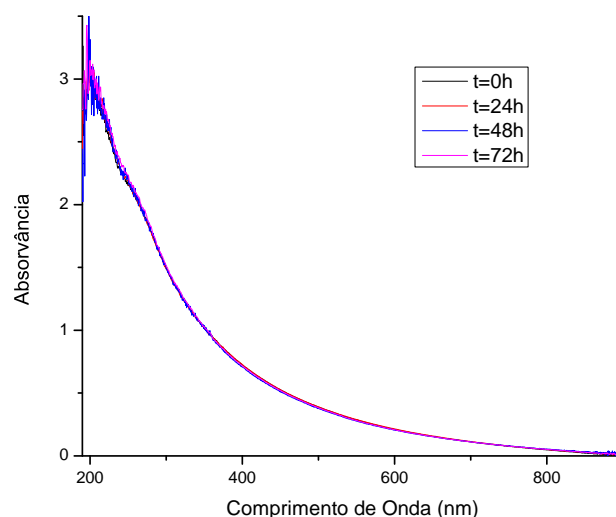


Figura 5.18: Espectros de absorvância das emulsões de controlo de DNA encapsulado por lipossomas ao longo de 72 horas.

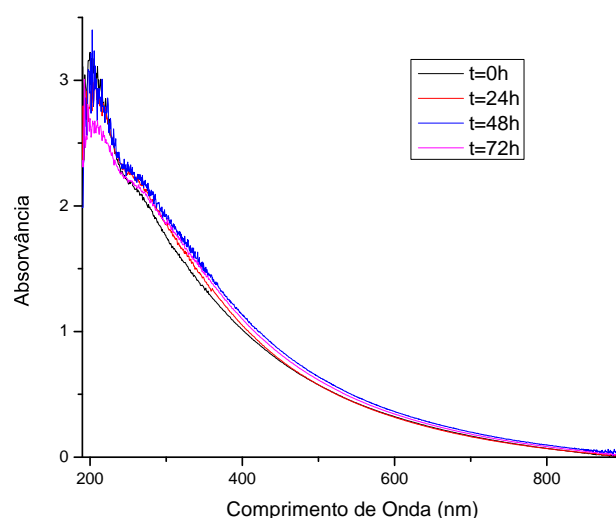


Figura 5.19: Espectros de absorvância das emulsões de DNA encapsulado por lipossomas ao longo de 72 horas após exposição ao CAP.

5.3. ESTUDO DA ABSORVÂNCIA DA SOLUÇÃO AO LONGO DE 72 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO AO CAP

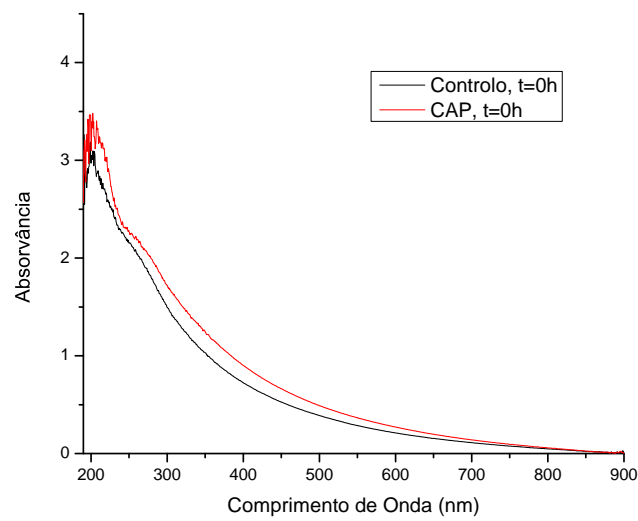


Figura 5.20: Espectros de absorvância das emulsões controle e expostas ao CAP de DNA encapsulado por lipossomas no dia de exposição ao CAP.

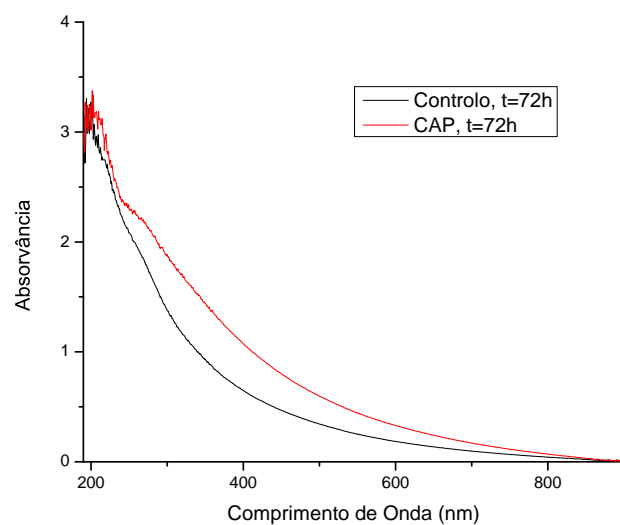


Figura 5.21: Espectros de absorvância das emulsões controle e expostas ao CAP de DNA encapsulado por lipossomas 72 horas após a exposição ao CAP.

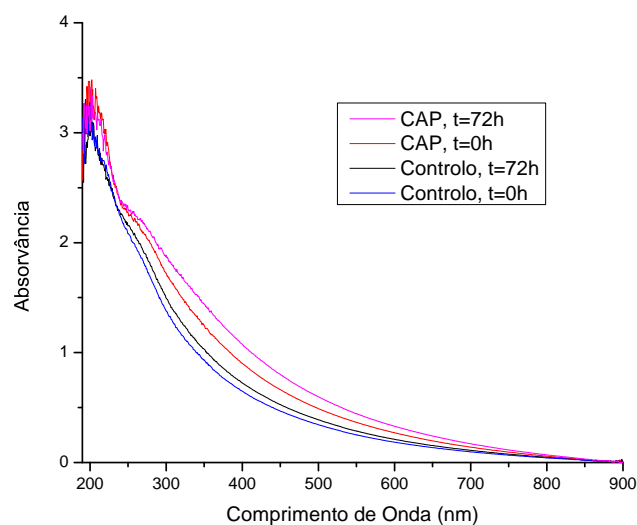


Figura 5.22: Gráfico que combina os espectros de absorção das figuras 5.20 e 5.21

5.3.4 Estudo da interação entre o CAP e o DNA encapsulado

Neste estudo procurou-se comparar o efeito da exposição ao CAP entre as soluções DNA e as emulsões de DNA encapsulado. Tanto as soluções como as emulsões foram expostas ao CAP durante 2 minutos. A figura 5.24 mostra os espectros de absorvância das soluções de DNA, das emulsões de lipossomas e das emulsões de DNA encapsulado por lipossomas.

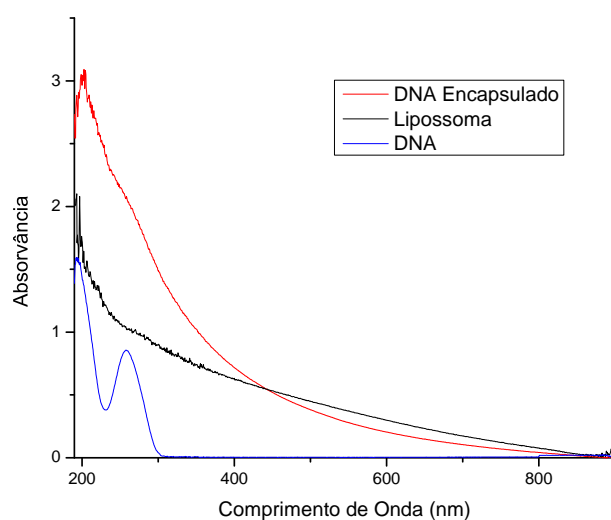


Figura 5.23: Espectros de absorvância das soluções/emulsões de controlo de DNA, de lipossomas e de DNA encapsulado.

5.3. ESTUDO DA ABSORVÂNCIA DA SOLUÇÃO AO LONGO DE 72 HORAS APÓS EXPOSIÇÃO AO CAP

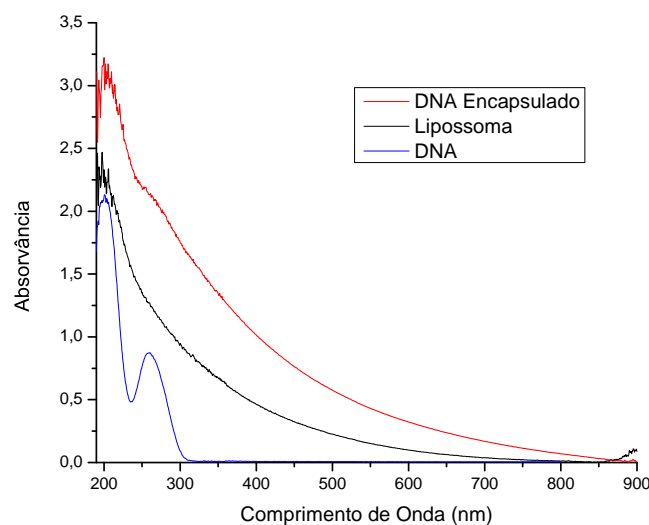


Figura 5.24: Espectros de absorvância das soluções/emulsões de DNA, de lipossomas e de DNA encapsulado expostas ao CAP durante 2 minutos.

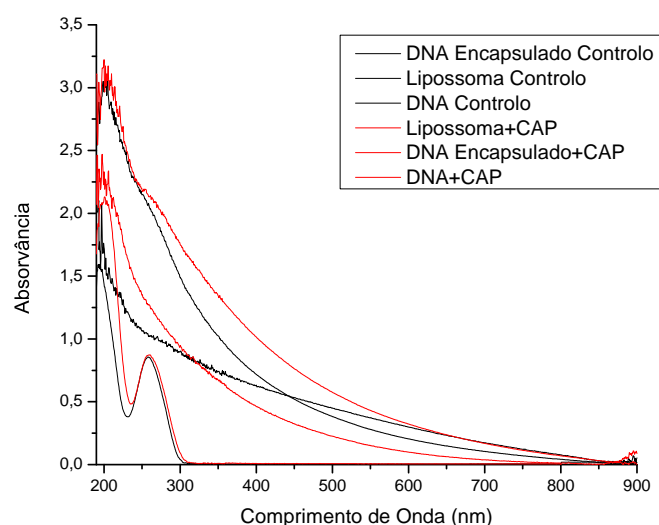


Figura 5.25: Gráfico que combina as duas figuras 5.23 e 5.24.

Um pormenor importante, já anteriormente referido na secção 5.3.3, que se observa com melhor clareza na figura 5.25, é que a introdução de DNA nas emulsões de lipossoma (emulsão de DNA encapsulado) aumenta, como seria de esperar, a absorvância correspondente à banda da solução de DNA, na região dos 190 nm aos 300 nm, notando-se um desvio no espectro de absorção da emulsão de DNA encapsulado, em comparação com o espectro de absorção da emulsão de lipossomas.

5.4 Estudo da absorvância da solução controlo variando a distância ao CAP

Como já anteriormente explicado no capítulo anterior, na secção 4.8, ao realizar as experiências anteriores, as soluções de DNA e de lipossomas controlo, foram colocadas adjacentes às soluções a tratar, na mesma placa de poços. Este estudo foi realizado com o intuito de perceber se essa proximidade, na altura de tratamento, poderia resultar numa alteração dos resultados obtidos. Para determinar este impacto, a mesma solução de DNA controlo foi dividida em 3 grupos, cada um destes composto por uma quantidade igual de solução, da seguinte forma:

- **Grupo 1:** Mantido na mesma placa durante o tratamento; para identificar a possibilidade do CAP interagir com as amostras de controlo presentes na placa.
- **Grupo 2:** Mantido numa placa afastada do jato de plasma durante o tratamento; para identificar a possibilidade da evaporação das soluções/emulsões.
- **Grupo 3:** Mantido no frasco original onde estava preservado, DNA durante o tratamento; para utilizar como comparador.

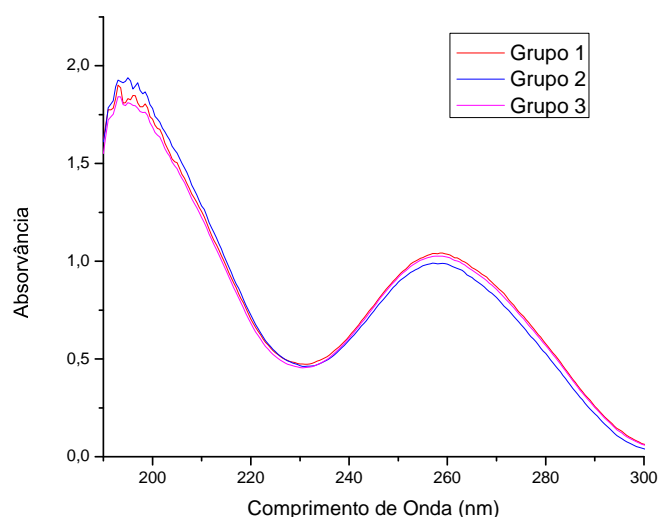


Figura 5.26: Espectros de absorção de cada grupo controlo de DNA. O grupo 1 foi mantido na mesma placa durante o tratamento, o grupo 2 foi mantido numa placa afastada durante o tratamento e o grupo 3 foi mantido no frasco original onde estava mantido o DNA

Os resultados obtidos na figura 5.26 demonstram de forma bastante esclarecedora de que o impacto da distância, neste tipo de grandezas é irrelevante, pelo menos às condições utilizadas. Esta conclusão foi retirada principalmente por duas razões, a primeira é o facto de não haver qualquer desvio em absorvância para em nenhuma das soluções, por isso

5.5. ESTUDO DA ABSORVÂNCIA DA ÁGUA APÓS O TRATAMENTO COM O CAP

a diferença na intensidade de cada espectro está provavelmente associada à incerteza da experiência, mais especificamente pequenos erro ao pipetar e não ao impacto do plasma na mesma. A segunda razão é o facto de que o grupo 2 apresentou um aumento de absorvância em relação ao grupo 3, o que não faz sentido tendo em conta que o grupo 3 é o grupo que ficou no frasco. Ou seja, caso fosse o plasma o fator a induzir este aumento, seria expectável que o grupo 3 tivesse a menor absorvância e o grupo 1 maior absorvância, mas tal não foi observado.

5.5 Estudo da absorvância da água após o tratamento com o CAP

5.5.1 Estudo da água após o tratamento com o CAP

Ao observar que o comportamento das emulsões de lipossomas e das soluções DNA era semelhante em termos do seu aumento de absorvância com a interação com a pluma de plasma, surgiu a ideia de medir o fator comum entre elas, a água.

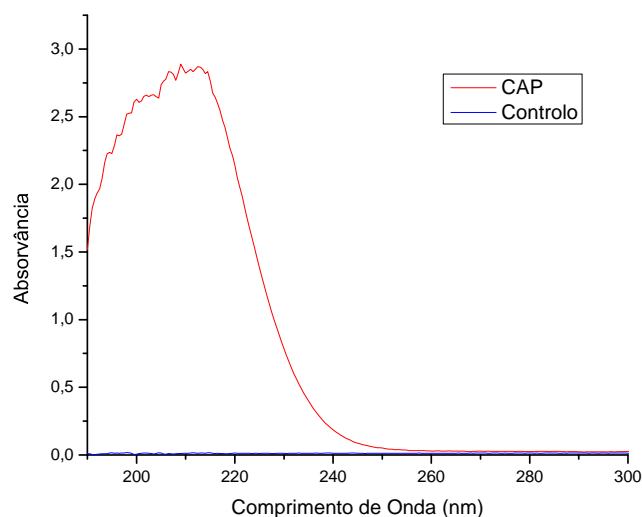


Figura 5.27: Gráfico do espectro de absorvância da água tratada com CAP durante 16 minutos

A figura 5.27 mostra duas curvas, uma de água controlo, e outra água exposta ao CAP durante 16 minutos, apenas é possível observar uma das curvas, pois a da água não exposta ao CAP encontra-se com absorvância nula devido à sua transparência. Por outro lado, a água tratada com o plasma já apresenta absorvância, como é possível ler na figura. Outra situação importante a realçar é que este aumento foi justamente nos comprimentos de onda entre os 190 e os 230 nm, aumento este que também era observado nas soluções tanto de DNA como nas emulsões de lipossomas.

Este resultado é corroborado por Oh, Jun-Seok et al., que demonstra o aumento do pico observado neste espectro [75][77]. Neste artigo é possível observar também a contribuição

de cada um dos RONS.

Deste modo, a ativação da água acontece similarmente à ativação do ar. Seguindo o seguinte princípio, uma molécula de água entra em contacto com a pluma de plasma, a energia do plasma pode causar a dissociação da molécula de água em ROS, podendo deste modo tornar a água num meio ativado com propriedades únicas em comparação com a água não ativada. Por exemplo, pode ter níveis aumentados de iões de hidrogénio, o que pode resultar numa alteração do pH [75][78][79].

5.5.2 Estudo da água 72 horas após o tratamento

Foi também verificado se o impacto da água nas restantes curvas espectrais é verificado ao longo das 72 horas do estudo. Como se pode observar na figura 5.28 a absorvância mantém-se constante entre medições.

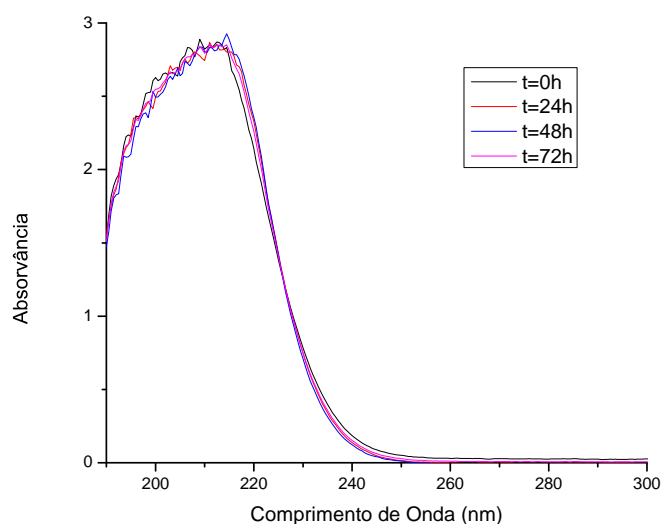


Figura 5.28: Espectro de absorção da água tratada ao longo de 72 horas após a exposição ao CAP.

O estudo realizado nesta secção, é relevante, pois, como é possível observar na figura 5.28, as espécies RONS mantém-se dissolvidas na água durante toda a duração do estudo, nas condições de preservação a que esta foi submetida, a importância deste facto deve-se principalmente a que todos os estudos realizados neste trabalho foram realizados em soluções aquosas, a preservação dos RONS é muito possivelmente também preservada nos mesmos, adicionalmente, a preservação de RONS dissolvidos em meio aquoso pode ser importante para a sua utilização em tratamento de células cancerígenas.

5.5.3 Estudo da influência da água nos espectros de absorvância da solução de DNA

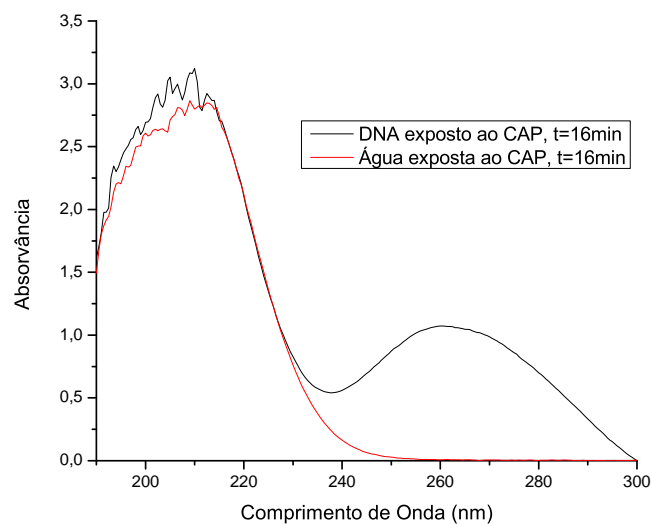


Figura 5.29: Espectros de absorção da solução de DNA e da água, ambos com tempo de exposição ao CAP de 16 minutos, com o objetivo de comprovar a influência da água ativada por exposição ao CAP no espectro de absorção da solução de DNA.

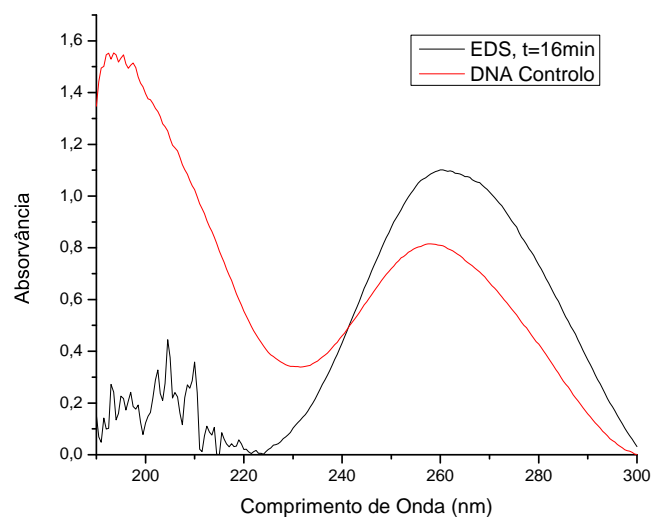


Figura 5.30: Comparação entre o espectro de absorção da solução de controlo de DNA e o espectro resultante da subtração entre os dois espectros representados na figura 5.29, identificado na legenda da figura por EDS.

Para se analisar o efeito da influência do CAP nas moléculas de DNA, os espectros de DNA e de água expostos ao CAP durante 16 minutos apresentados na figura 5.29 foram

subtraídos. A figura 5.30 mostra a diferença de espectros de absorvância entre o espectro EDS e o espectro de solução de DNA controlo.

A figura 5.30 revela que existe um aumento de absorvância na banda entre os 220 e os 300 nm, revelando a presença de ligações azoto. O que significa que moléculas de azoto foram misturadas na solução de DNA.

É importante também mencionar que no processo de medição foi observada saturação na região dos 190 e os 220 nm, como é possível verificar na figura 5.30. A saturação observada, reduz a precisão da medição e torna a análise pouco conclusiva nesta região.

CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

Neste capítulo são abordadas as conclusões finais que podem ser retiradas tendo em conta os resultados obtidos assim como é referido o trabalho futuro que seria importante realizar para obter os resultados pretendidos.

6.1 Conclusões Finais

Este trabalho teve como principal objetivo estudar o efeito da exposição das moléculas de **DNA** a um jato de plasma, para tentar complementar o conhecimento relativamente a este tipo de tecnologia. Ao longo do trabalho foram realizados 4 estudos:

- I) Foi analisado o efeito da exposição da solução de **DNA** ao **CAP** com diferentes tempos de exposição. Foi observado um aumento da área dos três picos obtidos através do *fitting*, nos comprimentos de onda; 200, 250 e 270 nm. Foi também possível observar um deslocamento destes mesmos picos. Ambos estes fenómenos podem ser explicados pela introdução das espécies **RONs**, e consequente dissolução destas no meio.
- II) Foi abordada a capacidade de tratamento do **CAP** ao longo de 72 horas. Este estudo foi subdividido em três partes:
 - (a) O estudo da evolução da absorvância da solução de **DNA** tratada com **CAP**: Não foram observadas diferenças relevantes na duração do mesmo, é no entanto, importante notar que possivelmente as espécies reativas mantiveram-se estáveis na solução.
 - (b) O estudo da evolução da absorvância da emulsão de lipossomas tratada com **CAP**: Verificou-se que talvez exista propensão para os lipossomas aderirem às paredes da cuvete e assim influenciarem os resultados, é relevante notar que o espectro do lipossoma após tratamento apenas aumenta na banda entre os 200 e 220 nm, tal como no estudo para as soluções de **DNA**, devido à dissolução das espécies **RONs** na solução.

(c) O estudo da evolução da absorvância da emulsão de DNA encapsulado com lipossomas tratado com CAP: Sendo uma junção dos dois anteriores, foi possível observar um deslocamento da curva dos lipossomas pela introdução do DNA na emulsão, porém, este estudo não se demonstrou conclusivo devido ao facto de que a interação entre o CAP e a solução de DNA encontra-se ofuscada pelas espécies RONS.

III) Foi averiguado o possível problema da evaporação das soluções assim como a propensão destas se misturarem com a espécie RONS dependendo da distância a que estão do CAP. A conclusão deste estudo foi que a solução não é especialmente sensível, tendo em conta que para três grupos de controlo utilizados foram obtidos os mesmos resultados, o mesmo pode ser dito para a evaporação, caso tivesse sucedido seria de esperar uma redução dos picos, tal não foi observado.

IV) Foi investigado o impacto da dissolução dos RONS na água presente nas soluções e emulsões utilizadas no trabalho. Este estudo demonstrou-se especialmente relevante pois demonstra a necessidade de uma técnica complementar à utilização do espectrofotómetro para a caracterização das espécies presentes após a interação com o CAP. Não é possível utilizar a espectroscopia ótica de emissão anteriormente realizada ao dispositivo de jato de plasma, como comparador, pois esse estudo foi apenas realizado aos RONS que foram produzidos pelo CAP, não dando qualquer informação relativamente a como estes se misturaram com as moléculas de água, de DNA ou de lipossomas. Este estudo demonstra assim a dificuldade da análise desta interação em meio aquoso, sem a utilização de um método de caracterização secundário ou utilização de *scavengers*, para inibir as RONS.

6.2 Trabalho Futuro

Com o intuito de conseguir determinar com precisão se o CAP provoca danos na estrutura de DNA seria importante complementar a utilização do espectrofotómetro com uma das técnicas abordadas na secção 5.2, como por exemplo; espectroscopia de ressonância paramagnética electrónica, espectroscopia de massa, eletroforese com imunofluorescência ou espectroscopia de infravermelhos, que permite identificar as espécies de RONS formadas na solução aquosa. A relevância da utilização desta técnica deve-se à importância de conseguir distinguir as espécies e determinar a contribuição de cada uma para o espectro obtido. Alternativamente, para tentar perceber com melhor clareza o impacto dos RONS nos espectros obtidos, seria pertinente, estudar o efeito do CAP com as moléculas de DNA numa câmara de vácuo, com o objetivo de reduzir a quantidade de RONS produzidos e dissolvidos no meio.

Seria também importante realizar um estudo de comparasse a interação entre as moléculas de DNA e o CAP e a interação entre as moléculas de DNA e uma fonte de luz ultravioleta, de modo a perceber o papel que a radiação ultravioleta tem nesta interação.

Obtendo resultados concretos nos estudos indicados anteriormente, seria também importante realizar um estudo de compatibilidade de encapsulamento e proteção, onde se poderia averiguar a proteção que diferentes lípidos conseguem dar às moléculas de [DNA](#) após a interação com o jato de plasma.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. M. Lourenço. *The NOVAthesis L^AT_EX Template User's Manual*. NOVA University Lisbon. 2021. URL: <https://github.com/joaomlourenco/novathesis/raw/main/template.pdf> (ver p. ii).
- [2] M. Roser e H. Ritchie. «Cancer». Em: *Our World in Data* (2015). URL: <https://ourworldindata.org/cancer> (ver p. 1).
- [3] C. GM. «The Cell: A Molecular Approach». Em: *2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates* (2000). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9900/> (ver p. 3).
- [4] A. Basu. «DNA Damage, Mutagenesis and Cancer». Em: *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4 2018-03), p. 970. ISSN: 1422-0067. DOI: [10.3390/ijms19040970](https://doi.org/10.3390/ijms19040970) (ver p. 3).
- [5] «Artigo Wikipedia DNA». Em: *Wikipedia* (). URL: https://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%A1cido%5C_desoxirribonucleico (ver p. 3).
- [6] K. Latham. «DNA vs. RNA». Em: (2021-01). URL: <https://biologydictionary.net/dna-vs-rna/> (ver p. 4).
- [7] G. W. Balazs DA. «Liposomes for use in gene delivery». Em: *J Drug Deliv.* (2011). DOI: [doi:10.1155/2011/326497](https://doi.org/10.1155/2011/326497). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3066571/> (ver p. 4).
- [8] «Nanotechnology in Cosmetics and Skin Care». Em: *copharma.com.lb* (). URL: <https://copharma.com.lb/nanotechnology-in-cosmetics-and-skin-care/> (ver p. 4).
- [9] S. Das, G. Dalei e A. Barik. «A Dielectric Barrier Discharge (DBD) Plasma Reactor: An Efficient Tool to Measure the Sustainability of Non-Thermal Plasmas through the Electrical Breakdown of Gases». Em: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 410 (2018-09), p. 012004. DOI: [10.1088/1757-899X/410/1/012004](https://doi.org/10.1088/1757-899X/410/1/012004) (ver p. 6).

- [10] M. Rowbottom e C. Susskind. «Electricity and Medicine.» Em: *History of their Interaction* (1984). Ed. por I. San Francisco Press. URL: <https://www.abebooks.co.uk/servlet/BookDetailsPL?bi=18170244012&tab=1&searchurl=> (ver pp. 7–9).
- [11] Siemens. «An electrifying discovery?» Em: *medmuseum.siemens-healthineers.com* (). URL: <https://www.medmuseum.siemens-healthineers.com/en/stories-from-the-museum/electromedicine> (ver p. 8).
- [12] J. Žigon, M. Petrič e S. Dahle. «Dielectric barrier discharge (DBD) plasma pretreatment of lignocellulosic materials in air at atmospheric pressure for their improved wettability: a literature review». Em: *Holzforschung* 72 (11 2018-11), pp. 979–991. ISSN: 1437-434X. DOI: [10.1515/hf-2017-0207](https://doi.org/10.1515/hf-2017-0207) (ver pp. 9, 10).
- [13] «Plasma». Em: *Wikipedia* (). URL: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Plasma> (ver p. 11).
- [14] M. Laroussi. «Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma». Em: *IEEE Transactions on Plasma Science* 24.3 (1996), pp. 1188–1191. DOI: [10.1109/27.533129](https://doi.org/10.1109/27.533129) (ver p. 11).
- [15] M. Laroussi. «Plasma Medicine: A Brief Introduction». Em: *Plasma* 1.1 (2018), pp. 47–60. ISSN: 2571-6182. DOI: [10.3390/plasma1010005](https://doi.org/10.3390/plasma1010005). URL: <https://www.mdpi.com/2571-6182/1/1/5> (ver p. 12).
- [16] J.-H. Lee et al. «Selective Killing Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma with NO Induced Dysfunction of Epidermal Growth Factor Receptor in Oral Squamous Cell Carcinoma». Em: *PLOS ONE* 11.2 (2016-02), pp. 1–17. DOI: [10.1371/journal.pone.0150279](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150279). URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150279> (ver pp. 12, 16).
- [17] G. Fridman et al. «Applied Plasma Medicine». Em: *Plasma Processes and Polymers* 5 (6 2008-08), pp. 503–533. ISSN: 16128850. DOI: [10.1002/ppap.200700154](https://doi.org/10.1002/ppap.200700154) (ver p. 12).
- [18] M. Deilmann et al. «Low-Pressure Microwave Plasma Sterilization of Polyethylene Terephthalate Bottles». Em: *Journal of Food Protection* 71 (10 2008-10), pp. 2119–2123. ISSN: 0362028X. DOI: [10.4315/0362-028X-71.10.2119](https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.10.2119) (ver p. 12).
- [19] M. Moreau, N. Orange e M. Feuilleley. «Non-thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination». Em: *Biotechnology Advances* 26 (6 2008-11), pp. 610–617. ISSN: 07349750. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2008.08.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.08.001) (ver p. 12).
- [20] G. Farin e K. E. Grund. «Technology of argon plasma coagulation with particular regard to endoscopic applications.» Em: *Endoscopic surgery and allied technologies* 2 1 (1994), pp. 71–7 (ver p. 12).
- [21] M. G. Kong et al. «Plasma medicine: an introductory review». Em: *New Journal of Physics* 11 (11 2009-11), p. 115012. ISSN: 1367-2630. DOI: [10.1088/1367-2630/11/11/115012](https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115012) (ver p. 12).

- [22] M. Laroussi et al. «Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil». Em: *Plasma Processes and Polymers* 3 (6-7 2006-08), pp. 470–473. ISSN: 1612-8850. DOI: [10.1002/ppap.200600005](https://doi.org/10.1002/ppap.200600005) (ver p. 12).
- [23] M. Laroussi e X. Lu. «Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications». Em: *Applied Physics Letters* 87 (11 2005-09), p. 113902. ISSN: 0003-6951. DOI: [10.1063/1.2045549](https://doi.org/10.1063/1.2045549) (ver p. 12).
- [24] Em: *Google Patents* (). URL: <https://patents.google.com/patent/US5198724A/en> (ver p. 12).
- [25] H. Koinuma et al. «Development and application of a microbeam plasma generator». Em: *Applied Physics Letters* 60 (7 1992-02), pp. 816–817. ISSN: 0003-6951. DOI: [10.1063/1.106527](https://doi.org/10.1063/1.106527) (ver p. 12).
- [26] E. Stoffels et al. «Plasma needle: a non-destructive atmospheric plasma source for fine surface treatment of (bio)materials». Em: *Plasma Sources Science and Technology* 11 (4 2002-11), pp. 383–388. ISSN: 0963-0252. DOI: [10.1088/0963-0252/11/4/304](https://doi.org/10.1088/0963-0252/11/4/304) (ver p. 12).
- [27] C. Hoffmann, C. Berganza e J. Zhang. «Cold Atmospheric Plasma: methods of production and application in dentistry and oncology». Em: *Medical Gas Research* 3 (1 2013), p. 21. ISSN: 2045-9912. DOI: [10.1186/2045-9912-3-21](https://doi.org/10.1186/2045-9912-3-21) (ver pp. 12, 13).
- [28] M. Laroussi. «Cold Plasma in Medicine and Healthcare: The New Frontier in Low Temperature Plasma Applications». Em: *Frontiers in Physics* 8 (2020-03). ISSN: 2296-424X. DOI: [10.3389/fphy.2020.00074](https://doi.org/10.3389/fphy.2020.00074) (ver p. 13).
- [29] G. Fridman et al. «Applied Plasma Medicine». Em: *Plasma Processes and Polymers* 5 (6 2008-08), pp. 503–533. ISSN: 16128850. DOI: [10.1002/ppap.200700154](https://doi.org/10.1002/ppap.200700154) (ver p. 13).
- [30] «Biomedical Engineering: Frontier Research and Converging Technologies». Em: *vol. 9, pp. 1–511, 2015* () (ver p. 14).
- [31] M. Keidar, R. Walk e Shashurin. «Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy». Em: *Br J Cancer* 105, 1295–1301 (2011). DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.386>. URL: <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.386> (ver pp. 15, 17).
- [32] Z. Chen et al. «Cold atmospheric plasma for SARS-CoV-2 inactivation». Em: *Physics of Fluids* 32 (11 2020-11), p. 111702. ISSN: 1070-6631. DOI: [10.1063/5.0031332](https://doi.org/10.1063/5.0031332) (ver p. 15).
- [33] Y. Li et al. «Cold Atmospheric Pressure Plasma-Activated Medium Induces Selective Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells Independently of Singlet Oxygen, Hydrogen Peroxide, Nitric Oxide and Nitrite/Nitrate». Em: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11 2021-05), p. 5548. ISSN: 1422-0067. DOI: [10.3390/ijms22115548](https://doi.org/10.3390/ijms22115548) (ver p. 15).

- [34] O. Volotskova, S. Hawley T. e M. «Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma». Em: *Sci Rep* 2, 636 (2012). DOI: <https://doi.org/10.1038/srep00636>. URL: <https://www.nature.com/articles/srep00636#citeas> (ver pp. 16, 17).
- [35] J.-H. Lee et al. «Selective Killing Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma with NO Induced Dysfunction of Epidermal Growth Factor Receptor in Oral Squamous Cell Carcinoma». Em: *PLOS ONE* 11 (2 2016-02), e0150279. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0150279](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150279) (ver p. 16).
- [36] M. Akter et al. «Non-Thermal Atmospheric Pressure Bio-Compatible Plasma Stimulates Apoptosis via p38/MAPK Mechanism in U87 Malignant Glioblastoma». Em: *Cancers* 12 (1 2020-01), p. 245. ISSN: 2072-6694. DOI: [10.3390/cancers12010245](https://doi.org/10.3390/cancers12010245) (ver pp. 16, 19).
- [37] O. T. Guerrero-Preston R et al. «Cold atmospheric plasma treatment selectively targets head and neck squamous cell carcinoma cells». Em: *Int J Mol Med*. (2014). DOI: [doi:10.3892/ijmm.2014.1849](https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1849). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25050490/> (ver pp. 17, 18).
- [38] É. K. d. M. Pinto. «Desenvolvimento de um Dispositivo de Jato de Plasma para o tratamento de cancro da pele». Em: *FCT NOVA* (). URL: <http://hdl.handle.net/10362/74918> (ver pp. 17, 23, 25).
- [39] J. Tornin et al. «Evaluation of the effects of cold atmospheric plasma and plasma-treated liquids in cancer cell cultures». Em: *Nature Protocols* (2021) (ver p. 17).
- [40] A. Khlyustova et al. «Important parameters in plasma jets for the production of RONS in liquids for plasma medicine: A brief review». Em: *AFrontiers of Chemical Science and Engineering* (2019). DOI: [10.1007/s11705-019-1801-8](https://doi.org/10.1007/s11705-019-1801-8) (ver p. 17).
- [41] O. Volotskova et al. «Targeting the cancer cell cycle by cold atmospheric plasma». Em: *Scientific Reports* 2 (1 2012-09), p. 636. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep00636](https://doi.org/10.1038/srep00636) (ver pp. 17, 18).
- [42] M. Schuster et al. «Visible tumor surface response to physical plasma and apoptotic cell kill in head and neck cancer». Em: *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 44 (9 2016-09), pp. 1445–1452. ISSN: 10105182. DOI: [10.1016/j.jcms.2016.07.001](https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.07.001) (ver p. 17).
- [43] M. Keidar et al. «Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy». Em: *British Journal of Cancer* 105 (9 2011-10), pp. 1295–1301. ISSN: 0007-0920. DOI: [10.1038/bjc.2011.386](https://doi.org/10.1038/bjc.2011.386) (ver p. 18).
- [44] S. Vermeylen et al. «Cold atmospheric plasma treatment of melanoma and glioblastoma cancer cells». Em: *Plasma Processes and Polymers* 13 (12 2016-12), pp. 1195–1205. ISSN: 16128850. DOI: [10.1002/ppap.201600116](https://doi.org/10.1002/ppap.201600116) (ver p. 18).

- [45] S. Mohades et al. «Temporal evaluation of the anti-tumor efficiency of plasma-activated media». Em: *Plasma Processes and Polymers* 13 (12 2016-12), pp. 1206–1211. ISSN: 16128850. DOI: [10.1002/ppap.201600118](https://doi.org/10.1002/ppap.201600118) (ver p. 18).
- [46] S. J. Kim, H. S. Kim e Y. R. Seo. «Understanding of ROS-Inducing Strategy in Anticancer Therapy». Em: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (2019-12), pp. 1–12. ISSN: 1942-0900. DOI: [10.1155/2019/5381692](https://doi.org/10.1155/2019/5381692) (ver p. 18).
- [47] J. Lafontaine et al. «Synergy between Non-Thermal Plasma with Radiation Therapy and Olaparib in a Panel of Breast Cancer Cell Lines». Em: *Cancers* 12 (2 2020-02), p. 348. ISSN: 2072-6694. DOI: [10.3390/cancers12020348](https://doi.org/10.3390/cancers12020348) (ver p. 18).
- [48] Biscop et al. «Influence of Cell Type and Culture Medium on Determining Cancer Selectivity of Cold Atmospheric Plasma Treatment». Em: *Cancers* 11 (9 2019-09), p. 1287. ISSN: 2072-6694. DOI: [10.3390/cancers11091287](https://doi.org/10.3390/cancers11091287) (ver p. 19).
- [49] K. R. Liedtke et al. «Non-thermal plasma-treated solution demonstrates antitumor activity against pancreatic cancer cells in vitro and in vivo». Em: *Scientific Reports* 7 (1 2017-08), p. 8319. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/s41598-017-08560-3](https://doi.org/10.1038/s41598-017-08560-3) (ver p. 19).
- [50] S. Park et al. «Cold Atmospheric Plasma Restores Paclitaxel Sensitivity to Paclitaxel-Resistant Breast Cancer Cells by Reversing Expression of Resistance-Related Genes». Em: *Cancers* 11 (12 2019-12), p. 2011. ISSN: 2072-6694. DOI: [10.3390/cancers11122011](https://doi.org/10.3390/cancers11122011) (ver p. 19).
- [51] J. Vaquero et al. «Cold-Atmospheric Plasma Induces Tumor Cell Death in Preclinical In Vivo and In Vitro Models of Human Cholangiocarcinoma». Em: *Cancers* 12 (5 2020-05), p. 1280. ISSN: 2072-6694. DOI: [10.3390/cancers12051280](https://doi.org/10.3390/cancers12051280) (ver p. 19).
- [52] E. Griseti, N. Merbahi e M. Golzio. «Anti-Cancer Potential of Two Plasma-Activated Liquids: Implication of Long-Lived Reactive Oxygen and Nitrogen Species». Em: *Cancers* 12 (3 2020-03), p. 721. ISSN: 2072-6694. DOI: [10.3390/cancers12030721](https://doi.org/10.3390/cancers12030721) (ver p. 19).
- [53] T.-H. Chung et al. «Cell Electroporation Enhancement by Non-Thermal Plasma-Treated PBS». Em: *Cancers* 12 (1 2020-01), p. 219. ISSN: 2072-6694. DOI: [10.3390/cancers12010219](https://doi.org/10.3390/cancers12010219) (ver p. 19).
- [54] A. Rammelsberg. «How does ultraviolet light kill cells?» Em: *Scientific American* 18 (1998), pp. 210–211. URL: <https://www.scientificamerican.com/article/how-does-ultraviolet-light/> (ver p. 20).
- [55] S. Ptasińska et al. «DNA strand scission induced by a non-thermal atmospheric pressure plasma jet». Em: *Physical Chemistry Chemical Physics* 12 (28 2010), p. 7779. ISSN: 1463-9076. DOI: [10.1039/c001188f](https://doi.org/10.1039/c001188f) (ver p. 20).

- [56] P. Morales-Ramírez et al. «Assessing Cellular DNA Damage from A Helium Plasma Needle». Em: *Radiation Research* 179 (6 2013-06), pp. 669–673. ISSN: 0033-7587. DOI: [10.1667/RR3223.1](https://doi.org/10.1667/RR3223.1) (ver p. 20).
- [57] X. Han et al. «Plasmid DNA damage induced by helium atmospheric pressure plasma jet». Em: *The European Physical Journal D* 68 (3 2014-03), p. 46. ISSN: 1434-6060. DOI: [10.1140/epjd/e2014-40753-y](https://doi.org/10.1140/epjd/e2014-40753-y) (ver p. 20).
- [58] C. Yaopromsiri et al. «Effect of cold atmospheric pressure He-plasma jet on DNA change and mutation». Em: *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 365 (2015-12), pp. 399–403. ISSN: 0168583X. DOI: [10.1016/j.nimb.2015.07.100](https://doi.org/10.1016/j.nimb.2015.07.100) (ver p. 20).
- [59] N. Kaushik et al. «Responses of Solid Tumor Cells in DMEM to Reactive Oxygen Species Generated by Non-Thermal Plasma and Chemically Induced ROS Systems». Em: *Scientific Reports* 5 (1 2015-02), p. 8587. ISSN: 2045-2322. DOI: [10.1038/srep08587](https://doi.org/10.1038/srep08587) (ver p. 21).
- [60] E. J. Szili et al. «The assessment of cold atmospheric plasma treatment of DNA in synthetic models of tissue fluid, tissue and cells». Em: *Journal of Physics D: Applied Physics* 50 (27 2017-07), p. 274001. ISSN: 0022-3727. DOI: [10.1088/1361-6463/aa7501](https://doi.org/10.1088/1361-6463/aa7501) (ver p. 21).
- [61] H. Kurita et al. «Strand breaks and chemical modification of intracellular DNA induced by cold atmospheric pressure plasma irradiation». Em: *PLOS ONE* 15 (5 2020-05), e0232724. ISSN: 1932-6203. DOI: [10.1371/journal.pone.0232724](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232724) (ver p. 21).
- [62] D. Braný et al. «Effect of Cold Atmospheric Plasma on Epigenetic Changes, DNA Damage, and Possibilities for Its Use in Synergistic Cancer Therapy». Em: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (22 2021-11), p. 12252. ISSN: 1422-0067. DOI: [10.3390/ijms222212252](https://doi.org/10.3390/ijms222212252) (ver p. 21).
- [63] N. Gaur et al. «On cold atmospheric-pressure plasma jet induced DNA damage in cells». Em: *Journal of Physics D: Applied Physics* 54 (3 2021-01), p. 035203. ISSN: 0022-3727. DOI: [10.1088/1361-6463/abb8ab](https://doi.org/10.1088/1361-6463/abb8ab) (ver p. 21).
- [64] B. L. Patenall et al. «Assessment of mutations induced by cold atmospheric plasma jet treatment relative to known mutagens in *Escherichia coli*». Em: *Mutagenesis* 36 (5 2021-10), pp. 380–387. ISSN: 0267-8357. DOI: [10.1093/mutage/geab030](https://doi.org/10.1093/mutage/geab030) (ver p. 21).
- [65] S. R. G. Pereira. «Study of the Effects of Cold Atmospheric Plasmas on Skin Cancer Cells». Em: *FCT NOVA* (). URL: <http://hdl.handle.net/10362/116233> (ver pp. 22, 23, 25, 26).

- [66] V. P. Érica Karina de Melo e R. Paulo. «Desenvolvimento de um Dispositivo de Jato de Plasma para o tratamento de cancro da pele». Em: *Masters Thesis, FCT NOVA* () (ver pp. 22, 28).
- [67] S. J. K. Hea Min Joh e S. H. L. T. H. Chung. «Comparison of the characteristics of atmospheric pressure plasma jets using different working gases and applications to plasma-cancer cell interactions». Em: *AIP Advances* 3, 092128 (2013). DOI: <https://doi.org/10.1063/1.4823484>. URL: <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4823484> (ver p. 23).
- [68] K. I. Fricke K et al. «Atmospheric Pressure Plasma: A High-Performance Tool for the Efficient Removal of Biofilms». Em: *Biofilms. PLoS ONE* 7(8): e42539 (). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042539>. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042539> (ver p. 24).
- [69] «Paschen's law». Em: *Wikipedia* (). URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Paschen%27s_law (ver p. 24).
- [70] T. P. Pivetta. «Liposomes encapsulating DNA-intercalating molecules: an approach for Photodynamic Therapy application». Em: *FCT: DF - Teses de Doutoramento* (). URL: <http://hdl.handle.net/10362/143561> (ver pp. 26, 27).
- [71] «Why is DNA Negatively Charged?» Em: *vedantu* (). URL: <https://www.vedantu.com/biology/why-is-dna-negatively-charged> (ver p. 26).
- [72] «Dipalmitoylphosphatidylcholine». Em: *Wikipedia* (). URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Dipalmitoylphosphatidylcholine> (ver p. 26).
- [73] M. R. Morrow et al. «Comparison of DPPC and DPPG Environments in Pulmonary Surfactant Models». Em: *Biophysical Journal* 93 (1 2007-07), pp. 164–175. ISSN: 00063495. DOI: [10.1529/biophysj.106.102681](https://doi.org/10.1529/biophysj.106.102681) (ver p. 27).
- [74] M. S. Braga et al. «Multispectral colorimetric portable system for detecting metal ions in liquid media». Em: *IEEE*, 2019-08, pp. 1–6. ISBN: 978-1-7281-2109-3. DOI: [10.1109/INSCIT.2019.8868861](https://doi.org/10.1109/INSCIT.2019.8868861) (ver p. 30).
- [75] J.-S. Oh et al. «UV–vis spectroscopy study of plasma-activated water: Dependence of the chemical composition on plasma exposure time and treatment distance». Em: *Japanese Journal of Applied Physics* 57 (1 2018-01), 0102B9. ISSN: 0021-4922. DOI: [10.7567/JJAP.57.0102B9](https://doi.org/10.7567/JJAP.57.0102B9) (ver pp. 33, 41, 47, 48).
- [76] F. Pires et al. «On the role of epigallocatechin-3-gallate in protecting phospholipid molecules against UV irradiation». Em: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 173 (2019), pp. 312–319. ISSN: 0927-7765. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.09.065>. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092776518306763> (ver p. 41).

- [77] Z. Liu et al. «Quantifying the concentration and penetration depth of long-lived RONS in plasma-activated water by UV absorption spectroscopy». Em: *AIP Advances* (2019) (ver p. 47).
- [78] J.-S. Oh et al. «Tailoring the Chemistry of Plasma-Activated Water Using a DC-Pulse-Driven Non-Thermal Atmospheric-Pressure Helium Plasma Jet». Em: *Plasma 2* (2 2019-04), pp. 127–137. ISSN: 2571-6182. DOI: [10.3390/plasma2020010](https://doi.org/10.3390/plasma2020010) (ver p. 48).
- [79] A. Dascalu et al. «Activation of Water by Surface DBD Micro Plasma in Atmospheric Air». Em: (2019). Ed. por G. Laukaitis, pp. 97–104 (ver p. 48).





Estadística Plana para Maquinistas