UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

JAYR HENRIQUE MARIN

Uso da Técnica SERS para Imageamento de Complexos de Cobre(II) em Células *HeLa* e para Caracterização do Complexo de Superfície da 5-nitroisatina em Prata.

Versão Corrigida

São Paulo

Data de depósito na SPG:

20/05/2019

JAYR HENRIQUE MARIN

Uso da Técnica SERS para Imageamento de Complexos de Cobre(II) em Células *HeLa* e para Caracterização do Complexo de Superfície da 5-nitroisatina em Prata.

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Fundamental

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Laudelina Arruda Temperini

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M337u Marin, Jayr Henrique
Uso da Técnica SERS para Imageamento de Complexos de Cobre (II) em Células HeLa e para Caracterização do Complexo de Superfície da 5-nitroisatina em Prata. / Jayr Henrique Marin. - São Paulo, 2019.
128 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Temperini, Marcia Laudelina Arruda

1. SERS. 2. Raman ressonante. 3. células HeLa. 4. complexos oxindolímínicos. I. T. II. Temperini, Marcia Laudelina Arruda, orientador.

Nome: MARIN, Jayr Henrique

Título: Uso da Técnica SERS para Imageamento de Complexos de Cobre (II) em Células *HeLa* e para Caracterização do Complexo de Superfície da 5-nitroisatina em Prata.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marcia Laudelina Arruda Temperini, que em todo o período deste trabalho, me ensinou, lapidou e contribuiu muito para o meu crescimento intelectual e pessoal.

À Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira, que me auxiliou durante todo o tempo desta pesquisa com o conhecimento de sistemas biológicos e possibilitou, inicialmente, meu ingresso na pós-graduação.

À Profa. Dra. Mónica Benicia Mamián López (UFABC) que, quando ingressei no mestrado, era pós doutoranda no laboratório e me auxiliou com todos os experimentos, além de me introduzir na área de quimiometria, me ensinando tudo o que era possível. Hoje tenho mais confiança de seguir estudando essa área.

Ao Prof. Dr. Rômulo Augusto Ando, que possibilitou que eu saísse da minha zona de conforto e permitiu que eu crescesse em outros âmbitos do conhecimento em espectroscopia.

A todos os professores e colegas do Laboratório de Espectroscopia Molecular, por todo o apoio, discussões e confraternizações que permitiram que eu crescesse não somente no âmbito intelectual, mas também nos âmbitos pessoal e espiritual.

Ao doutorando Giordano Toscano por realizar as imagens de TEM dos meus sistemas.

Ao meu grande amigo Kevin de Aquino Dias, que sempre me apoiou desde nosso curso de graduação na UNIFESP. Sem ele meus dias seriam muito mais sérios e monótonos.

A toda minha família que me deu todo o apoio necessário nos momentos difíceis sendo compreensivos e acolhedores. A força deles me permitiu que eu chegasse ao fim deste trabalho.

Aos amigos e professores da Aliança Cultural Brasil-Japão, que me acompanharam e me apoiaram em toda a trajetória dessa pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“Não é no silêncio que os homens se fazem, mas na palavra, no trabalho, na ação-reflexão. ”

Paulo Freire, A Pedagogia do Oprimido.

RESUMO

MARIN, Jayr Henrique. **Uso da Técnica SERS para Imageamento de Complexos de Cobre (II) em Células *HeLa* e para Caracterização do Complexo de Superfície da 5-nitroisatina em Prata**. 2019. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química Fundamental) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A capacidade de complexos oxindolímínicos de cobre (II) de inibir células cancerígenas *HeLa* foi determinada no Laboratório de Bioinorgânica, Catálise e Farmacologia (IQ-USP), coordenado pela Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira. Nesta dissertação um dos estudos foi obter o imageamento SERS desses compostos no interior de células *HeLa* vivas com o objetivo de identificar o alvo intracelular desses complexos.

Devido a intensificação SERS desses complexos ser baixa e causarem a agregação das nanopartículas de ouro (AuNP) foi necessária a utilização de um marcador Raman (MR) nestes estudos, sendo escolhido o composto DTNB (Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)). Portanto a sonda SERS desse estudo consiste de AuNP esféricas juntamente com o MR e os complexos de cobre (AuNP/MR/Cu(isatp) ou Cu(nisatp)). No imageamento das células *HeLa* foram utilizadas duas radiações excitantes: 532 nm, onde não ocorre intensificação SERS originando uma imagem Raman dos constituintes celulares em maior quantidade e 785 nm, que possibilita o monitoramento dos sistemas AuNP/MR/Cu(isatp) ou Cu(nisatp) no interior das células.

Para a análise dos espectros desse estudo (cerca de 2000 espectros para cada imageamento) a linha base foi corrigida por WLS (*Weighted Least Squares*) para os espectros SERS e por EMSC (*Extended Multiplicative Scatter Correction*) para os espectros Raman, além de ser feito alisamento utilizando um filtro *Savitzky-Golay*. Os espectros Raman foram submetidos à uma análise multivariada MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution - Asymmetric Least Squares*) para se obter as imagens de diferentes componentes celulares e uma análise univariada dos espectros SERS, baseada na banda do MR, possibilitando obter as imagens dos sistemas AuNP/MR/Cu(isatp) e AuNP/MR/Cu(nisatp).

O imageamento SERS e Raman das células *HeLa* mostraram que os complexos têm a capacidade de penetrar nas células, juntamente com as nanopartículas de ouro, e causar dano ao núcleo celular, sem a entrada de água na célula, característica não observada ao tratar as células com outros sistemas sem a presença dos complexos.

Outro estudo realizado nesta dissertação foi a caracterização do complexo de superfície formado entre a 5-nitroisatina em nanopartículas de prata, através da espectroscopia SERS e Raman ressonante. Foi observado que o complexo de superfície apresenta uma grande deslocalização eletrônica frente às espécies moleculares estudadas para fins comparativos. Essa deslocalização gera um cromóforo distinto no complexo de superfície que possui uma transição eletrônica na região do verde do espectro visível, enquanto que as espécies moleculares apresentam transições na região do azul e ultravioleta.

Palavras-chave: SERS, Raman ressonante, células *HeLa*, complexos oxindolimínicos.

ABSTRACT

Marin, Jayr Henrique. **Usage of SERS Technique for Imaging of Copper (II) Complexes in *HeLa* Cells and to Characterize a Surface Complex of 5-nitroisatin in Silver** 2019. 128 f. Dissertação (Mestrado em Química Fundamental) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The inhibition of cancer *HeLa* cells by oxindoliminic copper (II) complexes was determined in the Bioinorganic, Catalysis and Pharmacology Laboratory (IQ-USP), coordinated by Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira. In this work one of the studies was to identify the intracellular targets of these complexes by SERS imaging of live *HeLa* cells.

Due to the low SERS intensification of these complexes and the aggregation that they cause in the gold nanoparticles (AuNP), it was necessary to use a Raman reporter (MR) in these studies. The reporter chosen was the DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)). The SERS probe was constituted by spherical AuNP together with the MR and the copper complexes. In the imaging of live *HeLa* cells two excitation radiations were used: 532 nm, to acquire the normal Raman information of the cells and 785 nm, to acquire the localization of the modified AuNP inside the cells.

To analyze the spectra (about 2000 spectra to each imaging) the baseline, for the SERS spectra, was corrected by WLS (*Weighted Least Squares*) and the EMSC (*Extended Multiplicative Scatter Correction*) was used to correct the Raman spectra. A *Savitzky-Golay* filter was used for smoothing. The Raman images of the cellular components were obtained by multivariate analysis MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution - Asymmetric Least Squares*), and the SERS images were obtained by univariate analysis based on the band of the MR.

The SERS and Raman images showed that the complexes are capable of entering the cells together with the AuNP, and cause damage to the nuclei, without the entrance of water into the cell, a characteristic not observed in other studied systems.

Another realized study was the characterization of a surface complex formed between 5-nitroisatin and silver nanoparticles (AgNP), using SERS and resonant Raman. The surface complex showed a massive electron delocalization when compared to the molecular species. This electron delocalization in the surface complex generated a new chromophore, not seen in the molecular complex. This chromophore has an electronic transition in the green region of the visible spectrum, while the molecular species transitions occur in higher energies.

Keywords: SERS, resonant Raman, *HeLa* cells, oxindoliminic complexes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura molecular do complexo de coordenação cisplatina.	21
Figura 2 - Estruturas químicas da A) Carboplatina e B) Oxaliplatina.	21
Figura 3 - Estruturas químicas do A) Triptofano e B) Ácido indoloacético.	23
Figura 4 - Preparação da isatina pela oxidação do corante índigo. Adaptada de Silva <i>et al.</i> ¹⁵	24
Figura 5 - Mecanismo de formação de imina partindo de isatina.	24
Figura 6 - Representação esquemática dos espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes a Raman anti-Stokes.	27
Figura 7 - Representações gráficas das funções dielétricas de alguns metais, onde ε_1 é a parte real e ε_2 a parte imaginária. ⁴⁴	36
Figura 8 - Representação esquemática da geração do plasmon de superfície. Adaptado de Fateixa <i>et al.</i> ⁴⁵	36
Figura 9 – Várias morfologias possíveis para nanopartículas de ouro. Adaptada de Dreaden <i>et al.</i> ⁴⁶	37
Figura 10 – Imagens TEM de algumas geometrias de nanopartículas de ouro e seus respectivos campos elétricos simulados. Adaptada de Mejía-Salazar <i>et al.</i> ⁴⁷	37
Figura 11 - Representação esquemática de um hot-spot e as diferentes localizações de um analito. Adaptada de Wei <i>et al.</i> ⁴⁸	38
Figura 12 – Representação esquemática das transições eletrônicas presentes no efeito químico. Retirada de Lombardi <i>et al.</i> ⁵⁰	39
Figura 13 - Representação esquemática da técnica MCR-ALS. Adaptada de Março <i>et al.</i> ⁵²	41
Figura 14 - Imageamento Raman de células HeLa 2220 cm ⁻¹ tratadas com o marcador MitoBADY após 5, 30 e 75 minutos. Adaptada de Yamakoshi <i>et al.</i> ⁵⁹	42
Figura 15 - Imageamento SERS de um macrófago incubado com o marcador identificando a presença e distribuição de peroxinitrito. Adaptada de Chen <i>et al.</i> ⁶¹ .	43
Figura 16 - Imagens obtidas através das três primeiras componentes obtidas por PCA de uma célula tumoral LN-18. Adaptada de Klein <i>et al.</i> ⁶²	43
Figura 17 - Reação de formação do ligante isatp.	45
Figura 18 - Reação de formação do complexo Cu(isatp).	45

Figura 19 - Reações mostrando a formação do ligante nisatp e o respectivo complexo Cu(nisatp).....	46
Figura 20 - Espectro SERS do complexo Cu(isatp) em $\lambda_0 = 785$ nm.	48
Figura 21 - Espectro SERS do complexo Cu(nisatp) em $\lambda_0 = 785$ nm.	48
Figura 22 - Imagens TEM de A) AuNP e B) AuNP com o complexo Cu(nisatp).	50
Figura 23 - Estrutura química do DTNB.....	51
Figura 24 - Representação esquemática da ligação do DTNB nas AuNP.	51
Figura 25 - Espectro SERS do DTNB em $\lambda_0 = 785$ nm.	52
Figura 26 - Espectro SERS da mistura entre Cu(isatp) e o MR em $\lambda_0 = 785$ nm.	53
Figura 27 - Espectro SERS da mistura entre Cu(nisatp) e o MR em $\lambda_0 = 785$ nm. ...	53
Figura 28 - Imagens ópticas das células do Grupo A mostrando o dano fototérmico depois das análises. Barra de escala: 20 μ m.	59
Figura 29 - Imagens ópticas das células do Grupo A. Barra de escala: 20 μ m.....	60
Figura 30 - Espectros obtidos do imageamento em 785 nm para a célula A1.....	61
Figura 31 - Espectros obtidos do imageamento em 532 nm para a célula A1.....	62
Figura 32 - Espectros do imageamento em 532 nm para a célula A1 após tratamento dos espectros.....	62
Figura 33 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532$ nm) e suas respectivas imagens para a célula A1.....	64
Figura 34 - Comparação entre a imagem óptica da célula A1 e a imagem obtida pela componente 2 do MCR-ALS.....	65
Figura 35 - Imagens ópticas das células do Grupo B. Barra de escala: 20 μ m.....	66
Figura 36 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532$ nm) e suas respectivas imagens para a célula B1.....	67
Figura 37 - Comparação entre a imagem óptica da célula B1 e a imagem obtida pela componente 2 do MCR-ALS.....	68
Figura 38 - Imagens ópticas das células do Grupo C. Barra de escala: 20 μ m.....	69
Figura 39 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532$ nm) e suas respectivas imagens para a célula C5.	70
Figura 40 - Imagens ópticas das células do Grupo D.....	71
Figura 41 - Espectros obtidos do imageamento em 785 nm para a célula D1.	72

Figura 42 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532$ nm) e suas respectivas imagens para a célula D1.....	74
Figura 43 - Imagens ópticas das células do Grupo E.	75
Figura 44 - Espectros SERS obtidos no imageamento da célula E1.....	75
Figura 45 - Comparação entre a imagem óptica da célula E1 e suas imagens Raman e SERS.	76
Figura 46 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532$ nm) e intensidade SERS da banda do MR e suas respectivas imagens para a célula E1.....	77
Figura 47 - Imagens ópticas das células do Grupo F.	78
Figura 48 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1 e 2 ($\lambda_0 = 532$ nm) e intensidade SERS da banda do MR e suas respectivas imagens para a célula F2.	79
Figura 49 - Imagens ópticas das células do Grupo G.....	80
Figura 50 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1 e 2 ($\lambda_0 = 532$ nm) e intensidade SERS da banda do MR e suas respectivas imagens para a célula G1. ...	81
Figura 51 - Equilíbrio química da nisa em solução na presença de uma base.....	83
Figura 52 - Espectros eletrônicos A) Experimentais e B) Teóricos dos compostos indicados na figura.	86
Figura 53 - Orbitais de fronteira envolvidos na transição de transferência de carga $\pi \rightarrow \pi^*$ obtidas por TDDFT. Da esquerda para a direita, para a nisa, Ag(nisa) e nisa ⁻ .	87
Figura 54 - Espectros Raman Experimental e Teórico para a nisa.	88
Figura 55 - Espectros Raman das espécies nisa sólida, nisa, Ag(nisa) e nisa ⁻ . Radiações excitantes especificadas na figura.....	89
Figura 56 - Espectros RR para as espécies A) nisa, B) Ag(nisa) e C) nisa ⁻ . As radiações excitantes (λ_0) são indicadas na figura.....	93
Figura 57 - Espectros SERS para o AgNP(nisa) em diferentes radiações excitantes (marcadas na figura).	94
Figura 58 - Orbitais de fronteira envolvidos na transição de transferência de carga do nível de Fermi do cluster de prata para a nisa obtidas por TDDFT.	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura química de alguns compostos com atividade biológica.....	22
Tabela 2. Valores aproximados da seção de choque σ por molécula relativo as suas respectivas técnicas experimentais.....	29
Tabela 3. Atribuição tentativa das bandas mais intensas dos complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp).....	49
Tabela 4. Atribuição tentativa das bandas mais intensas do DTNB.....	52
Tabela 5. Atribuição das bandas das 3 componentes obtidas por MCR-ALS das células controle.....	63
Tabela 6. Atribuição de algumas bandas presentes nos espectros SERS obtidos da célula D1.....	72
Tabela 7. Transições eletrônicas observadas experimentalmente.....	87
Tabela 8. Atribuição das bandas mais intensas do espectro Raman da nisa.....	88
Tabela 9. Frequências referentes aos modos normais do grupo nitro.....	90
Tabela 10. Frequências referentes aos modos normais das carbonilas.....	90

LISTA DE SIGLAS

AgNP	Nanopartículas de Prata
ALS	<i>Asymmetric Least Squares</i>
AuNP	Nanopartículas de Ouro
CT	Transferência de carga
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
ICS	<i>International Chemometrics Society</i>
IR	Infravermelho
Isa	Isatina
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
MCR	<i>Multivariate Curve Resolution</i>
Nisa	5-nitroisatina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RR	Raman Ressonante
SERS	<i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i>
SOD	Superóxido dismutase
TBAF	Fluoreto de tetrabutílamônio
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
WLS	<i>Weighted Least Squares</i>

SUMÁRIO

Apresentação da Dissertação.....	18
Capítulo 1 - Introdução Geral.....	20
1.1. Aspectos Farmacológicos e Medicinais da Química de Coordenação.....	20
1.2. Metalofármacos e Ligantes Oxindolimínicos.....	24
1.3. Efeito Raman.....	25
1.3.1. Equação KHD.....	30
1.3.2. Tratamento de Albrecht.....	31
1.4. Efeito SERS.....	33
1.4.1. Mecanismo eletromagnético do efeito SERS.....	34
1.4.2. Mecanismo químico do efeito SERS.....	38
1.5. Métodos Quimiométricos.....	40
1.5.1. MCR-ALS.....	40
1.6. Aplicações Espectroscópicas em Sistemas Biológicos.....	42
Capítulo 2 - Comportamento SERS de Complexos Oxindolimínicos.....	44
2.1. Introdução e Motivação.....	44
2.2. Objetivos.....	44
2.3. Materiais e Métodos.....	44
2.3.1. Síntese dos Complexos Oxindolimínicos.....	44
2.3.1.1. Cu(isatp).....	45
2.3.1.2. Cu(nisatp).....	46
2.3.2. Síntese das AuNP.....	46

2.3.2. Espectros SERS.....	47
2.4. Resultados e Discussão.....	47
2.4.1. Caracterização espectroscópica dos complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp).....	47
2.4.2. Marcador Raman - DTNB.....	50
2.4.3. Misturas entre os complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp) com o MR.....	53
2.5. Conclusões.....	54
Capítulo 3 - Imageamento Raman e SERS de Células <i>HeLa</i>	55
3.1. Introdução e Motivação.....	55
3.2. Materiais e Métodos.....	56
3.2.1. Preparação das Células <i>HeLa</i>	56
3.2.2. Preparação das Amostras para Imageamento.....	56
3.2.3. Imageamento SERS e Raman.....	56
3.2.4. Processamento e Análise dos Dados.....	57
3.3. Resultados e Discussão.....	58
3.3.1. Efeito fototérmico.....	58
3.3.2. Grupo A - Grupo Controle.....	60
3.3.2.1. Imageamento em 785 nm.....	60
3.3.2.2. Imageamento em 532 nm.....	61
3.3.3. Grupo B - Células tratadas com o complexo Cu(isatp).....	66
3.3.4. Grupo C - Células tratadas com o complexo Cu(nisatp).....	68
3.3.5. Grupo D - Células incubadas com AuNP.....	71

3.3.6. Grupo E - Células incubadas com o sistema AuNP\MR.....	75
3.3.7. Grupo F - Células incubadas com o sistema AuNP\MR\Cu(isatp).....	78
3.3.8. Grupo G – Células incubadas com o sistema AuNP\MR\Cu(nisatp).....	80
3.4. Conclusões.....	82
Capítulo 4 - Estudos de Transferência de Carga da 5-nitroisatina Adsorvida em Nanopartículas de Prata.....	83
4.1. Introdução e Motivação.....	83
4.2. Materiais e Métodos.....	84
4.2.1. Síntese das AgNP.....	84
4.2.2. Preparação das soluções da Nisa, Nisa ⁻ , Ag(nisa) e AgNP(nisa).....	84
4.2.3. Espectroscopia de Absorção Eletrônica.....	85
4.2.4. Espectroscopia Raman, Raman Ressonante e SERS.....	85
4.2.5. Metodologia Computacional.....	85
4.3. Resultados e Discussão.....	86
4.3.1. Espectroscopia de absorção eletrônica.....	86
4.3.2. Espectroscopia Raman e RR.....	88
4.3.3. SERS.....	93
4.4. Conclusões.....	95
5. Conclusões Gerais e Perspectivas.....	97
6. Referências Bibliográficas.....	98

7. Apêndices.....	112
Súmula Curricular.....	126

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Alguns complexos de coordenação são conhecidos por terem a capacidade de promover a apoptose de células de câncer, no entanto o mecanismo de ação destes complexos muitas vezes é obscuro, principalmente quando se trata de novos complexos que ainda estão sendo testados. Existem técnicas consagradas no ramo da bioquímica e química inorgânica medicinal, como a técnica de fluorescência, com a qual somente é possível obter informações indiretas da ação destes compostos.

Sendo assim, o principal objetivo desta dissertação foi a obtenção de dados de novos complexos baseados em cobre, que possuem atividade antitumoral, utilizando a espectroscopia Raman e um de seus efeitos de intensificação, o efeito SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*).

Para tanto primeiro foi estudado o comportamento SERS de dois complexos oxindolímínicos de cobre em AuNP (nanopartículas de ouro), ou seja, seu comportamento fora do meio biológico. Foi constatado nestes experimentos que os complexos não apresentam grande intensificação dos modos vibracionais além de agregarem facilmente o colóide de ouro, levando a conclusão que, para a utilização *in vitro* seria necessário o uso de um MR (marcador Raman). O marcador utilizado foi o DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)), que então fez parte da sonda: AuNP + MR + complexos. Foi constatado que não há interação química destas duas substâncias, então essas sondas foram utilizadas com o objetivo de identificar onde seria a atuação dos complexos dentro das células tumorais.

Os experimentos *in vitro* consistiram no mapeamento Raman e SERS de células *HeLa* vivas. Como a quantidade de dados obtidos para cada célula é muito grande, cerca de 2000 espectros por célula, foi necessária a utilização de técnicas quimiométricas para o tratamento e interpretação dos dados. O método utilizado foi o MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution - Asymmetric Least Squares*). Os resultados obtidos apontaram que os complexos estudados foram capazes de

entrar na célula e danificar seu conteúdo nuclear sem danificar a membrana celular.

Outro estudo realizado nesta dissertação foi o efeito RR (Raman Ressonante) e SERS da 5-nitroisatina, um dos reagentes de partida para a síntese de ligantes oxindolimínicos. Através dos resultados RR da 5-nitroisatina, de seu ânion e de seu complexo de prata foi possível discutir as CT (transferências de carga) existentes no complexo de superfície 5-nitroisatina/AgNP (nanopartículas de prata), provenientes do mecanismo químico do efeito SERS.

Capítulo 1. Introdução Geral

1.1. Aspectos Farmacológicos e Medicinais da Química de Coordenação

Compostos contendo íons metálicos têm sido usados para o tratamento de doenças desde os tempos ancestrais. O potencial terapêutico de metais já era conhecido pelos povos antigos do Egito, Mesopotâmia e China, que os utilizavam em preparações farmacêuticas¹. O metal cobre era utilizado pelos egípcios para esterilizar água e ouro era utilizado numa vasta gama de medicamentos produzidos pelos povos da China e do Oriente Médio.

Alguns metais de transição são vitais para o funcionamento das células nos organismos, os chamados metais essenciais. Alguns dos que podem ser citados são o ferro, que participa ativamente no transporte de oxigênio e dióxido de carbono via hemoglobina, o zinco, que é constituinte de algumas enzimas como polimerases (que catalisam a polimerização de ácidos nucleicos) e hidrolases (que catalisam a cisão de compostos utilizando água) e o cobre, que faz parte da formação de enzimas SOD (Superóxido Dismutase - que catalisam a dismutação da espécie superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio).

O desbalanço na concentração ou na distribuição de metais dentro das células está associado a várias doenças, especialmente doenças neurodegenerativas, infecções e câncer². Em tempos mais recentes, complexos metálicos, que se enquadram na definição de metalofármacos, despertaram enorme interesse para aplicações em doenças degenerativas, como câncer e artrite reumatoide. Por esta razão o monitoramento dos níveis desses metais, após tratamento ou incubação com potenciais metalofármacos, têm levado a um melhor entendimento dos seus possíveis mecanismos de ação e ao desenvolvimento de novos compostos com maior eficiência e ou seletividade.

Um dos primeiros metalofármacos utilizado em grande extensão foi a cis-diaminodicloroplatina(II), conhecido comercialmente como cisplatina, cuja estrutura está apresentada na figura 1. A cisplatina foi sintetizada pela primeira

vez em 1844, sua estrutura foi elucidada por Alfred Werner em 1893 e sua utilização como fármaco remete as pesquisas de Rosenberg *et al.* em 1965³.

Figura 1 - Estrutura molecular do complexo de coordenação cisplatina.

A cisplatina é utilizada para o tratamento quimioterápico de uma vasta gama de carcinomas devido sua habilidade de interferir no DNA e causar subsequente apoptose da célula, no entanto vários efeitos adversos são observados durante o tratamento como problemas renais, reações alérgicas, hemorragias entre outros⁴. Um dos motivos destes problemas é o fato da platina ser um metal não essencial para o organismo. Devido a isso outros metalofármacos, ainda baseados em platina, foram sintetizados como a carboplatina⁵ e a oxaliplatina⁶, cujas estruturas estão representadas na figura 2, buscando maior eficiência no tratamento com menos efeitos adversos, através da modificação do ligante.

Figura 2 - Estruturas químicas da A) Carboplatina e B) Oxaliplatina.

Uma estratégia no campo da química inorgânica medicinal é a preparação de complexos metálicos com íons essenciais e com ligantes inspirados em compostos que já demonstraram alguma atividade biológica interessante. Pode-se citar como exemplos desses ligantes a penicilamina, o 2,4-dinitrofenol, as quinolinas como o clioquinol e os oxindóis, como a isatina, cujas estruturas são mostradas na tabela 1.

Tabela 1. Estrutura química de alguns compostos com atividade biológica.

Estrutura Molecular	Nome
Penicilamina
2,4-dinitrofenol
Clioquinol
Isatina

A coordenação do ligante ao íon metálico confere uma carga permanente ao ligante, além de tornar mais rígida sua geometria ou conformação, o que pode facilitar sua interação com biomoléculas cruciais como o DNA ou outras proteínas específicas. O ligante, por sua vez, modifica o potencial de redução do íon metálico, tornando-o mais facilmente reduzível ou oxidável devido a modificações em sua esfera de coordenação. Essas mudanças podem facilitar a inserção celular, as interações em sítios ativos de proteínas ou até mesmo no próprio DNA, através de ligações não-covalentes ou de intercalações. Considerando essas propriedades pode haver um ganho na reatividade do complexo inorgânico e uma ampliação de seus possíveis modos de atuação no meio biológico.

Uma classe de compostos com várias propriedades interessantes, tanto do ponto de vista biológico como medicinal, é a dos indóis e oxindóis. Indóis constituem compostos endógenos, ou seja, são encontrados naturalmente em sistemas biológicos, como o aminoácido triptofano (figura 3A), e quando oxidados dão origem a ácidos indólicos, como o ácido indoloacético (figura 3B), ou oxindóis, como a isatina.

Figura 3 - Estruturas químicas do A) Triptofano e B) Ácido indoloacético.

A isatina é formada no metabolismo de indóis e encontrada em fluidos e tecidos de mamíferos. Derivados halogenados da isatina, especialmente os bromados, são encontrados em moluscos gastrópodes, como o *Dicathais orbita*, encontrado na Austrália⁷, e em algas marinhas, especialmente as vermelhas⁸. Alguns destes produtos naturais já foram descritos como antidepressivos⁹ ou antitumorais¹⁰.

Complexos de isatina e seus derivados com os metais cobre e zinco são sintetizados, caracterizados e suas propriedades farmacológicas são determinadas no laboratório da Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira (IQ-USP). Os resultados obtidos mostram que estes complexos apresentam um grande potencial como agentes terapêuticos.

Apesar do intenso progresso observado nas últimas décadas nas investigações de metalofármacos, os únicos agentes terapêuticos baseados em complexos metálicos aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) são a cisplatina, a carboplatina e a oxaliplatina como fármacos antitumorais baseados em platina, e a aurofina contra artrite reumatoide, baseada em ouro.

1.2. Metalofármacos de Ligantes Oxindolimínicos

A isatina foi obtida pela primeira vez por Otto Erdmann em 1840 a partir da oxidação do corante índigo¹¹ (figura 4) e foi considerada de origem puramente sintética até sua descoberta em plantas do gênero *Isatis* na década de 80. É um composto endógeno e está presente em humanos e outros mamíferos¹², no entanto suas vias metabólicas ainda não estão bem esclarecidas. Várias propriedades farmacêuticas da isatina e seus derivados já foram relatadas na literatura como antimaláricos, antituberculosos¹³ e antifúngicos¹⁴.

Figura 4 - Preparação da isatina pela oxidação do corante índigo. Adaptada de Silva *et al.*¹⁵

Uma das reações mais utilizadas para a formação de derivados da isatina é a formação de bases de Schiff, ou iminas, já que a isatina apresenta uma carbonila passível de reagir com aminas primárias dando origem à compostos oxindolimínicos (oxindol com um grupo imina) como representado na figura 5.

Figura 5 - Mecanismo de formação de imina partindo de isatina.

Vários ligantes oxindolímínicos e seus respectivos complexos de coordenação já foram preparados e atividades de clivagem de DNA¹⁶, inibição de topoisomerasas¹⁷, inibição de quinases¹⁸ e formação de espécies reativas de oxigênio¹⁹ foram observadas. Tendo em vista a citotoxicidade, complexos contendo cobre se mostram mais eficazes que os correspondentes de zinco, devido a sua atividade redox ou pela sua maior inserção nas células¹⁷.

A atividade destes compostos *in vitro* geralmente é realizada por ensaios colorimétricos baseado no corante brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio, comumente chamado de MTT, que permite quantificar a atividade metabólica das células depois de um período de tempo de ação de certa substância. A localização dessas moléculas dentro das células pode ser determinada através de técnicas espectroscópicas. Uma das técnicas mais empregadas é a fluorescência²⁰⁻²². Nesta técnica um fluoróforo é adicionado ao sistema e com isso é possível visualizar, após a adição de um fármaco, mudanças estruturais em certas regiões da célula em decorrência da atuação do fármaco.

Outras técnicas com essas finalidades vêm sendo empregadas nos últimos anos, como a microscopia Raman confocal, aliada por vezes a um de seus mecanismos de intensificação, o efeito SERS (referências podem ser encontradas no item 1.6).

1.3. Efeito Raman

O efeito Raman se baseia no espalhamento inelástico da luz pela matéria e foi observado experimentalmente pela primeira vez por C. V. Raman em 1928²³.

Quando uma radiação monocromática incide sobre a matéria ocorre a interação dos fótons incidentes com a nuvem eletrônica da molécula e assim é gerado um momento de dipolo induzido, dado pela equação 1:

$$\vec{P} = \alpha \cdot \vec{E} \quad (1)$$

Onde:

$\vec{P}$ é o vetor do momento de dipolo induzido;

α é a polarizabilidade eletrônica;

$\vec{E}$ é o vetor do campo elétrico incidente.

O dipolo induzido gerado é modulado pelas vibrações moleculares, em outras palavras, pelos modos normais de vibração das moléculas (Q). A quantidade de modos normais em uma molécula não linear é definida pela equação 2:

$$Q = 3N - 6 \quad (2)$$

Onde:

Q é a quantidade de modos normais;

N é o número de átomos presentes na molécula.

A polarizabilidade eletrônica (α), que será referida somente como polarizabilidade, é a propriedade que governa a modulação do dipolo induzido na molécula e que mede a facilidade de deformação da nuvem eletrônica frente a uma perturbação, que neste caso é o campo elétrico ($\vec{E}$). A polarizabilidade (equação 3) é um tensor de segunda ordem e pode ser escrito em relação aos eixos do espaço x , y e z , chegando aos componentes do momento de dipolo induzido em cada coordenada normal (Q_k). O índice 0 em cada elemento do tensor indica que é a derivada no ponto de equilíbrio.

$$\alpha_k = \begin{bmatrix} \left(\frac{\partial \alpha_{xx}}{\partial Q_k} \right)_0 & \left(\frac{\partial \alpha_{xy}}{\partial Q_k} \right)_0 & \left(\frac{\partial \alpha_{xz}}{\partial Q_k} \right)_0 \\ \left(\frac{\partial \alpha_{yx}}{\partial Q_k} \right)_0 & \left(\frac{\partial \alpha_{yy}}{\partial Q_k} \right)_0 & \left(\frac{\partial \alpha_{yz}}{\partial Q_k} \right)_0 \\ \left(\frac{\partial \alpha_{zx}}{\partial Q_k} \right)_0 & \left(\frac{\partial \alpha_{zy}}{\partial Q_k} \right)_0 & \left(\frac{\partial \alpha_{zz}}{\partial Q_k} \right)_0 \end{bmatrix} \quad (3)$$

Onde:

α_k é a polarizabilidade referente a cada modo normal Q_k .

O espalhamento dos fótons pode ocorrer com variações nos níveis rotacionais e vibracionais das moléculas. Se os fótons espalhados possuem a mesma energia dos fótons incidentes o espalhamento é elástico e é conhecido como espalhamento Rayleigh. Se os fótons espalhados possuem energia diferente da dos fótons incidentes o espalhamento é inelástico e é conhecido como espalhamento Raman.

No entanto os fótons espalhados inelasticamente podem ter energia menor ou maior que os fótons incidentes. No caso de possuir energia menor o espalhamento é denominado Stokes, e energia maior anti-Stokes. A figura 6 mostra, esquematicamente, os processos de espalhamento Rayleigh e Raman Stokes e anti-Stokes, onde $h\nu_0$ é a energia da radiação incidente e $h\nu'$ é a energia da radiação espalhada. No caso do espalhamento Stokes a variação de energia ΔE é equivalente a energia de uma transição vibracional do estado vibracional fundamental para o primeiro estado vibracional excitado, no estado eletrônico fundamental (g).

Figura 6 - Representação esquemática dos espalhamentos Rayleigh, Raman Stokes e Raman anti-Stokes.

O espalhamento Raman somente pode ocorrer se houver variação da polarizabilidade (α), em pelo menos uma das suas componentes α_{ij} (onde ij corresponde a x , y ou z), com as coordenadas normais de vibração (Q_k). Sendo assim, para um modo vibracional ser ativo no Raman é necessário que:

$$\left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right) \neq 0 \quad (4)$$

Como a polarizabilidade depende das coordenadas normais esta pode ser escrita numa série de Taylor:

$$\alpha_{ij} = \alpha_0 + \sum_k^{3N-6} \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 Q_k + \sum_k^{3N-6} \sum_l^{3N-6} \left(\frac{\partial^2 \alpha_{ij}}{\partial Q_k \partial Q_l} \right)_0 Q_k Q_l + \dots (5)$$

Considerando uma única coordenada normal (Q_k), truncando a série em seu segundo termo, e considerando a equação que descreve o campo eletromagnético (equação 6), obtém-se a equação 7.

$$\vec{E} = \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) \quad (6)$$

$$\vec{P} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos(2\pi\nu_0 t) + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_k} \right)_0 Q_{k_0} \vec{E}_0 \{ \cos[2\pi(\nu_0 + \nu_v)t] + \cos[2\pi(\nu_0 - \nu_v)t] \} \quad (7)$$

O primeiro termo do lado direito da equação 7 corresponde ao espalhamento Rayleigh. Já no segundo termo é apresentada a contribuição do espalhamento inelástico, sendo o termo $\nu_0 + \nu_v$ correspondente ao espalhamento Raman anti-Stokes e o termo $\nu_0 - \nu_v$ correspondente ao espalhamento Raman Stokes.

Até o presente momento foi apresentada a formulação clássica do efeito Raman, entretanto para melhor explicar os efeitos de intensificação Raman (RR e SERS) é necessário um tratamento quântico do efeito. Uma transição vibracional, entre dois estados vibracionais m e n do estado eletrônico fundamental, é dada pela integral do momento de transição:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = \int \Psi_m \alpha_{ij} \Psi_n d\tau \quad (8)$$

Onde:

Ψ_m é a função de onda do estado vibracional excitado;

Ψ_n é a função de onda do estado vibracional fundamental;

α_{ij} é o operador polarizabilidade.

Considerando novamente a expressão expandida em série de Taylor, mostrada na equação 5, se obtém:

$$(\alpha_{ij})_{mn} = (\alpha_{ij})_0 \int \Psi_m \Psi_n d\tau + \sum_{Q_k}^{3N-6} \left(\frac{\partial \alpha_{ij}}{\partial Q_k} \right)_0 \int \Psi_m Q_k \Psi_n d\tau + \dots \quad (9)$$

E para que a transição Raman seja permitida, considerando ainda a equação 4, referente à regra de seleção para o espalhamento Raman, obtém-se:

$$\int \Psi_m Q_k \Psi_n d\tau \neq 0 \quad (10)$$

A partir da equação 10, considerando um oscilador harmônico, é possível obter a regra de seleção de $\Delta v = \pm 1$.

Uma das desvantagens do efeito Raman, por ser um processo de espalhamento que envolve dois fótons, é apresentar uma baixa seção de choque, que é definida como a probabilidade de certo evento ocorrer. Na tabela 2 é apresentada a seção de choque entre várias técnicas espectroscópicas, e como pode ser visto a espectroscopia Raman é uma das técnicas que apresenta menor seção de choque.

Tabela 2. Valores aproximados da seção de choque σ por molécula relativo as suas respectivas técnicas experimentais.

Técnica	Fenômeno	σ (cm²/molécula)
UV-VIS ²⁴	Absorção	10 ⁻¹⁸
IR ²⁵	Absorção	10 ⁻²¹
Fluorescência ²⁵	Emissão	10 ⁻¹⁹
Rayleigh ²⁶	Espalhamento	10 ⁻²⁶
Raman ²⁷	Espalhamento	10 ⁻²⁹
RR ²⁷	Espalhamento	10 ⁻²⁴
SERS ²⁸	Espalhamento	10 ⁻¹⁶
SER(R)S ^{29,30}	Espalhamento	10 ⁻¹⁵

Os fenômenos de intensificação do efeito Raman, como o RR e o SERS, que serão detalhados mais a frente, possuem seções de choque muito maiores e é possível se aproveitar desses efeitos para obter informações específicas de analitos em baixas concentrações.

Para discutir as propriedades do efeito RR é necessário apresentar a equação de Dispersão de Kramers-Heisenberg-Dirac (KHD), que é obtida por sua vez através da teoria de perturbação de segunda ordem dependente do tempo. A dedução dessas equações podem ser encontradas em outras referências³¹⁻³³.

1.3.1. Equação KHD

A equação KHD possibilita o cálculo dos componentes do tensor de polarizabilidade (α), além de mostrar de maneira direta a correlação entre a espectroscopia Raman e a espectroscopia de absorção eletrônica. A equação KHD está apresentada na equação 11:

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{gn,gm} = \frac{1}{\hbar c} \sum_{ev} \left[\frac{\langle n | (\mu_{\rho})_{ge} | v \rangle \langle v | (\mu_{\sigma})_{eg} | m \rangle}{\tilde{\nu}_{ev,gm} - \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{ev}} + \frac{\langle n | (\mu_{\sigma})_{ge} | v \rangle \langle v | (\mu_{\rho})_{eg} | m \rangle}{\tilde{\nu}_{ev,gm} + \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{ev}} \right] \quad (11)$$

Nesta equação ρ e σ representam as componentes x , y e z do tensor da polarizabilidade, g e e representam os estados eletrônicos fundamental e excitado. m e n são os estados vibracionais do estado eletrônico fundamental e v o estado vibracional do estado eletrônico excitado. Γ_{ev} é conhecido como o fator de amortecimento, que é relacionado ao tempo de vida do estado excitado e .

A medida que a frequência da radiação excitante se aproxima da frequência de uma transição eletrônica permitida o primeiro termo do somatório aumenta devido ao decréscimo do denominador, o qual é chamado de denominador de ressonância, acarretando num aumento do tensor de polarizabilidade, enquanto que o segundo termo se torna desprezível e pode ser desconsiderado. Além disso, na condição de ressonância, o somatório sobre

todos os estados excitados pode ser reduzido a um único termo contendo o estado excitado.

Tomando como exemplo o corante rodamina 6G, que possui uma transição eletrônica permitida por volta de 530 nm, quando se incide uma radiação com energia próxima a essa transição eletrônica, num experimento de RR, ocorre uma intensificação dos modos normais referentes ao grupo cromofórico que dá origem à transição eletrônica.

1.3.2. Tratamento de Albrecht

Como pode ser visto na equação 11 o numerador é composto por transições eletrônicas entre estados vibrônicos do estado fundamental (gm, gn) e excitado (ev). No tratamento de Albrecht essas funções são separadas em suas respectivas partes eletrônica e vibracional. Por sua vez a função eletrônica é escrita como uma função não perturbada (g_0) e uma parte perturbada, que contém a variação de energia com o modo normal de vibração.

Levando em consideração esse tratamento e lembrando que o operador de momento de dipolo opera somente na função eletrônica, o tensor de polarizabilidade (α) no tratamento de Albrecht é dado por quatro termos, denominados A, B, C e D. As equações para os dois primeiros termos estão apresentadas abaixo. As equações dos termos C e D foram omitidas por se tratarem de contribuições muito pequenas, no entanto uma breve explicação de cada contribuição será feita.

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{gn, gm} = A + B + C + D \quad (12)$$

$$A = \frac{1}{\hbar c} (\mu_\rho)_g^0 (\mu_\sigma)_e^0 \sum_v \frac{\langle n_g | v_e \rangle \langle v_e | m_g \rangle}{\tilde{\nu}_{ev, gm} - \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{ev}} \quad (13)$$

O termo A deste tratamento indica que as integrais de recobrimento devem ser diferentes de zero, pelo menos para um valor de v . Além disso a transição eletrônica ressonante deve ser permitida por dipolo elétrico, como

bandas geradas por transferência de carga ou transições do tipo $\pi-\pi^*$. Neste caso somente modos normais totalmente simétricos são intensificados. O termo B, por sua vez, é dado pela equação abaixo:

$$B = \frac{1}{h^2 c^2} \sum_{s \neq e} (\mu_\rho)_{gs}^0 (\mu_\sigma)_{eg}^0 \frac{h_{se}^k}{\Delta \tilde{\nu}_{se}} \sum_v \frac{\langle n_g | Q_k | v_e \rangle \langle v_e | m_g \rangle}{\tilde{\nu}_{ev, gm} - \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{ev}} + \frac{1}{h^2 c^2} \sum_{s \neq e} (\mu_\rho)_{ge}^0 (\mu_\sigma)_{sg}^0 \frac{h_{es}^k}{\Delta \tilde{\nu}_{es}} \sum_v \frac{\langle n_g | v_e \rangle \langle v_e | Q_k | m_g \rangle}{\tilde{\nu}_{eg, gm} - \tilde{\nu}_0 + i\Gamma_{ev}} \quad (14)$$

O termo B deste tratamento tem uma contribuição do acoplamento vibrônico entre dois estados eletrônicos, denominados e e s , cuja separação energética é pequena. Tão maior será a intensificação dada por este termo quanto maior o grau deste acoplamento. Em geral este termo é menor do que o termo A, e tanto modos totalmente simétricos como não-totalmente simétricos são intensificados.

O termo C envolve acoplamento vibrônico do estado eletrônico fundamental e um estado eletrônico excitado e o termo D pode dar informações de bandas harmônicas e de combinação de modos totalmente e não-totalmente simétricos. Porém, como já foi discutido, a contribuição destes termos é muito pequena.

Levando em consideração essas informações pode se notar que a espectroscopia Raman Ressonante é uma técnica poderosa para se estudar o comportamento eletrônico das moléculas, mesmo sendo uma técnica vibracional. Experimentos de RR são capazes de mostrar informações sobre grupos cromofóricos de grandes moléculas, e esta intensificação é usada, por exemplo, para o imageamento de mitocôndrias em células vivas, já que estas organelas apresentam o grupo heme, um anel porfirínico com uma grande absorção eletrônica na região do espectro visível³⁴.

Além da espectroscopia Raman ser uma espectroscopia vibrônica ela é uma espectroscopia plasmônica de superfície, através do seu efeito de intensificação chamado SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*), visto que

o efeito SERS ocorre somente quando existe nanoestruturas plasmônicas, que será apresentado a seguir.

1.4. Efeito SERS

O efeito SERS foi observado pela primeira vez em meados da década de 1970 por Fleischmann, Hendra e McQuillan³⁵ enquanto estudavam, por espectroscopia Raman, um eletrodo de prata que havia sofrido vários ciclos de oxidação e redução em solução contendo KCl (cloreto de potássio) e piridina. Uma grande intensificação de algumas bandas da piridina foi observada, no entanto a explicação para este fenômeno não era clara. Primeiramente foi atribuído, pelos autores, que o aumento da área superficial do eletrodo (devido aos ciclos de oxidação e redução) levava a uma maior quantidade de piridina na superfície do eletrodo.

Cálculos realizados por van Duyne e Jeanmarie³⁶ mostraram que esta intensificação observada não poderia ser explicada somente através do aumento de área superficial e na mesma época Albrecht e Creighton³⁷ reportaram resultados embasando ainda mais a hipótese da existência de um novo efeito de intensificação, que posteriormente levou o nome de efeito SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*). Os ciclos de oxidação-redução realizados nestes experimentos promoviam a formação de nanoestruturas na superfície do eletrodo, e são essas nanoestruturas plasmônicas que são o ponto chave para a intensificação do sinal Raman.

Atualmente o efeito SERS é reconhecido como uma importante técnica analítica devido ao efeito de intensificação que permite a identificação qualitativa e possivelmente quantitativa de analitos em diferentes meios. Por outro lado a técnica SERS permite o estudo de espécies em superfícies³⁸, monitoramento de reações químicas³⁹ e, ainda mais recentemente, caracterização de espécies no meio biológico⁴⁰⁻⁴².

Observando novamente a equação 1 pode-se observar que há duas maneiras de intensificar um sinal Raman:

$$\vec{P} = \alpha \cdot \vec{E}$$

Uma é através da intensificação do termo (α). Esse mecanismo de intensificação é denominado mecanismo químico do efeito SERS, que é correlacionado com a mudança na polarizabilidade da molécula por conta de uma transferência de carga metal/molécula. Considerando agora a intensificação do termo ($\vec{E}$). Esse mecanismo de intensificação é chamado mecanismo eletromagnético do efeito SERS, que é correlacionado com uma intensificação do campo eletromagnético local promovido pela excitação dos *plasmons* de superfície das nanoestruturas metálicas. A seguir será brevemente detalhado cada um desses mecanismos.

1.4.1 Mecanismo eletromagnético do efeito SERS

No mecanismo eletromagnético ocorre a intensificação do campo eletromagnético da radiação incidente e da radiação espalhada nas proximidades de uma partícula metálica nanoestruturada. Este efeito é puramente um efeito de campo e não altera a polarizabilidade da molécula, portanto não existe uma correlação da natureza da interação química adsorbato-superfície. Este também é considerado o mecanismo que possui a maior contribuição para a intensificação SERS.

Considerando uma partícula metálica esférica muito menor que o comprimento de onda da radiação incidente, a resposta da esfera a esse campo externo pode ser descrita pelo dipolo induzido na equação abaixo:

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \varepsilon_m g_0 \vec{E}_0 \quad (15)$$

Onde:

ε_0 é a permissividade no vácuo;

ε_m é a constante dielétrica do meio;

$\vec{E}_0$ é o campo elétrico incidente, numa dada frequência ω_0 .

O fator g_0 é derivado da teoria de Mie para a dispersão de radiação eletromagnética e pode ser definido como:

$$g_0 = \frac{\varepsilon(\omega_0) - \varepsilon_m}{\varepsilon(\omega_0) + 2\varepsilon_m} \quad (16)$$

A constante dielétrica do metal (ε_m) é um número complexo, tendo uma parte real ($\text{Re}[\varepsilon]$), relacionada com o espalhamento da radiação incidente pela nanopartícula, e uma parte imaginária ($\text{Im}[\varepsilon]$), relacionada com a absorção dessa radiação. Analisando a equação 16 pode-se inferir que para o fator g_0 ser muito grande, e conseqüentemente o dipolo induzido ser grande, necessita-se que:

$$\text{Re}[\varepsilon] + 2\varepsilon_m \rightarrow 0 \text{ e } \text{Im}[\varepsilon] \rightarrow 0$$

Levando em consideração os fatores acima somente alguns metais satisfazem a condição de serem bons substratos plasmônicos para SERS. A figura 7 traz dois gráficos que dizem respeito as funções dielétricas alguns metais, sendo que o ε_1 representa a parte real ($\text{Re}[\varepsilon]$) da função dielétrica e ε_2 a parte imaginária ($\text{Im}[\varepsilon]$). Analisando os dados verifica-se que os metais que apresentam uma melhor resposta na faixa da radiação visível são Au, Ag e Cu. Outros metais como Pt e Pd também são utilizados, no entanto a eficiência na intensificação do sinal Raman não é tão grande⁴³.

Figura 7 - Representações gráficas das funções dielétricas de alguns metais, onde ϵ_1 é a parte real e ϵ_2 a parte imaginária.⁴⁴

Estes metais nanoestruturados provocam uma intensificação do campo eletromagnético próximo quando uma radiação incidente é próxima, em frequência, do *plasmon* da estrutura. A radiação incidente provoca uma oscilação coletiva dos elétrons da superfície metálica gerando um *plasmon* de superfície localizado, também chamado de LSPR (*Localized Surface Plasmon Resonance*), como mostrado esquematicamente na figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática da geração do plasmon de superfície. Adaptado de Fateixa *et al.*⁴⁵

Além da constituição química da nanoestrutura plasmônica outro fator a ser considerado é a morfologia da estrutura. Diferentes morfologias apresentam intensificações diferentes por conta de como o campo é concentrado em sua superfície. Na figura 9 é possível visualizar várias morfologias possíveis para nanopartículas. Diferentes metodologias de síntese geram diferentes morfologias, cada qual com a sua complexidade.

Figura 9 – Várias morfologias possíveis para nanopartículas de ouro. Adaptada de Dreaden *et al.*⁴⁶

Simulações de DDA (*Discrete Dipole Approximation*) são úteis para visualizar como o LSPR se comporta frente a diferentes geometrias de materiais plasmônicos. Na figura 10 alguns exemplos de cálculos de campo elétrico por DDA são mostrados para algumas geometrias.

Figura 10 – Imagens TEM de algumas geometrias de nanopartículas de ouro e seus respectivos campos elétricos simulados. Adaptada de Mejía-Salazar *et al.*⁴⁷

Quando duas nanopartículas estão próximas a intensificação do campo eletromagnético é ainda maior devido a formação dos chamados *hot-spots*, onde há interferência construtiva do campo eletromagnético e, por consequência, uma maior intensificação, como representado na figura 11.

Figura 11 - Representação esquemática de um hot-spot e as diferentes localizações de um analito. Adaptada de Wei *et. al.*⁴⁸

1.4.2. Mecanismo químico do efeito SERS

No mecanismo químico é considerado que há uma transferência de carga no sistema metal-molécula e essa transferência de carga leva a alterações eletrônicas na molécula, mudando sua polarizabilidade e, por consequência, sua seção de choque. Estudos mostram que a intensificação gerada no efeito SERS pelo mecanismo químico é uma pequena fração da intensificação total⁴⁹.

O tratamento de Lombardi *et al.*⁵⁰ para esta questão se refere a transferências de carga metal-molécula ou molécula-metal, como esquematizado na figura 12, onde $\langle K \rangle$ e $\langle I \rangle$ são os níveis eletrônicos moleculares, nos quais uma transição é permitida, e ω_A e ω_B são os níveis contínuos da banda de condução do metal. ω_F representa o nível de Fermi do metal.

Figura 12 – Representação esquemática das transições eletrônicas presentes no efeito químico. Retirada de Lombardi *et al.*⁵⁰

A principal ideia do mecanismo químico é que o processo de adsorção químico do adsorbato com a superfície metálica envolve interações eletrônicas dos orbitais moleculares da molécula adsorvida com os elétrons da banda de condução do metal e por consequência a intensificação ocorre devido a essa transferência de carga. Outros fatores também podem ser considerados como apontado por Jensen *et al.*⁵¹

Assim como apontado para o efeito RR, o efeito SERS é de grande valia para a análise de sistemas altamente diluídos, pois como a seção de choque é drasticamente aumentada, é possível utilizar esse efeito de intensificação para outros tipos de análises que não poderiam ser realizadas utilizando somente o efeito Raman normal.

Como analisar os dados experimentais obtidos é um outro ponto importante nesta dissertação. Cada vez mais, devido à complexidade dos sistemas químicos e os avanços tecnológicos para seus estudos, se faz necessário um estudo estatístico para extrair o máximo de informações relevantes para o sistema em estudo. Este ramo da química é denominado quimiometria, e seus métodos estatísticos associados serão brevemente relatados a seguir.

1.5. Métodos Quimiométricos

A quantidade de informação contida em sinais que provém de experimentos que utilizam uma instrumentação moderna é notavelmente grande e, geralmente, essas informações relevantes associadas às relações internas entre as variáveis que compõem os sinais instrumentais não podem ser extraídas por métodos univariados convencionais.

A quimiometria é uma área relativamente nova da química e a ICS (*International Chemometrics Society*) traz uma definição de quimiometria como:

"Chemometrics is the science of relating measurements made on a chemical system or process to the state of the system via application of mathematical or statistical methods."

Devido à complexidade dos sistemas biológicos, análises quimiométricas são imprescindíveis para uma análise dos dados obtidos que são relevantes. Técnicas como PCA, MCR-ALS, análise de clusters entre tantas outras são amplamente utilizadas em análises biológicas. Neste trabalho somente a técnica MCR-ALS foi utilizada devido ao fato que as características dos cálculos envolvidos oferecem a possibilidade de interpretação química ou física dos fatores obtidos, vantagem que outros métodos de decomposição ou resolução de sinais, como por exemplo o PCA, não oferecem.

1.5.1. MCR-ALS

A técnica de MCR-ALS extrai informações de uma mistura de sinais através de um cálculo de resolução de uma matriz de dados experimentais, gerando o produto de duas matrizes denominadas matriz de componentes puras e matriz de concentrações relativas, mais uma matriz residual. Matematicamente pode ser descrita pela equação 17:

$$D = CS^T + E \quad (17)$$

Onde a matriz D é a matriz de dados experimentais original, C é a matriz de concentrações, S^T é a matriz das componentes puras e a matriz E é uma matriz de erros, em outras palavras, uma matriz que contém dados que não são explicados pelo modelo. A figura 13 representa esquematicamente o funcionamento desta técnica:

Figura 13 - Representação esquemática da técnica MCR-ALS. Adaptada de Março *et al.*⁵²

Em um mapeamento existem as coordenadas cartesianas x e y , além de de uma dimensão espectral λ . Aplicando esta técnica quimiométrica é possível extrair informações de componentes puras e suas respectivas distribuições no imageamento. Esta técnica vem sendo cada vez mais utilizada no âmbito de amostras biológicas^{53–56}. Javier *et al.*⁵⁷ criaram um substrato SERS em papel que, em conjunto com o MCR-ALS, é possível quantificar amostras de ácido úrico utilizando um espectrômetro Raman portátil e que não necessita de prévia preparação de amostra.

Em outro caso o MCR-ALS foi aplicado por Mamián-Lopez *et al.*⁵⁸ para estudar o par adenina-timina, formado por ligações de hidrogênio, e assim diminuir o limite de detecção da timina utilizando a técnica SERS.

1.6. Aplicações Espectroscópicas em Sistemas Biológicos

A espectroscopia, em especial a vibracional, vêm sendo cada vez mais utilizada em sistemas biológicos devido a vasta gama de informações que podem ser obtidas. Diferentemente da espectroscopia de fluorescência, que necessita da utilização de marcadores específicos, a espectroscopia Raman e IR são altamente específicas, pois cada molécula possui um *fingerprint* que pode ser facilmente identificado. Além disso essas técnicas são muito sensíveis a mudanças estruturais em componentes biológicos (proteínas, lipídios etc.) que podem ser identificadas através de variações espectrais.

A técnica de imageamento também vem sendo amplamente aplicada para localização de estruturas intracelulares. Yamakoshi *et al.*⁵⁹ desenvolveram um marcador Raman que possui afinidade eletrostática por mitocôndrias e possui uma banda na região silenciosa do espectro Raman de células (1800 – 2800 cm^{-1} ⁶⁰). Na figura 14 é apresentado o imageamento das mitocôndrias realizado no trabalho juntamente com a estrutura do marcador desenvolvido.

Figura 14 - Imageamento Raman de células HeLa 2220 cm^{-1} tratadas com o marcador MitoBADY após 5, 30 e 75 minutos. Adaptada de Yamakoshi *et al.*⁵⁹

O efeito de intensificação SERS também vem sendo utilizado em conjunto com a técnica de imageamento. Chen *et al.*⁶¹ desenvolveram um marcador baseado em um tiolfenilborana que, adsorvido na superfície de AuNP esféricas, permite localizar dentro de células uma espécie reativa de oxigênio, o peroxinitrito, que é ligado a doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias

e traumatismos cerebrais. Na figura 15 é mostrado o imageamento SERS desse marcador em um macrófago.

Figura 15 - Imageamento SERS de um macrófago incubado com o marcador identificando a presença e distribuição de peroxinitrito. Adaptada de Chen *et al.*⁶¹

Como foi discutido, aliando-se a espectroscopia Raman com técnicas quimiométricas é possível extrair mais informações do sistema de interesse. Klein *et al.*⁶² utilizaram PCA para separar as contribuições espectrais de componentes celulares, comparando-as com imagens de imunofluorescência. As imagens das três primeiras componentes obtidas podem ser observadas na figura 16.

Figura 16 - Imagens obtidas através das três primeiras componentes obtidas por PCA de uma célula tumoral LN-18. Adaptada de Klein *et al.*⁶²

Capítulo 2. Comportamento SERS de Complexos Oxindolimínicos

2.1. Introdução e Motivação

A etapa inicial dos estudos sobre imageamento SERS dos complexos oxindolimínicos em células *HeLa* requer um conhecimento prévio do comportamento dos complexos nesta técnica.

Esses estudos, realizados em um sistema coloidal de ouro, apresentam algumas dificuldades em sua realização, sendo a mais importante a de que estas espécies são iônicas e a sua adição na dispersão coloidal promove uma desestabilização das cargas do sistema resultando na agregação das nanopartículas do meio. Levando isso em conta, os espectros SERS foram obtidos na concentração mais alta possível antes de ocorrer a agregação. Outra dificuldade é a baixa resposta SERS apresentada pelo complexo, que será contornada pela utilização de um marcador Raman para monitorar o complexo na célula.

Neste capítulo serão relatados os métodos sintéticos dos ligantes e complexos e as caracterizações espectroscópicas Raman e SERS dos mesmos.

2.2. Objetivos

- Caracterizar espectroscopicamente os complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp);
- Avaliar o comportamento SERS desses complexos;
- Avaliar a necessidade de um MR para os estudos de imageamento.

2.3. Materiais e Métodos

2.3.1. Síntese dos Complexos Oxindolimínicos

Os complexos oxindolimínicos estudados, Cu(isatp) e Cu(nisatp), foram sintetizados no Laboratório de Bioinorgânica, Catálise e Farmacologia (IQ-USP)

coordenado pela Profa. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira e suas sínteses são descritas a seguir.

2.3.1.1. Cu(isatp)

Primeiramente tem-se a formação da base de Schiff entre a isatina (isa) com 2-amino-tiofenol (tp). Em cerca de 50 ml de etanol 96% foram adicionados os reagentes de partida numa proporção molar de 1:1, sob agitação e atmosfera inerte. Refluxou-se a mistura por duas horas e o aquecimento foi interrompido.

Figura 17 - Reação de formação do ligante isatp.

Após o resfriamento da solução foi realizada a metalação do ligante com $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solubilizado em etanol 96% numa proporção molar de 1:1 (base de Schiff : cobre). Após 10 minutos a agitação foi interrompida e a solução foi deixada em repouso por 2 dias para precipitação do complexo resultante (sólido marrom). O complexo (Massa molar: $389 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) foi filtrado à vácuo, lavado com etanol gelado e guardado em dessecador para as análises posteriores.

Figura 18 - Reação de formação do complexo Cu(isatp).

2.3.1.2. Cu(nisatp)

O complexo (Massa molar: 396 g.mol⁻¹) Cu(nisatp), também de cor marrom, foi sintetizado de forma análoga ao procedimento descrito no item 2.3.1.1, porém o reagente de partida utilizado neste caso foi a 5-nitroisatina (nisa).

Figura 19 - Reações mostrando a formação do ligante nisatp e o respectivo complexo Cu(nisatp).

2.3.2. Síntese das AuNP

A síntese utilizada para a obtenção de uma dispersão coloidal de nanoesferas de ouro estabilizadas por citrato é baseada no procedimento descrito por Lee e Miesel⁶³.

Sucintamente, 95,8 ml de água ultrapura (Milli-Q[®]) mais 1,2 ml de uma solução estoque de H₂AuCl₄·3H₂O (50,6 mM) foram adicionados em um erlenmeyer. Sob agitação vigorosa o aquecimento foi ligado até ebulição.

Após a ebulição da solução 3 ml de uma solução quente de citrato de sódio (0,1 g/10 ml) recém preparada foi adicionada. Após alguns segundos a solução tornou-se vermelha, indicando a formação do coloide de ouro. No espectro UV-VIS da maioria dessas soluções coloidais de ouro apresentaram uma banda em

cerca de 524 nm. A partir deste espectros, utilizando o procedimento descrito por Haiss *et al.*, indicando um tamanho de aproximadamente 26 nm, numa concentração de $7,37 \cdot 10^9$ partículas/ml ou $1,10 \cdot 10^{-10}$ M⁶⁴.

2.2.3. Espectros SERS

Os espectros SERS foram obtidos num espectrômetro Renishaw InVia Confocal, utilizando a radiação excitante em 785 nm (cerca de 65 mW na amostra), rede de difração de 1200 linhas/mm e uma lente Leica® 50x/0.50.

Uma alíquota da solução a ser analisada foi misturada à 500 µL das AuNP previamente ativadas com uma solução de KCl 0,1 M (100 µl de KCl para 5 ml de colóide). A solução resultante foi transferida para uma cubeta de quartzo e o espectro SERS foi obtido.

Todos os espectros obtidos foram tratados, analisados e plotados utilizando o software MATLAB® R2015a.

2.4. Resultados e Discussão

2.4.1. Caracterização espectroscópica dos complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp)

Não foi possível obter os espectros Raman normal dos complexos tanto para radiações excitantes no visível como em 1064 nm (FT-Raman) devido à alta luminescência observada nos espectros. No entanto os espectros SERS dos complexos foram obtidos com uma razoável relação sinal/ruído, utilizando 100 µl de soluções 1 Mm, em DMSO, dos complexos para 500 µl de uma solução coloidal de ouro. Na figura 20 é apresentado o espectro SERS para o complexo Cu(isatp), e na figura 21 para o Cu(nisatp).

Figura 20 - Espectro SERS do complexo Cu(isatp) em $\lambda_0 = 785$ nm.

Figura 21 - Espectro SERS do complexo Cu(nisatp) em $\lambda_0 = 785$ nm.

Nota-se que as bandas mais intensas são do solvente DMSO ($\nu_s(\text{CS})$ em 670 cm^{-1} e $\nu_{as}(\text{CS})$ em 695 cm^{-1} ⁶⁵), pois apresenta uma seção de choque alta por conta da presença de um átomo de enxofre em sua estrutura.

É possível notar que o complexo se liga quimicamente às AuNP por conta de uma banda presente em baixa frequência, em cerca de 303 cm^{-1} para o Cu(isatp) e 300 cm^{-1} para o Cu(nisatp), que pode ser atribuída a um modo AuS.

Outra evidência da natureza SERS dos espectros é a intensificação dos modos dos anéis aromáticos dos complexos. Na tabela 3 é apresentada uma atribuição das bandas dos complexos baseadas em cálculos DFT.

Tabela 3. Atribuição tentativa das bandas mais intensas dos complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp)

Cu(isatp)		Cu(nisatp)	
Número de Onda Experimental / (Teórico) (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de Onda Experimental / (Teórico) (cm ⁻¹)	Atribuição
1002 (1024)	Respiração de anel	1004 (1029)	Respiração de anel
1132 (1039)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}}) + \nu_{\text{s}}(\text{CC}_{\text{ar}})$	1064 (1082)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}}) + \nu_{\text{s}}(\text{CC}_{\text{ar}})$
1227 (1198)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}}) + \delta(\text{NC})$	1124 (1171)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}}) + \delta(\text{NC})$
1243 (1276)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}}) + \nu_{\text{s}}(\text{CC}_{\text{ar}})$	1158 (1195)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}}) + \nu_{\text{s}}(\text{NC})$
1393 (1370)	$\nu_{\text{s}}(\text{NC}) + \nu(\text{CO})$	1229 (1269)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}}) + \delta(\text{NC})$
1437 (1453)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}})$	1323 (1338)	$\nu_{\text{s}}(\text{NO}_2)$
1494 (1511)	$\nu_{\text{s}}(\text{CC}_{\text{ar}})$	1382 (1404)	$\delta(\text{NH}) + \nu(\text{CC})$
1554 (1608)	$\nu_{\text{s}}(\text{CC}_{\text{ar}} - \text{tp}) + \nu_{\text{s}}(\text{NC})$	1417 (1452)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}})$
1580 (1645)	$\nu_{\text{s}}(\text{CC}_{\text{ar}} - \text{isa}) + \nu_{\text{s}}(\text{NC})$	1475 (1488)	$\nu_{\text{s}}(\text{CC}_{\text{ar}} - \text{tp}) + \nu_{\text{s}}(\text{NC})$
1697 (1702)	$\nu(\text{CO})$	1562 (1586)	$\nu_{\text{s}}(\text{CC}_{\text{ar}} - \text{nisa}) + \nu_{\text{s}}(\text{NC})$

Como relatado anteriormente, um dos problemas encontrados ao obter os espectros SERS foi a agregação das AuNP, pois como os complexos são iônicos sua adição no sistema coloidal provoca uma desestabilização das cargas dos

colóides. Os espectros precisam ser obtidos logo após a adição dos complexos no colóide. As imagens obtidas por TEM (*Transmission Electron Microscopy*), mostradas na figura 22, mostram como a adição do complexo Cu(nisatp) provoca a agregação do sistema.

Figura 22 - Imagens TEM de A) AuNP e B) AuNP com o complexo Cu(nisatp).

Para que este sistema seja incubado nas células por 16 horas a agregação das AuNP + complexos precisa ser evitada. Portanto soluções mais diluídas são necessárias. Entretanto, como visto, os espectros SERS dos complexos são de baixa intensidade. Estes problemas experimentais levaram a utilização de um marcador Raman, chamado DTNB, para o imageamento SERS das células *HeLa*.

2.4.2. Marcador Raman – DTNB

Como apontado na seção anterior os espectros SERS dos complexos estudados não apresentam uma intensidade apreciável, o que dificultaria a localização destes no meio intracelular nos estudos posteriores. A estrutura química do MR (marcador Raman) está apresentada na figura 23. O DTNB é uma molécula amplamente utilizada em ensaios bioquímicos de quantificação proteica através da técnica UV-VIS.

Figura 23 - Estrutura química do DTNB.

O DTNB apresenta uma ponte dissulfeto em sua estrutura que pode ser clivada na presença de borohidreto de sódio em meio alcalino⁶⁶, no entanto, quando uma solução deste é introduzida num meio coloidal de AuNP esta ligação dissulfeto é quebrada e o MR se liga quimicamente às AuNP (figura 24) devido à afinidade dos átomos de enxofre pelo ouro, fundamentado pela definição de ácidos e bases de Pearson.

Figura 24 - Representação esquemática da ligação do DTNB nas AuNP.

O espectro SERS do MR é apresentado na figura 25 e suas bandas mais intensas estão atribuídas na tabela 4. Nota-se que a banda mais intensa é o $\nu_s(\text{NO}_2)$ em 1340 cm^{-1} , e esta banda será utilizada para os imageamentos SERS. Outros modos normais, referentes a modos do anel benzênico também são intensificadas.

Figura 25 - Espectro SERS do DTNB em $\lambda_0 = 785$ nm.

Uma banda interessante a ser ressaltada no espectro apresentado é a banda em 322 cm^{-1} , que pode ser atribuída a um modo AuS. Esta banda é a mesma observada nos espectros SERS dos complexos, confirmando que a ligação dos complexos nas AuNP é através do átomo de enxofre do ligante.

Tabela 4. Atribuição tentativa das bandas mais intensas do DTNB

Número de Onda (cm^{-1})	Atribuição
828	$\delta(\text{NO}_2)$
1059	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}})$
1098	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}}) + \nu(\text{C-O})$
1148	$\delta(\text{OH})$
1335	$\nu_s(\text{NO}_2)$
1556	$\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2) + \nu_s(\text{CC}_{\text{ar}})$

Em virtude da necessidade da utilização de um MR para os estudos de imageamento das células *HeLa*, foi estudado a adsorção destas duas espécies numa solução coloidal de AuNP.

2.4.3. Misturas entre os complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp) com o MR

Os espectros SERS das misturas dos complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp) com o MR podem ser observados, respectivamente, nas figuras 26 e 27.

Figura 26 - Espectro SERS da mistura entre Cu(isatp) e o MR em $\lambda_0 = 785$ nm.

Figura 27 - Espectro SERS da mistura entre Cu(nisatp) e o MR em $\lambda_0 = 785$ nm.

Apesar dos espectros obtidos terem uma baixa relação sinal/ruído, foi possível obter os espectros SERS das misturas sem que houvesse uma agregação

imediatamente do colóide de ouro. Nota-se novamente que as bandas do DMSO ($\nu_s(\text{CS})$ em 670 cm^{-1} e $\nu_{as}(\text{CS})$ em 695 cm^{-1}) são bem evidentes nos espectros.

Ambos os espectros apresentam a banda $\nu_s(\text{NO}_2)$ em 1335 cm^{-1} . Outra banda intensa também observada em 1385 cm^{-1} se trata de um modo que combina o $\nu_s(\text{NO}_2)$ com o $\nu_s(\text{CC}_{ar})$ da isa ou nisa.

Em suma os espectros apresentam as mesmas bandas, sem deslocamento, atribuídas nas seções anteriores, mostrando que as duas substâncias não interagiram entre si ao adsorverem nas AuNP, portanto passíveis de serem utilizadas em conjunto para a posterior incubação nas células *HeLa*.

2.5. Conclusões

Foi mostrado que os complexos $\text{Cu}(\text{isatp})$ e $\text{Cu}(\text{nisatp})$ não apresentam uma grande intensificação SERS de suas bandas, além de agregarem facilmente o colóide de ouro utilizado para realizar as medidas.

Para a utilização *in vitro* destes complexos um MR foi estudado em conjunto para que, ao incubar as células, o MR pudesse ser identificado e mapeado através de sua banda mais intensa, referente ao $\nu_s(\text{NO}_2)$.

Os resultados mostraram que não houve interação química entre os complexos e o MR escolhido, indicando que este sistema poderia ser utilizado para a incubação e imageamento de células *HeLa* sem a preocupação de interferência entre as duas substâncias.

Capítulo 3. Imageamento SERS de Células *HeLa*

3.1. Introdução e Motivação

O primeiro relato na literatura do uso da técnica SERS para sistemas celulares é bem recente⁶⁷, graças aos avanços tecnológicos envolvidos nos equipamentos, principalmente em relação à sensibilidade e resolução espacial. Não só o imageamento SERS como também o imageamento Raman é de grande valia para a análise destes sistemas.

Atualmente os imageamentos SERS e Raman são utilizados em conjunto com técnicas quimiométricas para extrair o máximo de informações possíveis para estes sistemas^{68–70}.

Este capítulo visa estudar a interação de AuNP, com diversas modificações que serão chamadas de 'sistemas' com o intuito de avaliar, por imageamento SERS e Raman os danos causados pelos sistemas, como a ruptura da membrana celular acompanhada de entrada de água, ruptura da membrana nuclear acompanhada do espalhamento do conteúdo proteico no meio intracelular.

Os sistemas estudados foram subdivididos da seguinte maneira:

- Grupo A – Células controle (sem nenhum tratamento);
- Grupo B – Células tratadas com o complexo Cu(isatp);
- Grupo C – Células tratadas com o complexo Cu(nisatp);
- Grupo D – Células incubadas com AuNP;
- Grupo E – Células incubadas com o sistema AuNP/MR;
- Grupo F – Células incubadas com o sistema AuNP/MR/Cu(isatp);
- Grupo G – Células incubadas com o sistema AuNP/MR/Cu(nisatp).

Os três primeiros grupos citados (A, B e C) foram os grupos controle para avaliar como as células se comportariam frente aos sistemas que contém AuNP e somente espectros na região de alta frequência, com uma radiação excitante em 532 nm, foram obtidos. O restante dos grupos, que apresentam AuNP em seus sistemas, foram obtidos espectros em 785 e 532 nm.

Como é sabido AuNP não apresentam intensificação SERS para a radiação em 532 nm, portanto a utilização dessa radiação permite obter informações referentes aos constituintes celulares em maior concentração, como água, lipídeos e proteínas. Em 785 nm as AuNP apresentam intensificação SERS e a informação obtida se refere às espécies próximas as AuNP, mesmo que estas estejam em pequenas concentrações.

No total foram analisadas mais de 10 células de cada sistema, no entanto para uma melhor leitura do trabalho, somente 2 células de cada sistema serão apresentadas.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Preparação das Células *HeLa*

As células *HeLa* foram preparadas em colaboração pelo Laboratório de Bioinorgânica, Catálise e Farmacologia (IQ-USP) utilizando um procedimento já descrito na literatura⁷¹. As células foram cultivadas em placas de Petri de quartzo em meio DMEM, suplementado com penicilina, estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, e foram mantidas a 37°C em um incubador umidificado, sob atmosfera de 5% de CO₂.

3.2.2. Preparação das Amostras para Imageamento

Ao meio de cultura celular foram adicionados 500 µl da solução desejada e as células foram incubadas por mais 16 horas. Após este período o meio DMEM foi retirado e a placa de Petri foi lavada três vezes com solução tamponante (tampão PBS) e cerca de 2 ml foram adicionados à placa para a utilização de uma lente de imersão em água durante as análises.

3.2.3. Imageamento SERS e Raman

Para todos os imageamentos foi utilizado um microscópio Raman Confocal InVia Renishaw® com as linhas de excitação em 532 e 785 nm, utilizando uma lente Leica® 63x/0.90, própria para imersão em água, e uma rede de difração de

1200 linhas/mm. Para todos os imageamentos o *pinhole* foi ativado para promover uma maior confocalidade e consequentemente uma maior resolução espacial.

Com a placa de Petri sob o microscópio foi selecionada uma célula isolada e o foco foi ajustado para 2 μm em relação ao fundo da placa. Foram feitos imageamentos com uma resolução espacial de 1 x 1 μm . A área dos imageamentos foi variado devido aos diferentes tamanhos das células.

Para os sistemas que contém AuNP primeiramente foi realizado o imageamento SERS, utilizando a linha de excitação em 785 nm (cerca de 90 mW de potência) no modo *static*, com uma rede de difração de 1200 linhas/mm centrada em 1340 cm^{-1} (extensão espectral: 1200 – 1500 cm^{-1}). Para cada ponto do mapeamento um tempo de integração de 0,25 s foi utilizado. Cada imageamento durou cerca de 10 minutos.

Acabado o imageamento SERS a mesma área foi analisada novamente, dessa vez utilizando a linha de excitação em 532 nm, com uma rede de difração de 1200 linhas/mm centrada em 3020 cm^{-1} (extensão espectral: 2850 – 3500 cm^{-1}). Para cada ponto do imageamento um tempo de integração de 0,5 s foi utilizado. Para os sistemas do grupo de controle somente este imageamento foi realizado. Cada imageamento durou cerca de 20 minutos.

3.2.4. Processamento e Análise dos Dados

Todos os processamentos e análises dos dados foram realizados no *software* MATLAB R2015a[®]. O pré-processamento foi feito com o auxílio da toolbox PLS_Toolbox[®]. O pré-processamento, para os espectros SERS, consistiu em alisamento por meio de um filtro SG (*Savitzky-Golay*) numa janela de 5 pontos com um polinômio de primeira ordem seguido por correção de linha base com o algoritmo WLS (*Weighted Least Squares*). Para os espectros Raman o mesmo alisamento foi realizado, no entanto o algoritmo EMSC (*Extended Multiplicative Scatter Correction*). A utilização de dois filtros diferentes foi necessária, pois, no caso do imageamento Raman a intensidade é fraca e um fundo espectral é mais evidente nos espectros, e o filtro EMSC é capaz de corrigir esse efeito.

Para as análises quimiométricas de MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares*) foi utilizada a toolbox MCR-ALS GUI 2.0⁷². O número de componentes foi estimado pelo algoritmo SVD (*Singular Value Decomposition*) e a hipótese inicial foi obtida pelo algoritmo SIMPLISMA, que estima, dentro de um conjunto de dados, os espectros mais puros do conjunto e utiliza como hipótese inicial.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Efeito fototérmico

Um dos problemas ao realizar análises de células vivas é o efeito fototérmico, pois estas amostras são muito sensíveis. Outra dificuldade é que os componentes celulares estão presentes em baixas concentrações, o que torna difícil executar um experimento onde a informação desejada é obtida e a amostra não seja degradada.

A condição ideal, descrita na seção 3.2.3, foi a que melhor apresentou resultados, no entanto o efeito fototérmico não foi eliminado completamente como mostra a sequência de imagens na figura 28, para duas células (A1 e A2) pertencentes ao Grupo A.

Após o imageamento em 785 nm a amostra não apresenta uma variação significativa, no entanto observando a imagem óptica após a análise com a radiação em 532 nm observa-se uma brusca variação na amostra. Estruturas que se assemelham a bolhas são formadas na célula, indicando que houve algum dano após a incidência do laser. Mesmo havendo este efeito a imagem química obtida após o tratamento dos dados é coerente. Esta coerência pode ser atribuída ao imageamento ser realizado ponto-a-ponto e com o tempo de exposição muito curto, não afetando os resultados.

Figura 28 - Imagens ópticas das células do Grupo A mostrando o dano fototérmico depois das análises. Barra de escala: 20 µm.

3.3.2. Grupo A – Grupo de Controle

Neste grupo foram analisadas células sem nenhum tratamento. O objetivo foi monitorar o comportamento das células nas condições experimentais do imageamento. Este conjunto possibilitou a otimização dos tratamentos quimiométricos, e os parâmetros de qualidade das análises de MCR-ALS encontram-se disponíveis nos respectivos apêndices. Na figura 29 são apresentadas as imagens ópticas das células do Grupo A.

Figura 29 - Imagens ópticas das células do Grupo A. Barra de escala: 20 μm .

A escolha das células analisadas foi aleatória, se atentando sempre para que as células escolhidas não apresentassem um perfil mais arredondado, um indicativo de que a célula se encontra num estágio avançado de apoptose.

3.3.2.1. Imageamento em 785 nm

O imageamento em 785 nm para as células do Grupo de Controle foi realizado, embora não havendo AuNP, a fim de observar se seria possível identificar algum sinal Raman nesta região espectral ($1200 - 1500 \text{ cm}^{-1}$). Na figura 30 é possível observar que os espectros obtidos apresentam somente ruído. Este padrão também é observado para a célula A2 e os espectros estão disponíveis no apêndice A.2.

Figura 30 - Espectros obtidos do imageamento em 785 nm para a célula A1.

3.3.2.2. Imageamento em 532 nm

No imageamento em 532 nm é possível obter informações de constituintes celulares em maior concentração, como discutido anteriormente. Esses constituintes são água, lipídeos e proteínas. No espectro Raman na região de alta frequência destes constituintes as bandas são mais intensas e mais isoladas. Por este motivo o imageamento foi realizado nesta região.

O imageamento referente aos estiramentos simétrico e antissimétrico da água possibilitam identificar a água dentro e fora da célula. Tiwari *et al.*⁷³, através das diferenças em intensidades relativas das bandas da água, foi possível diferenciar a água do núcleo da água do citoplasma.

Os espectros obtidos nestes imageamentos, por conta das condições experimentais já discutidas na seção 3.1, apresentam uma relação sinal/ruído baixa, como mostrado na figura 31, para a célula A1.

Figura 31 - Espectros obtidos do imageamento em 532 nm para a célula A1.

Para ser possível realizar um tratamento quimiométrico destes espectros o pré-processamento descrito na seção 3.2.4 é necessário. Após o pré-processamento os espectros resultantes se aparentam como os mostrados na figura 32.

Figura 32 - Espectros do imageamento em 532 nm para a célula A1 após tratamento dos espectros.

Com os espectros pré-processados foi realizado uma análise por MCR-ALS, na qual foi possível obter três componentes, como apresentado na figura 33 para a célula A1.

A tabela 5 apresenta uma atribuição em relação as bandas dos espectros puros obtidos por MCR-ALS.

Tabela 5. Atribuição das bandas das 3 componentes obtidas por MCR-ALS das células controle

	Número de Onda (cm ⁻¹)	Atribuição
Componente 1		
	3233	$\nu_s(\text{OH})^{74}$
	3424	$\nu_{as}(\text{OH})$
Componente 2		
	2888	$\nu_{as}(\text{CH}_2)$ – Lipídeos e Proteínas ⁷⁵
	2942	$\nu_s(\text{CH})$ – Lipídeos e Proteínas ⁷⁶
	2985	Colesterol ⁷⁵
	3203	$\nu_s(\text{OH})^{74}$
	3403	$\nu_{as}(\text{OH})$
Componente 3		
	2855	$\nu_s(\text{CH}_2)$ - Lipídeos ⁷⁷
	2896	$\nu_s(\text{CH}_3)$ - Lipídeos ⁷⁷
	2932	$\nu_{as}(\text{CH}_2)^{77}$
	2960	Cadeia (fora do plano) + $\nu_s(\text{CH}_3)$ - Lipídeos ⁷⁸
	3012	$\nu_s(=\text{CH})$ - Lipídeos ⁷⁹

A componente 1 representa a água e como pode ser observado fora da célula sua contribuição é muito grande. A componente 2 representa proteínas, que estão espalhadas pelo citosol da célula e condensadas no núcleo celular, na região nuclear ainda é possível observar o nucléolo (região responsável pela síntese de proteínas) muito intensa na imagem. A componente 3 representa os lipídeos e sua maior intensidade está concentrada em pontos denominados corpos lipídicos. Entretanto também é possível ver uma menor concentração ao longo da superfície celular, indicando sua presença na membrana celular.

Figura 33 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532 \text{ nm}$) e suas respectivas imagens para a célula A1.

O perfil espectral MCR da componente 2 na figura 33 se assemelha muito com o espectro de um núcleo celular obtido por Uzunbajakava *et al.*⁸⁰, corroborando com nossa atribuição. Deste ponto em diante as componentes obtidas por MCR-ALS seguirão a mesma ordem que foi apresentada na figura 33.

Comparando-se a imagem óptica da célula A1 (figura 34) com a respectiva imagem da componente 1 nota-se que a imagem Raman da água contorna a célula, portanto essa água é proveniente do tampão PBS.

Figura 34 - Comparação entre a imagem óptica da célula A1 e a imagem obtida pela componente 2 do MCR-ALS.

A água intracelular dá evidências sobre o estado em que a célula se encontra. A presença de uma alta concentração em seu interior é um indicativo de que a célula sofreu algum dano, físico ou químico. Este dano, se não puder ser reparado pelos aparatos celulares, é acompanhado de morte celular. Dois tipos de morte celular podem ocorrer: apoptose e necrose. Na apoptose, comumente chamada de morte programada, é acompanhada por perda de água e a célula acaba diminuindo em tamanho. Já na necrose a célula acaba ganhando cada vez mais água até que ela inche e acabe perdendo sua estrutura e rompendo.

3.3.3. Grupo B – Células tratadas com o complexo Cu(isatp)

Para verificar se somente o complexo Cu(isatp) teria algum efeito nas células, as células foram incubadas com o respectivo complexo nas mesmas concentrações em que foram obtidas as imagens SERS, ou seja, 20 μ M. É preciso salientar que essa concentração de complexo é bem inferior ao valor de IC₅₀ (concentração do complexo que elimina, por morte celular, metade da população de células em 24 horas). O IC₅₀ do Cu(isatp) é 70 μ M. As imagens ópticas das células tratadas com o complexo são mostradas na figura 35.

Figura 35 - Imagens ópticas das células do Grupo B. Barra de escala: 20 μ m.

As análises quimiométricas referentes a esse grupo seguiram as mesmas premissas das células do Grupo A e foram encontradas três componentes e suas imagens foram obtidas. Na figura 36 são apresentados os perfis espectrais MCR e suas respectivas imagens para a célula B1.

Assim como para as células do Grupo A conseguimos ver por meio das imagens Raman que a membrana se encontra estável (componente 1), e o núcleo e o nucléolo também podem ser facilmente identificados pela componente 2. Neste caso não há corpos lipídicos, componente 3, de alta intensidade como foi observado na célula A1, no entanto tem-se uma distribuição uniforme deste componente ao redor da membrana, reforçando o fato da membrana se manter estável.

Figura 36 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532 \text{ nm}$) e suas respectivas imagens para a célula B1.

Não foi possível observar danos para esta concentração de complexo na célula, ou seja, a célula continuou estruturada mesmo após a incubação com o complexo. A maior evidência disso é o núcleo e nucléolo estarem intactos e a baixa concentração de água no interior da célula. Este resultado é esperado, pois a concentração utilizada é menor que o IC_{50} .

Na figura 37 é apresentado a comparação da imagem óptica da célula B1 com a imagem da componente 1. Nota-se que mais de uma célula (canto superior esquerdo) estava presente na área do imageamento, indicando que a metodologia utilizada permitiu resolver espacialmente as células.

Figura 37 - Comparação entre a imagem óptica da célula B1 e a imagem obtida pela componente 2 do MCR-ALS.

3.3.4. Grupo C – Células tratadas com o complexo Cu(nisatp)

Assim como o Grupo B, o Grupo C foi estudado para verificar se somente o complexo Cu(nisatp) teria algum efeito nas células, as células foram incubadas com o respectivo complexo nas mesmas concentrações em que foram obtidas as imagens SERS, ou seja, 20 μM . A concentração utilizada também é inferior ao valor de IC_{50} deste complexo, que é 50 μM . As imagens ópticas das células tratadas com o complexo são mostradas na figura 38. Neste sistema o imageamento em 785 nm, devido à ausência de AuNP, não foi realizado pelos (vide seção 3.3.2.1).

Figura 38 - Imagens ópticas das células do Grupo C. Barra de escala: 20 μ m.

As análises quimiométricas referentes a esse grupo seguiram as mesmas premissas das células dos Grupos A e B, e foram encontradas três componentes e suas imagens foram obtidas. Na figura 39 são apresentados os perfis espectrais MCR e suas respectivas imagens obtidas para a célula C5.

Para este caso vale as mesmas discussões realizadas na seção anterior. A membrana se encontra estável e a presença de proteínas condensadas indicam que não houve dano a célula com este tratamento.

Um fato importante a ser observado nesta célula em especial é que a célula estava passando por um processo de divisão celular, a mitose. É possível observar a presença de dois núcleos distintos através da análise da componente 2, referente às proteínas.

É interessante notar que a componente 3 (lipídeos), que constitui a membrana celular, permite observar claramente a divisão celular e a formação das membranas dessas novas células. Ou seja, além do complexo não surtir nenhum dano para a célula, os processos de divisão celular continuaram normalmente.

Figura 39 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532 \text{ nm}$) e suas respectivas imagens para a célula C5.

3.3.5. Grupo D – Células incubadas com AuNP

Outro sistema analisado para fins comparativos foi o de células incubadas somente com AuNP, provenientes da síntese com redutor citrato, portanto tendo como estabilizante íons citrato (vide seção 2.3.2). O intuito desta parte do estudo foi verificar as intensificações SERS de componentes celulares causados pelas AuNP. As imagens ópticas das células incubadas com AuNP são mostradas na figura 40.

Figura 40 - Imagens ópticas das células do Grupo D.

Os espectros SERS obtidos para essas amostras não são coerentes, pois para cada célula um padrão espectral diferente é observado. Os espectros SERS obtidos neste mapeamento para a célula D1 é apresentado na figura 41.

Nota-se que mais de um constituinte celular foi observado, pois pode-se observar mais de um padrão espectral. As bandas mais intensas destes espectros foram atribuídas, como indicado na tabela 6, de acordo com as atribuições presentes na literatura.

Figura 41 - Espectros obtidos do imageamento em 785 nm para a célula D1.

Tabela 6. Atribuição de algumas bandas presentes nos espectros SERS obtidos da célula D1

Número de Onda (cm ⁻¹)	Atribuição
1221	Amida III ⁸¹
1222	Ácido nucleico ⁸²
1233	Modo de anel ⁸³
1235	Amida III ⁸⁴
1266	Lipídeos ⁸⁵
1272	rocking(CH) ⁷⁹
1278	Proteína ⁸⁶
1284	Amida III ⁸⁷
1296	-
1296	-
1312	Lipídeos ⁸⁶
1319	Guanina ⁸⁸
1334	Guanina ⁸⁸
1347	-
1354	Guanina ⁸⁸
1355	Guanina ⁸⁸
1360	Triptofano ^{84,89}
1407	$\nu_s(\text{COO}^-)$ ⁹⁰
1411	-
1419	$\delta(\text{CH}_2)$ – Proteínas e Lipídeos ⁹¹
1455	Deoxirribose ⁸⁸

1459	Deoxirribose ⁸⁸
1462	Lipídeos ⁹²
1480	-
1480	Guanina, Adenina (respiração de anel) ⁹³

Como pôde ser observado as AuNP intensificaram elementos citoplasmáticos, como proteínas e lipídeos, e também elementos do núcleo, como guanina, adenina e deoxirribose, constituintes do DNA.

Para mostrar se ocorreu dano celular o imageamento em 532 nm foi realizado e os resultados são apresentados na figura 42.

Nota-se pelas imagens que a estrutura da membrana celular não apresentou mudanças significativas após a incubação com AuNP, no entanto a concentração de água intracelular é muito maior que as concentrações observadas nos grupos anteriores, indicando que as AuNP podem ter causado danos não detectáveis na membrana celular que permitiu a entrada de água. Ou as AuNP podem ter promovido uma cascata de sinalizações que levaram a permeabilização da membrana celular.

Observando a componente 2 pode-se notar que a porção do núcleo não está tão definida, como foi observado nos grupos anteriores. Nota-se também pequenas porções não coesas dentro da célula, indicando que a membrana nuclear pode ter sido afetada pela presença das AuNP, o que explica também a intensificação de sinais Raman referentes a porções normalmente encontradas no núcleo celular. Já é relatado na literatura que AuNP têm uma tendência natural de se dirigirem ao núcleo celular, mas isso depende também do tempo de incubação do sistema no meio de cultura e do tamanho das AuNP⁹⁴.

Figura 42 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532$ nm) e suas respectivas imagens para a célula D1.

3.3.6. Grupo E – Células incubadas com o sistema AuNP\MR

Este grupo contém células incubadas com AuNP, que foram previamente modificadas com o MR. Este estudo teve por objetivo monitorar o comportamento do MR na célula. O MR possui uma banda intensa referente ao $\nu_s(\text{NO}_2)$, em 1340 cm^{-1} . As imagens ópticas das células incubadas com o sistema AuNP/MR são mostradas na figura 43.

Figura 43 - Imagens ópticas das células do Grupo E.

Neste caso os imageamentos em 785 nm , imageamentos SERS, foram realizados antes do imageamento em 532 nm , assim como foi descrito na seção anterior. Na figura 44, o mapeamento SERS apresenta espectros que, na sua maioria, correspondem ao espectro do MR.

Figura 44 - Espectros SERS obtidos no imageamento da célula E1.

Na figura 46 é mostrado os perfis espectrais MCR e suas respectivas imagens para a célula E1, indicando que o AuNP/MR causou um grande dano à

célula. A água intracelular (componente 1) está em altíssima concentração dentro da célula, indicando que a membrana celular foi severamente danificada e a componente lipídica (componente 3) evidência mais ainda este fato. A imagem da componente 3 mostra que a membrana celular foi rompida.

A componente proteica (componente 2) também mostra que o núcleo celular foi muito danificado, já que não há coesão entre as porções proteicas dentro da célula.

Observando a figura 45 pode-se analisar a distribuição das AuNP/MR dentro da célula. As espécies AuNP/MR encontram-se na mesma região onde há maior concentração de água (imagem Raman do componente 1), evidenciando que as células tratadas com este sistema causaram um efeito necrosante na célula.

Figura 45 - Comparação entre a imagem óptica da célula E1 e suas imagens Raman e SERS.

Para a célula E7, apresentada no apêndice E.2, o mesmo comportamento foi observado, no entanto o tratamento quimiométrico não foi possível de resolver a componente lipídica da célula, indicando que a contribuição de lipídeos pode ter se tornado insignificante em relação às outras componentes químicas do sistema.

Figura 46 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1,2 e 3 ($\lambda_0 = 532 \text{ nm}$) e intensidade SERS da banda do MR e suas respectivas imagens para a célula E1.

3.3.7. Grupo F – Células incubadas com o sistema AuNP\MR\Cu(isatp)

Este grupo, um dos principais deste estudo, as células foram incubadas com o sistema AuNP\MR\Cu(isatp). Na seção 3.3.3 foi mostrado que o complexo Cu(isatp) não surtia efeito nenhum nas células na concentração de 20 μ M. Neste grupo a mesma concentração de complexo foi utilizada. As imagens ópticas das células incubadas com o sistema AuNP\MR\Cu(isatp) são mostradas na figura 47.

Figura 47 - Imagens ópticas das células do Grupo F.

Diferente dos outros grupos não foi possível observar a componente de corpos lipídicos (componente 3) das células pelo tratamento por MCR-ALS, portanto somente duas componentes foram suficientes para a convergência dos cálculos. Na figura 48 é mostrado os perfis espectrais MCR e suas respectivas imagens para a célula F2, juntamente com a imagem SERS.

É interessante apontar que a componente proteica está espalhada pela célula, indicando que houve um ataque ao núcleo celular devido a presença do complexo. Outra observação importante é que a água intracelular permaneceu constante, indicando que o sistema AuNP\MR\Cu(isatp) penetrou na célula sem danos na membrana, comparável com as células do Grupo de Controle. A célula F8 (apêndice F.2) apresenta o mesmo comportamento.

O imageamento SERS mostra que há uma grande concentração de AuNP\Mr\Cu(isatp) na extremidade da célula, no entanto o sinal SERS pode ser visualizado por toda a célula. Os resultados acima: ausência da componente 3 e uma maior acúmulo do sistema na extremidade da célula, local onde geralmente se encontram os corpos lipídicos, sugerem que o Cu(isatp) tem como alvo os corpos lipídicos.

Figura 48 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1 e 2 ($\lambda_0 = 532 \text{ nm}$) e intensidade SERS da banda do MR e suas respectivas imagens para a célula F2.

Outro ponto importante destes resultados é que o complexo permanece junto às AuNP, pois se o complexo desorvesse das AuNP um comportamento semelhante ao observado para os Grupos D (AuNP) e E (AuNP\MR) seria observado. Uma possibilidade dessa diferença de comportamento é que o complexo, por ser catiônico, tem uma melhor interação e penetrabilidade na membrana celular^{95,96}.

3.3.8. Grupo G – Células incubadas com o sistema AuNP\MR\Cu(nisatp)

Neste grupo as células foram incubadas com o sistema AuNP\MR\Cu(nisatp). Na seção 3.3.4 foi mostrado que o complexo Cu(nisatp) não surtia efeito nenhum nas células na concentração de 20 μ M. Neste grupo a mesma concentração de complexo foi utilizada. As imagens ópticas das células incubadas com o sistema AuNP\MR\Cu(nisatp) são mostradas na figura 49.

Figura 49 - Imagens ópticas das células do Grupo G.

O mesmo comportamento que foi observado na seção anterior pode ser observado para este sistema. O cálculo de MCR-ALS conseguiu separar somente 2 componentes. A componente 1 (água) mostra que a porção intracelular apresenta uma quantidade de água comparável às células do Grupo de Controle, e a componente 2 (proteínas) aparece dispersa, indicando que o núcleo celular foi atacado. A ausência da componente 3 (corpos lipídicos), indica que este sistema tem o mesmo alvo que o apresentado na seção anterior.

Figura 50 - Perfis espectrais MCR-ALS dos componentes 1 e 2 ($\lambda_0 = 532 \text{ nm}$) e intensidade SERS da banda do MR e suas respectivas imagens para a célula G1.

3.4. Conclusões

A utilização da técnica SERS para a identificação do alvo intracelular dos complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp) em células *HeLa* vivas, embora tenha apresentado alguns problemas experimentais, levaram à algumas conclusões.

A incubação das células com AuNP (Grupo D) mostrou que as células apresentam uma maior concentração de água intracelular, e as AuNP modificadas com o MR conseguiram romper a membrana celular. No entanto, ao utilizar o MR em conjunto com os complexos, as células mantiveram sua concentração de água intracelular comparável à concentração do grupo de controle (Grupo A).

Ao realizar as análises de MCR para as células dos grupos F e G, e comparando-se com os imageamentos obtidos para os sistemas anteriores, notou-se que a componente que representa os corpos lipídicos deixou de ser resolvida pelo método, levando a considerar que um dos alvos intracelulares dos complexos estudados são os corpos lipídicos das células.

A utilização de duas radiações excitantes (785 e 532 nm) para o mesmo mapeamento celular, permitiu monitorar as componentes intracelulares por Raman normal (532 nm) e a localização do complexo pela intensificação SERS da banda do MR (785 nm).

Capítulo 4. Estudos de Transferência de Carga da 5-nitroisatina Adsorvida em Nanopartículas de Prata

4.1. Introdução e Motivação

Como já apresentado anteriormente a isatina e seus derivados possuem uma vasta gama de aplicações no campo farmacêutico. Outras propriedades destes compostos podem ser exploradas por se tratar de uma molécula presente em vários sistemas biológicos (vide seção 1.2).

A 5-nitroisatina (nisa) em especial vêm sendo amplamente estudada na síntese de compostos spiro⁹⁷ e reações diastereosseletivas⁹⁸, no entanto somente alguns trabalhos de cunho fundamental sobre suas propriedades físico-químicas são encontrados^{99–101}, por este motivo resolvemos realizar um estudo vibracional de seu comportamento RR e SERS.

Os estudos RR vêm da propriedade que, na presença de uma base, a 5-nitroisatina pode ter um próton abstraído e o equilíbrio apresentado na figura 51 se estabelece em solução. Neste equilíbrio há a formação de um ânion que possui uma Transferência de Carga (CT) interna facilmente detectável pela sua intensa coloração.

Figura 51 - Equilíbrio químico da nisa em solução na presença de uma base.

A motivação de se estudar o comportamento SERS dessa espécie é caracterizar o seu comportamento na superfície de nanopartículas metálicas, ou seja, seu complexo de superfície¹⁰². Atualmente, complexos de superfície, são muito estudados por conta de suas aplicações como produção de células de conversão fotovoltaicas¹⁰³ mais eficientes e catálises heterogêneas¹⁰⁴.

Neste estudo, em colaboração com o Prof. Dr. Rômulo Augusto Ando, as propriedades de CT da nisa foram exploradas através da técnica RR para estudos

em solução e através da técnica SERS para estudar seu comportamento em superfície. Para auxiliar a interpretação dos resultados SERS o complexo molecular Ag(nisa) foi preparado e obtido seu comportamento RR.

4.2. Materiais e Métodos

5-nitroisatina ($C_8H_4N_2O_4$), acetato de prata ($AgC_2H_3O_2$), TBAF ($(C_4H_9)_4NF$), nitrato de prata ($AgNO_3$) e citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) foram adquiridos na Sigma-Aldrich e utilizados sem posterior purificação. DMSO também foi adquirido na Sigma-Aldrich e conservado em peneiras moleculares (3 Å) previamente ativadas para evitar o acúmulo de água.

4.2.1. Síntese das AgNP

A síntese das AgNP foi realizada segundo o protocolo de Lee-Miesel⁶³ utilizando citrato de sódio como redutor. As AgNP sintetizadas apresentaram um LSPR em 440 nm, indicando um tamanho de cerca de 70 nm¹⁰⁵.

4.2.2. Preparação das soluções da nisa, nisa⁻, Ag(nisa) e AgNP(nisa)

Uma solução estoque 1 mM de nisa foi preparada em DMSO. Para a obtenção da solução do ânion nisa⁻ 1 ml da solução estoque de nisa foi adicionado à 1 ml de uma solução estoque 10 mM de TBAF (fluoreto de tetrabutylamônio) preparada em DMSO seco.

Para a obtenção da solução do complexo Ag(nisa) 1 ml da solução estoque de nisa foi adicionado à 1 ml de uma solução estoque 10 mM de acetato de prata preparada em DMSO seco, segundo procedimento adaptado descrito por Tisovský *et al.*¹⁰⁶. Neste caso o ânion acetato é suficientemente básico para abstrair o próton ácido da nisa, formando a espécie aniônica nisa⁻, que participa do complexo.

Para a preparação da solução em colóide de prata 500 µl de uma solução coloidal de AgNP foi adicionada em 100 µl de uma solução 1 mM de nisa, preparada numa proporção 1:10 de DMSO:água.

4.2.3. Espectroscopia de Absorção Eletrônica

As soluções preparadas de acordo com a seção 4.2.2 foram analisadas num espectrômetro Shimadzu UV-3101PC utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 mm. Os espectros eletrônicos foram obtidos na faixa de 300 até 800 nm.

4.2.4. Espectroscopia Raman, Raman Ressonante e SERS

O espectro Raman normal da nisa no estado sólido foi obtido utilizando um espectrômetro FT-Raman Bruker RFS100/S com um detector de Ge resfriado por nitrogênio líquido e utilizando uma radiação excitante em 1064 nm ($\text{Nd}^{3+}/\text{YAG}$) com uma resolução espectral de 2 cm^{-1} e uma potência de 50 mW.

Os espectros RR das soluções nisa, $\text{Ag}(\text{nisa})$ e nisa^- foram obtidos num espectrômetro Horiba Jobin-Yvon T64000 equipado com um triplo monocromador e detector CCD resfriado por N_2 líquido. Foram utilizadas radiações excitantes em 514, 488 e 457 nm de um Laser Coherent Innova 70C Ar^+/Kr^+ e a radiação em 404 nm de um laser de estado sólido (Toptica®). A resolução espectral foi de 2 cm^{-1} , e os espectros foram obtidos em cela rotatória de quartzo.

Os espectros SERS foram obtidos num espectrômetro Raman Renishaw InVia® utilizando uma lente Leica® 50x/0.50 e uma cubeta de quartzo, nas radiações excitantes em 785, 633 e 532 nm.

4.2.5. Metodologia Computacional

As geometrias otimizadas e os espectros Raman teóricos foram obtidos pelo método DFT (*Density Functional Theory*). O funcional híbrido de troca-correlação B3LYP foi utilizado juntamente com o conjunto de bases 6-311++G(d,p). Os números de onda dos espectros Raman teóricos foram corrigidos pelo fator de correção pertinente $(0,9679)^{107}$. Os espectros eletrônicos teóricos foram obtidos pelo método TDDFT (*Time Dependent Density Functional*

Theory), usando o funcional B3LYP juntamente com o conjunto de bases 6-311++G(d,p). Nos casos em que átomos de prata estavam envolvidos o conjunto de bases LANL2DZ foi utilizado somente para os átomos de prata. Todos os cálculos foram realizados no software Gaussian 09¹⁰⁸.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Espectroscopia de absorção eletrônica

Os espectros de absorção eletrônico experimentais em solução dos compostos nisa, Ag(nisa) e nisa⁻, juntamente com os espectros teóricos são apresentados na figura 52.

Figura 52 - Espectros eletrônicos A) Experimentais e B) Teóricos dos compostos indicados na figura.

O composto nisa apresenta uma banda eletrônica intensa em 329 nm, que é atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo NO₂ da molécula. O ombro observado em maior comprimento de onda por volta de 430 nm, pode ser atribuído à transição $n \rightarrow \pi^*$ da carbonila.

Com a retirada do próton há uma maior delocalização eletrônica e é esperado um deslocamento da banda CT para o grupo NO₂, o que pode ser confirmado pelo deslocamento de 90 nm para o vermelho ($\lambda_{\text{max}} = 416$ nm), figura 52B. Nota-se que com a formação da espécie aniônica também há um

deslocamento para o vermelho da transição $n \rightarrow \pi^*$ atribuídas às carbonilas cetônica e amídica, para a região de 550 nm.

O complexo Ag(nisa), como esperado, apresenta a banda CT em energia intermediária às espécies neutra e aniônica, com λ_{max} em 377 nm, figura 53B. O ombro atribuído à transição $n \rightarrow \pi^*$ também aparece em uma região intermediária em cerca de 470 nm em comparação as outras espécies.

Figura 53 - Orbitais de fronteira envolvidos na transição de transferência de carga $\pi \rightarrow \pi^*$ obtidas por TDDFT. Da esquerda para a direita, para a nisa, Ag(nisa) e nisa⁻.

Tabela 7. Transições eletrônicas observadas experimentalmente.

Composto	λ_{max} ($\lambda_{\text{teórico}}$) (nm) \ Atribuição
nisa	329 (304) \ $\pi \rightarrow \pi^*$ NO ₂
Ag(nisa)	377 (360) \ $\pi \rightarrow \pi^*$ NO ₂
nisa ⁻	416 (390) \ $\pi \rightarrow \pi^*$ NO ₂

Na figura 53 pode-se observar que a delocalização eletrônica desses sistemas observada experimentalmente é corroborada pelas imagens dos orbitais moleculares de fronteira dos sistemas.

4.3.2. Espectroscopia Raman e RR

A figura 54 apresenta o espectro FT-Raman da nisa no estado sólido e seu espectro teórico. Na tabela 8 é apresentado os valores das frequências das bandas mais intensas e suas respectivas atribuições baseadas em cálculo DFT. A acurácia do método teórico utilizado pode ser observada pela similaridade entre as frequências experimentais e calculadas, respaldando o uso dessa metodologia para a interpretação dos dados.

Figura 54 - Espectros Raman Experimental e Teórico para a nisa.

Tabela 8. Atribuição das bandas mais intensas do espectro experimental da nisa.

Número de Onda Experimental / (Teórico) (cm ⁻¹)	Atribuição
750 (850)	$\delta(\text{NO}_2)$
1169 (1192)	$\nu_s(\text{NC}) + \delta(\text{CH}_{\text{ar}})$
1283 (1284)	$\delta(\text{CH}_{\text{ar}})$
1308 (1334)	$\nu_s(\text{CC}_{\text{ar}})$
1335 (1363)	$\nu_s(\text{NO}_2)$
1536 (1586)	$\nu_{\text{as}}(\text{NO}_2)$
1607 (1639)	8b
1618 (1657)	8a
1734 (1821)	$\nu_s(\text{CO}_{\text{cetona}})$
1751 (1844)	$\nu_s(\text{CO}_{\text{amida}})$

Após a caracterização da nisa em fase sólida os estudos em solução para todas as espécies (nisa, Ag(nisa) e nisa⁻) foram realizados. Os espectros Raman em solução, juntamente com o espectro da nisa sólida, podem ser visualizados na figura 55, onde são indicadas as radiações excitantes.

Figura 55 - Espectros Raman das espécies nisa sólida, nisa, Ag(nisa) e nisa⁻. Radiações excitantes especificadas na figura.

Nos espectros acima é possível observar que a banda referente ao $\nu_s(\text{NO}_2)$, utilizada como sonda molecular para avaliar a deslocalização de cargas no sistema, apresenta deslocamento de frequência. No complexo $\text{Ag}(\text{nisa})$ é observado um deslocamento de 13 cm^{-1} para menor frequência em relação à nisa em solução, enquanto que para o ânion nisa^- há um deslocamento de 22 cm^{-1} para menor frequência em relação à nisa . Esse deslocamento de frequência do grupo nitro indica uma deslocalização eletrônica maior na espécie aniônica, corroborando com o deslocamento da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ observada nos espectros eletrônicos. Na tabela 9 os valores de frequência dos modos do grupo nitro e seus correspondentes valores teóricos podem ser observados, ressaltando a concordância entre esses valores.

Tabela 9. Números de onda referentes aos modos normais do grupo nitro.

Composto	Experimental (cm^{-1})			Teórico (cm^{-1})		
	$\delta(\text{NO}_2)$	$\nu_s(\text{NO}_2)$	$\nu_{as}(\text{NO}_2)$	$\delta(\text{NO}_2)$	$\nu_s(\text{NO}_2)$	$\nu_{as}(\text{NO}_2)$
nisa	836	1338	1503	822	1319	1535
$\text{Ag}(\text{nisa})$	839	1325	1454	823	1302	1506
nisa^-	832	1316	1454	812	1276	1432

Na tabela 10 estão indicadas as bandas referentes às carbonilas (amídica e cetônica). Para a nisa no estado sólido essas bandas são observadas em 1734 cm^{-1} para $\nu_s(\text{CO}_{\text{cetona}})$ e 1751 cm^{-1} para $\nu_s(\text{CO}_{\text{amida}})$. Em solução essas bandas são observadas em 1763 e 1784 cm^{-1} .

Com a formação do complexo $\text{Ag}(\text{nisa})$ é esperado que essas frequências das carbonilas tenham um deslocamento para menor energia. Isso foi observado experimentalmente, sendo em 1624 cm^{-1} para $\nu_s(\text{CO}_{\text{amida}})$ e 1670 cm^{-1} para $\nu_s(\text{CO}_{\text{cetona}})$. Além disso as energias das frequências se invertem em relação a nisa , pois o átomo de prata se liga diretamente à carbonila amídica, fazendo com que sua frequência fique menor que da carbonila cetônica.

No ânion nisa^- a mesma inversão de energia é observada, com as frequências em 1693 cm^{-1} para $\nu_s(\text{CO}_{\text{amida}})$ e 1726 cm^{-1} para $\nu_s(\text{CO}_{\text{cetona}})$, devido

a deslocalização eletrônica no anel heterocíclico entre o nitrogênio e a carbonila amídica.

Tabela 10. Frequências referentes aos modos normais das carbonilas.

Composto	Experimental (cm^{-1})		Teórico (cm^{-1})	
	$\nu_s(\text{CO}_{\text{amida}})$	$\nu_s(\text{CO}_{\text{cetona}})$	$\nu_s(\text{CO}_{\text{amida}})$	$\nu_s(\text{CO}_{\text{cetona}})$
nisa	1784	1763	1843	1821
Ag(nisa)	1624	1670	1677	1725
nisa ⁻	1693	1726	1749	1784

Nos espectros RR da nisa, para as radiações excitantes 457, 405 e 363 nm, são apresentados na figura 56A. As bandas do solvente DMSO estão indicadas na figura (*). Como pode ser notado a banda atribuída ao $\nu_s(\text{NO}_2)$ em 1338 cm^{-1} , apresenta seu máximo de intensidade em 363 nm, consistente com o valor da banda de absorção deste composto em 329 nm (vide Tabela 7). A maior intensidade do ruído no espectro obtido em 363 nm é devido a absorção da radiação incidente e espalhada nesta condição de ressonância. Para a radiação em 457 nm, região onde se observa um ombro no espectro eletrônico (430 nm), são observadas as bandas em 1122, 1167, 1197, 1310, 1609 e 1621 cm^{-1} , que podem ser atribuídas à modos do anel aromático e do anel heterocíclico e as bandas em 1763 e 1784 cm^{-1} devido às carbonilas, indicando que esse ombro observado no espectro eletrônico envolve os cromóforos nos anéis e nas carbonilas da nisa.

Nos espectros RR do complexo Ag(nisa) (figura 56B) é observada a banda $\nu_s(\text{NO}_2)$ em 1325 cm^{-1} fora de ressonância (488 nm). Na condição de ressonância (405 nm) são observadas, além das bandas do grupo nitro, bandas em 1123, 1151, 1205, 1270, 1395, 1414 e 1454 cm^{-1} , que podem ser atribuídas à modos do anel aromático e do anel heterocíclico. As bandas das carbonilas em 1624 e 1670 cm^{-1} não são intensificadas.

Nos espectros RR do ânion nisa⁻ (figura 56C), fora de ressonância (514 nm), o $\nu_s(\text{NO}_2)$ em 1316 cm^{-1} pode ser observado, assim como observado nas outras espécies. Na condição de ressonância (457 nm) são observadas, além das

bandas do grupo nitro, as bandas em 1114, 1200, 1262, 1488, 1564 e 1599 cm^{-1} , que podem ser atribuídas à modos do anel aromático e do anel heterocíclico e as bandas em 1679 e 1733 cm^{-1} atribuída às carbonilas amídica e cetônica.

Figura 56 - Espectros RR para as espécies A) nisa, B) Ag(nisa) e C) nisa-. As radiações excitantes (λ_0) são indicadas na figura.

4.3.3. SERS

Os espectros SERS da nisa, adsorvida em solução coloidal de prata, contendo pequena concentração de DMSO, para as radiações excitantes em 785, 633 e 532 nm, são apresentados na figura 57.

Figura 57 - Espectros SERS para o AgNP(nisa) em diferentes radiações excitantes (marcadas na figura).

O espectro SERS obtido em 785 nm apresenta uma intensificação moderada, tendo como bandas predominantes o $\nu_s(\text{NO}_2)$ e a $\nu_s(\text{CO}_{\text{cetona}})$ em 1774 cm^{-1} devida a carbonila cetônica. Ao comparar com os dados obtidos por RR, o valor em frequência do grupo nitro (1327 cm^{-1}) constata-se que o valor observado é semelhante ao complexo Ag(nisa), indicando o mesmo grau de deslocalização eletrônica no complexo de superfície e no complexo molecular.

No espectro SERS obtido em 633 nm observa-se uma intensificação de bandas relacionadas aos modos vibracionais do anel aromático e anel heterocíclico em 1010, 1049, 1130 1169, 1220, 1271 e 1418 cm^{-1} . A banda da carbonila cetônica apresenta a mesma intensidade que no espectro SERS em 785 nm.

Uma grande intensificação é observada quando se utiliza a radiação excitante em 532 nm. A intensificação dos modos do anel aromático e do anel heterocíclico, iniciada em 633 nm, aumenta para a radiação 532 nm. Nesta radiação é observado a intensificação da banda da carbonila amídica em 1730 cm^{-1} .

Cálculo TDDFT para o sistema AgNP(nisa), realizado com um cluster contendo 20 átomos de prata, fornecem uma visualização dos orbitais de fronteira, que pode ser visualizado na figura 58. Os orbitais moleculares indicam que a nisa se liga às nanopartículas pela carbonila amídica e que existe uma transição eletrônica do nível de Fermi da nanopartícula para a molécula observada em 736 nm. Os cálculos realizados com o funcional B3LYP dão um valor menor de energia para transições do tipo transferência de carga, sendo assim pode-se considerar que essa transição corresponde à transição experimentalmente em ressonância com a radiação em 532 nm.

Figura 58 - Orbitais de fronteira envolvidos na transição de transferência de carga do nível de Fermi do cluster de prata para a nisa obtidas por TDDFT.

Comparando-se os espectros RR e SERS pode-se afirmar que o complexo de superfície AgNP(nisa) apresenta um grupo cromofórico distinto daqueles observados nas espécies moleculares nisa, Ag(nisa) e nisa⁻.

A frequência do grupo nitro, que é usualmente utilizada como sonda molecular para avaliar a deslocalização de cargas em um sistema molecular, indica que o complexo de superfície apresenta um comportamento semelhante ao complexo molecular Ag(nisa), no entanto seu comportamento espectral é distinto de qualquer espécie estudada por RR, levando à conclusão que a espécie adsorvida na superfície das AgNP possui propriedades eletrônicas distintas daquelas estudadas em solução.

4.4. Conclusões

Com a utilização da técnica RR e SERS, em conjunto com metodologias teóricas, foi possível caracterizar o complexo de superfície formado entre a nisa e AgNP, identificando as características vibracionais e eletrônicas do sistema.

Apesar de se pensar que o complexo molecular Ag(nisa) poderia ser um bom modelo para entender o complexo de superfície AgNP(nisa) foi verificado que o complexo de superfície apresenta unidades cromofóricas distintas daquelas observadas nos sistemas nisa, nisa⁻ e Ag(nisa).

Espectroscopicamente, o complexo de superfície caracterizado por SERS, apresenta semelhanças com o complexo Ag(nisa) fora da ressonância, no entanto, ao utilizar a radiação excitante em 532 nm, foi verificado um efeito de ressonância que apresenta um comportamento espectral semelhante ao ânion nisa⁻.

5. Conclusões Gerais e Perspectivas

Os complexos oxindolímínicos de cobre (II) se mostraram um desafio frente a sua baixa intensificação SERS. Em solução aquosa contendo pequena quantidade de DMSO esses complexos induzem agregação quase imediata do ouro coloidal, somada a baixa intensificação SERS dos mesmos. Para o imageamento SERS desses complexos em células *HeLa* foi necessária a utilização de um marcador Raman e baixas concentrações desses complexos.

A utilização da técnica SERS para a identificação do alvo intracelular dos complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp) em células *HeLa* vivas, apresentou alguns problemas experimentais, como descrito, porém foi possível identificar que os sistemas que continham os complexos Cu(isatp) e Cu(nisatp) atacam os corpos lipídicos das células, além de permitirem a entrada de AuNP no interior das células sem causar a entrada de água na mesma, uma característica que somente as células dos grupos de controle apresentaram. O ataque ao núcleo celular numa concentração abaixo do IC₅₀ destes compostos é observado (pelo espalhamento da componente proteica na célula), o que sugere que os complexos e as AuNP apresentam um possível efeito sinérgico, que poderá ser comprovado com futuros ensaios bioquímicos. A utilização de duas radiações excitantes para o mesmo imageamento celular é uma metodologia até agora não descrita na literatura.

No estudo do complexo de superfície formado entre a 5-nitroisatina e AgNP foi possível identificar um novo grupo cromofórico que não é observado na espécie aniônica $nisa^-$ e nem no complexo Ag(*nisa*). Essa unidade cromofórica distinta no complexo de superfície AgNP(*nisa*) foi observada numa região do espectro visível próximo do verde, enquanto que as espécies moleculares apresentam transições somente na região de mais alta energia. O estudo dos complexos de superfície leva a um maior entendimento das propriedades eletrônicas dessas espécies, que é defasada na literatura. Estudos com isatinas substituídas com outros grupos, além do nitro, estão sendo planejados para verificar se há alguma correlação dos substituintes com os complexos de superfície formados.

6. Referências Bibliográficas

- (1) Mjos, K. D.; Orvig, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4540–4563. <https://doi.org/10.1021/cr400460s>.
- (2) Helsel, M. E.; Franz, K. J. Pharmacological Activity of Metal Binding Agents That Alter Copper Bioavailability. *Dalt. Trans.* **2015**, *44* (19), 8760–8770. <https://doi.org/10.1039/C5DT00634A>.
- (3) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode [17]. *Nature* **1965**, *205* (4972), 698–699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>.
- (4) Dasari, S.; Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>.
- (5) Yarbrow, C. H. Carboplatin: A Clinical Review. *Semin. Oncol. Nurs.* **1989**, *5* (2), 63–69. [https://doi.org/10.1016/0749-2081\(89\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0749-2081(89)90083-1).
- (6) Raymond, E.; Chaney, S. G.; Taamma, A.; Cvitkovic, E. Oxaliplatin: A Review of Preclinical and Clinical Studies. *Ann. Oncol.* **1998**, *9* (10), 1053–1071. <https://doi.org/10.1023/A:1008213732429>.
- (7) Benkendorff, K. Natural Product Research in the Australian Marine Invertebrate Dicotyledons. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (4), 1370–1398. <https://doi.org/10.3390/md11041370>.
- (8) Güven, K. C.; Percot, A.; Sezik, E. Alkaloids in Marine Algae. *Mar. Drugs* **2010**, *8* (2), 269–284. <https://doi.org/10.3390/md8020269>.
- (9) Kochanowska-Karmay, A. J.; Hamann, M. T. Marine Indole Alkaloids: Potential New Drug Leads for the Control of Depression and Anxiety. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (8), 4489–4497. <https://doi.org/10.1021/cr900211p>.
- (10) Evdokimov, N. M.; Magedov, I. V.; McBrayer, D.; Kornienko, A. Isatin Derivatives with Activity against Apoptosis-Resistant Cancer Cells. *Bioorg. Med.*

Chem. Lett. **2016**, 26 (6), 1558–1560.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.02.015>.

- (11) Erdmann, O. L. Untersuchungen Über Den Indigo. *J. für Prakt. Chemie* **1840**, 19 (1), 321–362. <https://doi.org/10.1002/prac.18400190161>.
- (12) Medvedev, A. E.; Clow, A.; Sandler, M.; Glover, V. Isatin: A Link between Natriuretic Peptides and Monoamines? *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 52 (3), 385–391. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(96\)00206-7](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00206-7).
- (13) Hans, R. H.; Wiid, I. J. F.; van Helden, P. D.; Wan, B.; Franzblau, S. G.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Chibale, K. Novel Thiolactone–Isatin Hybrids as Potential Antimalarial and Antitubercular Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (7), 2055–2058. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.02.008>.
- (14) Pandeya, S. N.; Sriram, D.; Nath, G.; DeClercq, E. Synthesis, Antibacterial, Antifungal and Anti-HIV Activities of Schiff and Mannich Bases Derived from Isatin Derivatives and N-[4-(4'-Chlorophenyl)Thiazol-2-Yl] Thiosemicarbazide. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1999**, 9 (1), 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(99\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(99)00038-X).
- (15) Silva, B. V. Isatin, a Versatile Molecule: Studies in Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, 24 (5), 707–720. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130089>.
- (16) da Silveira, V. C.; Luz, J. S.; Oliveira, C. C.; Graziani, I.; Ciriolo, M. R.; Ferreira, A. M. da C. Double-Strand DNA Cleavage Induced by Oxindole-Schiff Base Copper(II) Complexes with Potential Antitumor Activity. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, 102 (5–6), 1090–1103. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.12.033>.
- (17) Katkar, P.; Coletta, A.; Castelli, S.; Sabino, G. L.; Couto, R. A. A.; da Costa Ferreira, A. M.; Desideri, A. Effect of Oxindolimine Copper(II) and Zinc(II) Complexes on Human Topoisomerase I Activity. *Metallomics* **2014**, 6 (1), 117–125. <https://doi.org/10.1039/C3MT00099K>.
- (18) Miguel, R. B.; Petersen, P. A. D.; Gonzales-Zubiate, F. A.; Oliveira, C. C.; Kumar, N.; Do Nascimento, R. R.; Petrilli, H. M.; Da Costa Ferreira, A. M.

- Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase CDK1 by Oxindolimine Ligands and Corresponding Copper and Zinc Complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20* (7), 1205–1217. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1300-4>.
- (19) Cerchiaro, G.; Micke, G. A.; Tavares, M. F. M.; da Costa Ferreira, A. M. Kinetic Studies of Carbohydrate Oxidation Catalyzed by Novel Isatin-Schiff Base Copper(II) Complexes. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2004**, *221* (1–2), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2004.06.017>.
- (20) Méndez-Ardoy, A.; Lostalé-Seijo, I.; Montenegro, J. Where in the Cell Is Our Cargo? Methods Currently Used To Study Intracellular Cytosolic Localisation. *ChemBioChem* **2019**, *20* (4), 488–498. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800390>.
- (21) Fus, F.; Yang, Y.; Lee, H. Z. S.; Top, S.; Carriere, M.; Bouron, A.; Pacureanu, A.; da Silva, J. C.; Salmain, M.; Vessièrès, A.; et al. Intracellular Localization of an Osmocenyl-Tamoxifen Derivative in Breast Cancer Cells Revealed by Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence Nanoimaging. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2019**, *58* (11), 3461–3465. <https://doi.org/10.1002/anie.201812336>.
- (22) Hassan, U. A.; Hussein, M. Z.; Alitheen, N. B.; Ariff, S. A. Y.; Masarudin, M. J. In Vitro Cellular Localization and Efficient Accumulation of Fluorescently Tagged Biomaterials from Monodispersed Chitosan Nanoparticles for Elucidation of Controlled Release Pathways for Drug Delivery Systems. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, *13*, 5075–5095. <https://doi.org/10.2147/IJN.S164843>.
- (23) Raman, C. V.; Krishnan, K. S. A New Type of Secondary Radiation [11]. *Nature* **1928**, *121* (3048), 501–502. <https://doi.org/10.1038/121501c0>.
- (24) Mössinger, J. C.; Shallcross, D. E.; Anthony Cox, R. UV–VIS Absorption Cross-Sections and Atmospheric Lifetimes of CH₂Br₂, CH₂I₂ and CH₂BrI. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1998**, *94* (10), 1391–1396. <https://doi.org/10.1039/a709160e>.
- (25) Weber, H.; Liao, P.; Tofield, B. Emission Cross Section and Fluorescence Efficiency of Nd-Pentaphosphate. *IEEE J. Quantum Electron.* **1974**, *10* (7),

- 563–567. <https://doi.org/10.1109/JQE.1974.1068195>.
- (26) Snee, M.; Ubachs, W. Direct Measurement of the Rayleigh Scattering Cross Section in Various Gases. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **2005**, *92* (3), 293–310. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2004.07.025>.
- (27) Foster, C. E.; Barham, B. P.; Reid, P. J. Resonance Raman Intensity Analysis of Chlorine Dioxide Dissolved in Chloroform: The Role of Nonpolar Solvation. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114* (19), 8492–8504. <https://doi.org/10.1063/1.1362297>.
- (28) Kneipp, K.; Kneipp, H.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S. Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman Spectroscopy. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (10), 2957–2976. <https://doi.org/10.1021/cr980133r>.
- (29) Michaels, A. M.; Nirmal, M.; Brus, L. E. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Individual Rhodamine 6G Molecules on Large Ag Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (43), 9932–9939. <https://doi.org/10.1021/ja992128q>.
- (30) Nie, S. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* (80-.). **1997**, *275* (5303), 1102–1106. <https://doi.org/10.1126/science.275.5303.1102>.
- (31) Baiardi, A.; Bloino, J.; Barone, V. General Time Dependent Approach to Vibronic Spectroscopy Including Franck-Condon, Herzberg-Teller, and Duschinsky Effects. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9* (9), 4097–4115. <https://doi.org/10.1021/ct400450k>.
- (32) Hassing, S.; Svendsen, E. N. The Correct Form of the Raman Scattering Tensor. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35* (1), 87–90. <https://doi.org/10.1002/jrs.1105>.
- (33) Healy, W. P. A Generalization of the Kramers-Heisenberg Dispersion Formula. *Phys. Rev. A* **1977**, *16* (4), 1568–1574. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.16.1568>.
- (34) Hu, S.; Spiro, T. G.; Morris, I. K.; Singh, J. P.; Smith, K. M. Complete Assignment of Cytochrome c Resonance Raman Spectra via Enzymatic

- Reconstitution with Isotopically Labeled Hemes. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (26), 12446–12458. <https://doi.org/10.1021/ja00079a028>.
- (35) Fleischmann, M.; Hendra, P. J.; McQuillan, A. J. Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *26* (2), 163–166. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)85388-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)85388-1).
- (36) Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P. Surface Raman Spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1977**, *84* (1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(77\)80224-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(77)80224-6).
- (37) Albrecht, M. G.; Creighton, J. A. Anomalous Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (15), 5215–5217. <https://doi.org/10.1021/ja00457a071>.
- (38) Temperini, M. L. A.; Chagas, H. C.; Sala, O. Raman Spectra of Pyridine Adsorbed on a Copper Electrode. *Chem. Phys. Lett.* **1981**, *79* (1), 75–78. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(81\)85291-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(81)85291-8).
- (39) Xie, W.; Walkenfort, B.; Schlücker, S. Label-Free SERS Monitoring of Chemical Reactions Catalyzed by Small Gold Nanoparticles Using 3D Plasmonic Superstructures. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (5), 1657–1660. <https://doi.org/10.1021/ja309074a>.
- (40) Kitahama, Y.; Itoh, T.; Pienpinijtham, P.; Ekgasit, S.; Han, X. X.; Ozaki, Y. Biological Applications of SERS Using Functional Nanoparticles. *ACS Symp. Ser.* **2012**, *1113*, 181–234. <https://doi.org/10.1021/bk-2012-1113.ch009>.
- (41) Huefner, A.; Kuan, W.; Barker, R. a; Mahajan, S. Intracellular SERS Nanoprobes For Distinction Of Different Neuronal Cell Types. *Nano Lett.* **2013**, *13* (6), 2463–2470. <https://doi.org/10.1021/nl400448n>.
- (42) Kuku, G.; Saricam, M.; Akhatova, F.; Danilushkina, A.; Fakhrullin, R.; Culha, M. Surface-Enhanced Raman Scattering to Evaluate Nanomaterial Cytotoxicity on Living Cells. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (19), 9813–9820. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02917>.

- (43) Tran, M.; Whale, A.; Padalkar, S. Exploring the Efficacy of Platinum and Palladium Nanostructures for Organic Molecule Detection via Raman Spectroscopy. *Sensors* **2018**, *18* (2), 147. <https://doi.org/10.3390/s18010147>.
- (44) Aslam, U.; Rao, V. G.; Chavez, S.; Linic, S. Catalytic Conversion of Solar to Chemical Energy on Plasmonic Metal Nanostructures. *Nat. Catal.* **2018**, *1* (9), 656–665. <https://doi.org/10.1038/s41929-018-0138-x>.
- (45) Fateixa, S.; Nogueira, H. I. S.; Trindade, T. Hybrid Nanostructures for SERS: Materials Development and Chemical Detection. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (33), 21046–21071. <https://doi.org/10.1039/c5cp01032b>.
- (46) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, M. A. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2740–2779. <https://doi.org/10.1039/C1CS15237H>.
- (47) Mejía-Salazar, J. R.; Camacho, S. A.; Constantino, C. J. L.; Oliveira Junior, O. N. New Trends in Plasmonic (Bio)Sensing. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2018**, *90* (1), 779–801. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170571>.
- (48) Wei, H.; Hossein Abtahi, S. M.; Vikesland, P. J. Plasmonic Colorimetric and SERS Sensors for Environmental Analysis. *Environ. Sci. Nano* **2015**, *2* (2), 120–135. <https://doi.org/10.1039/C4EN00211C>.
- (49) Champion, A.; Kambhampati, P. Surface-Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27* (4), 241. <https://doi.org/10.1039/a827241z>.
- (50) Lombardi, J. R.; Birke, R. L.; Lu, T.; Xu, J. Charge-Transfer Theory of Surface Enhanced Raman Spectroscopy: Herzberg-Teller Contributions. *J. Chem. Phys.* **1986**, *84* (8), 4174–4180. <https://doi.org/10.1063/1.450037>.
- (51) Jensen, L.; Aikens, C. M.; Schatz, G. C. Electronic Structure Methods for Studying Surface-Enhanced Raman Scattering. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (5), 1061–1073. <https://doi.org/10.1039/b706023h>.
- (52) Marçó, P. H.; Valderrama, P.; Alexandrino, G. L.; Poppi, R. J.; Tauler, R. Multivariate Curve Resolution With Alternating Least Squares: Description,

Operation and Applications. *Quim. Nova* **2014**, *37*(9), 1525–1532.
<https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140205>.

- (53) Marro, M.; Nieva, C.; De Juan, A.; Sierra, A. Unravelling the Metabolic Progression of Breast Cancer Cells to Bone Metastasis by Coupling Raman Spectroscopy and a Novel Use of Mcr-Als Algorithm. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (9), 5594–5602. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04527>.
- (54) Felten, J.; Hall, H.; Jaumot, J.; Tauler, R.; De Juan, A.; Gorzsás, A. Vibrational Spectroscopic Image Analysis of Biological Material Using Multivariate Curve Resolution-Alternating Least Squares (MCR-ALS). *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (2), 217–240. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.008>.
- (55) Ando, M.; Hamaguchi, H. Molecular Component Distribution Imaging of Living Cells by Multivariate Curve Resolution Analysis of Space-Resolved Raman Spectra. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *19* (1), 011016.
<https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.1.011016>.
- (56) NOOTHALAPATI, H.; IWASAKI, K.; YAMAMOTO, T. Biological and Medical Applications of Multivariate Curve Resolution Assisted Raman Spectroscopy. *Anal. Sci.* **2017**, *33* (1), 15–22. <https://doi.org/10.2116/analsci.33.15>.
- (57) Villa, J. E. L.; Poppi, R. J. A Portable SERS Method for the Determination of Uric Acid Using a Paper-Based Substrate and Multivariate Curve Resolution. *Analyst* **2016**, *141* (6), 1966–1972. <https://doi.org/10.1039/C5AN02398J>.
- (58) Mamián-López, M. B.; Corio, P.; Temperini, M. L. A. Cooperative Hydrogen-Bonding of the Adenine–Thymine Pair as a Strategy for Lowering the Limit of Detection of Thymine by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Analyst* **2016**, *141* (11), 3428–3436. <https://doi.org/10.1039/C6AN00222F>.
- (59) Yamakoshi, H.; Palonpon, A.; Dodo, K.; Ando, J.; Kawata, S.; Fujita, K.; Sodeoka, M. A Sensitive and Specific Raman Probe Based on Bisarylbutadiyne for Live Cell Imaging of Mitochondria. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (3), 664–667. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.11.080>.

- (60) Yamakoshi, H.; Dodo, K.; Palonpon, A.; Ando, J.; Fujita, K.; Kawata, S.; Sodeoka, M. Alkyne-Tag Raman Imaging for Visualization of Mobile Small Molecules in Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (51), 20681–20689. <https://doi.org/10.1021/ja308529n>.
- (61) Chen, H.; Guo, D.; Gan, Z.; Jiang, L.; Chang, S.; Li, D. A Phenylboronate-Based SERS Nanoprobe for Detection and Imaging of Intracellular Peroxynitrite. *Microchim. Acta* **2019**, *186* (1), 11. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3129-3>.
- (62) Klein, K.; Gigler, A. M.; Aschenbrenner, T.; Monetti, R.; Bunk, W.; Jamitzky, F.; Morfill, G.; Stark, R. W.; Schlegel, J. Label-Free Live-Cell Imaging with Confocal Raman Microscopy. *Biophys. J.* **2012**, *102* (2), 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.027>.
- (63) Lee, P. C.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (17), 3391–3395. <https://doi.org/10.1021/j100214a025>.
- (64) Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J.; Fernig, D. G. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (11), 4215–4221. <https://doi.org/10.1021/ac0702084>.
- (65) Martens, W. N.; Frost, R. L.; Kristof, J.; Theo Klopprogge, J. Raman Spectroscopy of Dimethyl Sulphoxide and Deuterated Dimethyl Sulphoxide at 298 and 77 K. *J. Raman Spectrosc.* **2002**, *33* (2), 84–91. <https://doi.org/10.1002/jrs.827>.
- (66) Wang, Y.; Wee, E. J. H.; Trau, M. Highly Sensitive DNA Methylation Analysis at CpG Resolution by Surface-Enhanced Raman Scattering via Ligase Chain Reaction (LCR). *Chem. Commun.* **2015**, *51* (54), 10953–10956. <https://doi.org/10.1039/C5CC03921E>.
- (67) Chourpa, I.; Morjani, H.; Riou, J. F.; Manfait, M. Intracellular Molecular Interactions of Antitumor Drug Amsacrine (m-AMSA) as Revealed by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *FEBS Lett.* **1996**, *397* (1), 61–64.

[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01141-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01141-6).

- (68) Shinzawa, H.; Awa, K.; Kanematsu, W.; Ozaki, Y. Multivariate Data Analysis for Raman Spectroscopic Imaging. *J. Raman Spectrosc.* **2009**, *40* (12), 1720–1725. <https://doi.org/10.1002/jrs.2525>.
- (69) Kendall, C.; Isabelle, M.; Bazant-Hegemark, F.; Hutchings, J.; Orr, L.; Babrah, J.; Baker, R.; Stone, N. Vibrational Spectroscopy: A Clinical Tool for Cancer Diagnostics. *Analyst* **2009**, *134* (6), 1029. <https://doi.org/10.1039/b822130h>.
- (70) Prats Mateu, B.; Harreither, E.; Schosserer, M.; Puxbaum, V.; Gludovacz, E.; Borth, N.; Gierlinger, N.; Grillari, J. Label-Free Live Cell Imaging by Confocal Raman Microscopy Identifies CHO Host and Producer Cell Lines. *Biotechnol. J.* **2017**, *12* (1). <https://doi.org/10.1002/biot.201600037>.
- (71) Dvořák, Z.; Štarha, P.; Trávníček, Z. Evaluation of in Vitro Cytotoxicity of 6-Benzylaminopurine Carboplatin Derivatives against Human Cancer Cell Lines and Primary Human Hepatocytes. *Toxicol. Vitro.* **2011**, *25* (3), 652–656. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.002>.
- (72) Jaumot, J.; de Juan, A.; Tauler, R. MCR-ALS GUI 2.0: New Features and Applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, *140*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2014.10.003>.
- (73) Tiwari, S.; Ando, M.; Hamaguchi, H. O. Investigation of Organelle-Specific Intracellular Water Structures with Raman Microspectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **2013**, *44* (2), 167–169. <https://doi.org/10.1002/jrs.4165>.
- (74) Wood, B. R.; Quinn, M. A.; Tait, B.; Ashdown, M.; Hislop, T.; Romeo, M.; McNaughton, D. FTIR Microspectroscopic Study Of Cell Types And Potential Confounding Variables In Screening For Cervical Malignancies. *Biospectroscopy* **1998**, *4* (2), 75–91. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1998\)4:2<75::AID-BSPY1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1998)4:2<75::AID-BSPY1>3.0.CO;2-R).
- (75) Huang, N.; Short, M.; Zhao, J.; Wang, H.; Lui, H.; Korbelik, M.; Zeng, H. Full Range Characterization of the Raman Spectra of Organs in a Murine Model.

- Opt. Express* **2011**, 19 (23), 22892. <https://doi.org/10.1364/OE.19.022892>.
- (76) Sigurdsson, S.; Philipsen, P. A.; Hansen, L. K.; Larsen, J.; Gniadecka, M.; Wulf, H. C. Detection of Skin Cancer by Classification of Raman Spectra. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **2004**, 51 (10), 1784–1793. <https://doi.org/10.1109/TBME.2004.831538>.
- (77) Koljenović, S.; Schut, T. B.; Vincent, A.; Kros, J. M.; Puppels, G. J. Detection of Meningioma in Dura Mater by Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (24), 7958–7965. <https://doi.org/10.1021/ac0512599>.
- (78) Krafft, C.; Neudert, L.; Simat, T.; Salzer, R. Near Infrared Raman Spectra of Human Brain Lipids. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, 61 (7), 1529–1535. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2004.11.017>.
- (79) Almond, L. M.; Hutchings, J.; Lloyd, G.; Barr, H.; Shepherd, N.; Day, J.; Stevens, O.; Sanders, S.; Wadley, M.; Stone, N.; et al. Endoscopic Raman Spectroscopy Enables Objective Diagnosis of Dysplasia in Barrett's Esophagus. *Gastrointest. Endosc.* **2014**, 79 (1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.gie.2013.05.028>.
- (80) Uzunbajakava, N.; Lenferink, A.; Kraan, Y.; Volokhina, E.; Vrensen, G.; Greve, J.; Otto, C. Nonresonant Confocal Raman Imaging of DNA and Protein Distribution in Apoptotic Cells. *Biophys. J.* **2003**, 84 (6), 3968–3981. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75124-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75124-8).
- (81) Talari, A. C. S.; Movasaghi, Z.; Rehman, S.; Rehman, I. U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2015**, 50 (1), 46–111. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.923902>.
- (82) Huang, Z.; McWilliams, A.; Lui, H.; McLean, D. I.; Lam, S.; Zeng, H. Near-Infrared Raman Spectroscopy for Optical Diagnosis of Lung Cancer. *Int. J. Cancer* **2003**, 107 (6), 1047–1052. <https://doi.org/10.1002/ijc.11500>.
- (83) Farquharson, S.; Gift, A. D.; Shende, C.; Maksymiuk, P.; Inscore, F. E.; Murran, J. Detection of 5-Fluorouracil in Saliva Using Surface-Enhanced Raman

- Spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **2005**, *38* (1–2), 79–84.
<https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.02.021>.
- (84) Shetty, G.; Kendall, C.; Shepherd, N.; Stone, N.; Barr, H. Raman Spectroscopy: Elucidation of Biochemical Changes in Carcinogenesis of Oesophagus. *Br. J. Cancer* **2006**, *94* (10), 1460–1464. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603102>.
- (85) Silveira, L.; Sathaiah, S.; Zngaro, R. A.; Pacheco, M. T. T.; Chavantes, M. C.; Pasqualucci, C. A. G. Correlation between Near-Infrared Raman Spectroscopy and the Histopathological Analysis of Atherosclerosis in Human Coronary Arteries. *Lasers Surg. Med.* **2002**, *30* (4), 290–297.
<https://doi.org/10.1002/lsm.10053>.
- (86) Binoy, J.; Abraham, J. P.; Joe, I. H.; Jayakumar, V. S.; Pettit, G. R.; Nielsen, O. F. NIR-FT Raman and FT-IR Spectral Studies and Ab Initio Calculations of the Anti-Cancer Drug Combretastatin-A4. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35* (11), 939–946. <https://doi.org/10.1002/jrs.1236>.
- (87) Schulz, H.; Baranska, M. Identification and Quantification of Valuable Plant Substances by IR and Raman Spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **2007**, *43* (1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2006.06.001>.
- (88) Ruiz-Chica, A. J.; Medina, M. A.; Sánchez-Jiménez, F.; Ramírez, F. J. Characterization by Raman Spectroscopy of Conformational Changes on Guanine-Cytosine and Adenine-Thymine Oligonucleotides Induced by Aminoxy Analogues of Spermidine. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35* (2), 93–100.
<https://doi.org/10.1002/jrs.1107>.
- (89) Li, X.; Yang, T.; Li, S.; Yu, T. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Differences of Saliva between Lung Cancer Patients and Normal People. *Clin. Biomed. Spectrosc. Imaging II* **2011**, *8087*, 808722–808725.
<https://doi.org/10.1117/12.889320>.
- (90) Harder, S. J.; Matthews, Q.; Isabelle, M.; Brolo, A. G.; Lum, J. J.; Jirasek, A. A Raman Spectroscopic Study of Cell Response to Clinical Doses of Ionizing Radiation. *Appl. Spectrosc.* **2015**, *69* (2), 193–204.

<https://doi.org/10.1366/14-07561>.

- (91) Lau, D. P.; Huang, Z.; Lui, H.; Man, C. S.; Berean, K.; Morrison, M. D.; Zeng, H. Raman Spectroscopy for Optical Diagnosis in Normal and Cancerous Tissue of the Nasopharynx - Preliminary Findings. *Lasers Surg. Med.* **2003**, *32* (3), 210–214. <https://doi.org/10.1002/lsm.10084>.
- (92) Dukor, R. K. Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Griffiths, P. R., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2006. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s8107>.
- (93) Chan, J. W.; Taylor, D. S.; Zwerdling, T.; Lane, S. M.; Ihara, K.; Huser, T. Micro-Raman Spectroscopy Detects Individual Neoplastic and Normal Hematopoietic Cells. *Biophys. J.* **2006**, *90* (2), 648–656. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066761>.
- (94) Huefner, A.; Septiadi, D.; Wilts, B. D.; Patel, I. I.; Kuan, W. L.; Fragniere, A.; Barker, R. A.; Mahajan, S. Gold Nanoparticles Explore Cells: Cellular Uptake and Their Use as Intracellular Probes. *Methods* **2014**, *68* (2), 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.006>.
- (95) Septiadi, D.; Crippa, F.; Moore, T. L.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Nanoparticle–Cell Interaction: A Cell Mechanics Perspective. *Adv. Mater.* **2018**, *30* (19), 1–30. <https://doi.org/10.1002/adma.201704463>.
- (96) Wang, X.; Wang, X.; Bai, X.; Yan, L.; Liu, T.; Wang, M.; Song, Y.; Hu, G.; Gu, Z.; Miao, Q.; et al. Nanoparticle Ligand Exchange and Its Effects at the Nanoparticle-Cell Membrane Interface. *Nano Lett.* **2019**, *19* (1), 8–18. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b02638>.
- (97) Schmidt, M. S.; Perillo, I. A.; González, M.; Blanco, M. M. Reaction of Isatin with Alkylating Agents with Acidic Methylenes. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (20), 2514–2517. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.03.010>.
- (98) Da Silva, J. F. M.; Garden, S. J.; Pinto, A. C. The Chemistry of Isatins: A Review from 1975 to 1999. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12* (3), 273–324.

<https://doi.org/10.1590/S0103-50532001000300002>.

- (99) Beaula, T. J.; Joe, I. H.; Rastogi, V. K.; Jothy, V. B. Spectral Investigations, DFT Computations and Molecular Docking Studies of the Antimicrobial 5-Nitroisatin Dimer. *Chem. Phys. Lett.* **2015**, *624*, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2015.02.026>.
- (100) Oliveira, S. C. B.; Fernandes, I. P. G.; Silva, B. V.; Pinto, A. C.; Oliveira-Brett, A. M. Isatin Nitro-Derivatives Redox Behaviour. *J. Electroanal. Chem.* **2013**, *689*, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.10.018>.
- (101) Sonawane, R. P.; Tripathi, R. R. The Chemistry and Synthesis of 1H-Indole-2,3-Dione (Isatin) and Its Derivatives. *Int. Lett. Chem. Phys. Astron.* **2013**, *12* (1), 30–36. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILCPA.12.30>.
- (102) Dong, L.; Gao, Z.; Lin, N. Self-Assembly of Metal–Organic Coordination Structures on Surfaces. *Prog. Surf. Sci.* **2016**, *91* (3), 101–135. <https://doi.org/10.1016/j.progsurf.2016.08.001>.
- (103) Jono, R.; Fujisawa, J.; Segawa, H.; Yamashita, K. Theoretical Study of the Surface Complex between TiO₂ and TCNQ Showing Interfacial Charge-Transfer Transitions. *J. Phys. Chem. Lett.* **2011**, *2* (10), 1167–1170. <https://doi.org/10.1021/jz200390g>.
- (104) Copéret, C.; Chabanas, M.; Petroff Saint-Arroman, R.; Basset, J.-M. Homogeneous and Heterogeneous Catalysis: Bridging the Gap through Surface Organometallic Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42* (2), 156–181. <https://doi.org/10.1002/anie.200390072>.
- (105) Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D. G. A Rapid Method to Estimate the Concentration of Citrate Capped Silver Nanoparticles from UV-Visible Light Spectra. *Analyst* **2014**, *139* (19), 4855. <https://doi.org/10.1039/C4AN00978A>.
- (106) Tisovský, P.; Šandrik, R.; Horváth, M.; Donovalová, J.; Filo, J.; Gáplovský, M.; Jakusová, K.; Cigáň, M.; Sokolík, R.; Gáplovský, A. Effect of Structure on

Charge Distribution in the Isatin Anions in Aprotic Environment: Spectral Study. *Molecules* **2017**, *22* (11). <https://doi.org/10.3390/molecules22111961>.

- (107) Laury, M. L.; Carlson, M. J.; Wilson, A. K. Vibrational Frequency Scale Factors for Density Functional Theory and the Polarization Consistent Basis Sets. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33* (30), 2380–2387. <https://doi.org/10.1002/jcc.23073>.
- (108) Frisch, M. J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenber, D. J. Gaussian 09. *Gaussian, Inc. Wallingford CT* **2009**. <https://doi.org/111>.

7. Apêndices

Apêndice A. Imagens das Células do Grupo A

A.1. Célula A1

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,96
Falta de ajuste (%)	1,918

A.2. Célula A2

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,94
Falta de ajuste (%)	2,435

Apêndice B. Imagens das Células do Grupo B

B.1. Célula B1

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,99
Falta de ajuste (%)	0,667

B.2. Célula B2

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,99
Falta de ajuste (%)	0,693

Apêndice C. Imagens das Células do Grupo C

C.1. Célula C2

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,99
Falta de ajuste (%)	0,717

C.2. Célula C5

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,99
Falta de ajuste (%)	0,670

Apêndice D. Imagens das Células do Grupo D

D.1. Célula D1

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,98
Falta de ajuste (%)	1,460

D.2. Célula D2

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,97
Falta de ajuste (%)	1,631

Apêndice E. Imagens das Células do Grupo E

E.1. Célula E1

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,98
Falta de ajuste (%)	1,532

E.2. Célula E7

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,94
Falta de ajuste (%)	2,340

Apêndice F. Imagens das Células do Grupo F

F.1. Célula F2

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,96
Falta de ajuste (%)	1,965

F.2. Célula F8

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,77
Falta de ajuste (%)	4,715

Apêndice G. Imagens das Células do Grupo G

G.1. Célula G1

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,98
Falta de ajuste (%)	1,095

G.2. Célula G2

Parâmetros de qualidade do MCR-ALS	
Variância explicada (%)	99,99
Falta de ajuste (%)	1,170

Súmula Curricular

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Jayr Henrique Marin

Local e data de nascimento: São Bernardo do Campo/SP - 28 de janeiro de 1993.

2. EDUCAÇÃO

Colégio Futuro - São Paulo/SP

Ensino Fundamental

Ingresso: 1999 - Conclusão: 2007

Colégio Alvorada - São Paulo/SP

Ensino Médio

Ingresso: 2008 - Conclusão: 2010

Universidade Federal de São Paulo - Diadema/SP

Bacharelado em Química

Ingresso: 2011 - Conclusão: 2015

3. OCUPAÇÃO

Bolsista de Monitoria

Universidade Federal de São Paulo - Diadema - SP

Vigência: 2013 - 2014

Supervisão: Prof. Dr. Luciano Caseli

4. ESTÁGIOS

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)

Universidade de São Paulo

Disciplina: Fundamentos de Espectroscopia e Métodos Espectroscópicos - QFL 1345

Supervisão: Profa. Dra. Marcia Laudelina Arruda Temperini

5. PUBLICAÇÕES

1 - VIEIRA, EDUARDO GUIMARÃES ; MIGUEL, RODRIGO BERNARDI ; DA SILVA, DANIEL RODRIGUES ; BONI FAZZI, RODRIGO ; DE COUTO, RICARDO ALEXANDRE ALVES ; MARIN, JAYR HENRIQUE ; TEMPERINI, Marcia Laudelina Arruda ; DA SILVA SHINOHARA, JORGE ; TOMA, Henrique Eisi ; RUSSO, LILIAN CRISTINA ; MAGALHÃES, YULI THAMIREZ ; DIAS FILHO, NEWTON LUIZ ; FORTI, FÁBIO LUIZ ; DA COSTA FERREIRA, ANA MARIA . Functionalized silica nanoparticles as adjuvant factor to increase the cytotoxicity of metallodrugs toward human tumor cells. NEW JOURNAL OF CHEMISTRY, v. 43, p. 386-398, 2018.