

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

EDER LUIZ MENEZES DA SILVA JUNIOR

**SÍNTESE DE ÓXIDO DE GRAFENO DOPADO COM NANOPARTÍCULAS DE
OURO E FENIL-TIO-FTALOCIANINA COM POTENCIAL PARA
TRATAMENTO FOTODINÂMICO E FOTOTÉRMICO DE CÂNCER DE PELE**

Araraquara
2024



EDER LUIZ MENEZES DA SILVA JUNIOR

Síntese de óxido de grafeno dopado com nanopartículas de ouro e fenil-ftalocianina com potencial para tratamento fotodinâmico e fototérmico de câncer de pele

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Araraquara
2024

S586s	<p>Silva Junior, Eder Luiz Menezes da</p> <p>Síntese de óxido de grafeno dopado com nanopartículas de ouro e fenil-tio-ftalocianina com potencial para tratamento fotodinâmico e fototérmico de câncer de pele / Eder Luiz Menezes da Silva Junior. -- Araraquara, 2024</p> <p>79 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara</p> <p>Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques</p> <p>1. Fotoquimioterapia. 2. Óxido de grafeno. 3. Nanopartículas. 4. Fármacos fotossensibilizantes. 5. Pele - Câncer. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O câncer de pele não-melanomático tem altas chances de cura se detectado e tratado precocemente, pode deixar mutilações na pele se não for tratado adequadamente e em casos extremos levar a morte. No Brasil a estimativa de novos casos desse tipo de câncer em 2020 foi de 176930 e o número de morte registrados no Brasil foi de 2616 em 2019 segundo relatório do Instituto Nacional de Câncer (INCA) de 2022.

No Brasil os gastos para tratamento de câncer passaram de 470 milhões em 1999 para 3,3 bilhões em 2015, isso se deve ao fato de que esses custos estão associados ao tratamento em estágios mais avançados da doença. No Brasil, segundo uma pesquisa encomendada pelo Tribunal de Contas da União, em 2010, 60,5% dos casos de câncer diagnosticados estavam nos estágios 3 e 4 da doença, isso quer dizer que o câncer já estava localmente avançado (estágio 3) ou espalhando para outros órgãos do corpo (estágio 4). Nestes estágios, os custos de tratamento costumam ser 60% a 80% mais caros que os diagnosticados em fase inicial (estágios 1 e 2) e também com possibilidade de cura menores. A incorporação de novas tecnologias para o tratamento de câncer também tende a ser mais barata em estágios iniciais da doença, portanto, poderão ser feitas economias significativas caso o diagnóstico possa ser feito logo nos estágios iniciais. Em específico do câncer de pele não-melanomático, estima-se que o custo do sistema público de saúde em 2010 foi de 37 milhões de reais.

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido estudada como uma alternativa de complemento aos tratamentos convencionais contra o câncer, como a quimioterapia, ou até sua total substituição para o tratamento de câncer em estágios iniciais. E por ser uma técnica de aplicação simples, possibilita a disponibilidade dela em vários lugares do país, fazendo com que as pessoas consigam ter acesso a esse tratamento na fase inicial do câncer, aumentando assim a taxa de sucesso do tratamento.

POTENCIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Non-melanoma skin cancer has high chances of cure if detected and treated early, but it can leave skin mutilations if not properly treated and, in extreme

cases, lead to death. In Brazil, the estimated number of new cases of this type of cancer in 2020 was 176,930, with 2,616 deaths registered in 2019, according to the 2022 report from the National Cancer Institute (INCA).

In Brazil, cancer treatment expenses increased from 470 million in 1999 to 3.3 billion in 2015, primarily due to the association of these costs with more advanced stages of the disease. According to a study commissioned by the Federal Court of Accounts in 2010, 60.5% of diagnosed cancer cases in Brazil were in stages 3 and 4 of the disease, indicating locally advanced cancer (stage 3) or spreading to other organs of the body (stage 4). Treatment costs at these stages are usually 60% to 80% more expensive than those diagnosed in the early stages (stages 1 and 2), with lower chances of cure. The incorporation of new technologies for cancer treatment is also generally less expensive in the early stages of the disease, potentially leading to significant cost savings if the diagnosis is made early.

Specifically for non-melanoma skin cancer, the estimated cost to the public health system in 2010 was 37 million Brazilian reais. Photodynamic therapy (PDT) has been studied as an alternative or complement to conventional cancer treatments, such as chemotherapy, and may even serve as a total replacement for early-stage cancer treatment. Because PDT is a simple application technique, it can be made available in various locations across the country, providing people with access to early-stage cancer treatment and thereby increasing the success rate of treatment.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese de óxido de grafeno dopado com nanopartículas de ouro e fenil-tio-ftalocianina com potencial para tratamento fotodinâmico e fototérmico de câncer de pele"

AUTOR: EDER LUIZ MENEZES DA SILVA JUNIOR

ORIENTADOR: RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Química, pela Comissão Examinadora:



Assinado de forma digital
por RODRIGO FERNANDO
COSTA
MARQUES:57588961104
Dados: 2024.08.02 16:38:45
-03'00'

Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica, Físico Química e Inorgânica / Instituto de Química do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. LEILA APARECIDA CHIAVACCI (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 02 de agosto de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	EDER LUIZ MENEZES DA SILVA JUNIOR 12/05/1994
Nacionalidade	Brasileiro
Nome em citações bibliográficas:	Silva Junior, E. L. M.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/3355297666981004
ORCID	https://orcid.org/0009-0001-1735-0715
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
0000/9999	Bacharel em Química Tecnológica Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	
<p>SILVA JUNIOR, E. L. M.; OLIVEIRA, C. B. L.. SUPERFÍCIE DE ÓXIDO DE GRAFENO MODIFICADA COM ÁCIDO FÓLICO PARA TERAPIAS FOTODINÂMICAS EM CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA UTILIZANDO NANOBASTÕES DE OURO E ZINCO FENIL-TIO-FTALOCIANINA. In: VI Congresso Online Nacional de Química - VI CONDEQUI, 2024. Anais do VI Congresso Online Nacional de Química - VI CONDEQUI, 2024.</p>	
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS	

VI Congresso Online Nacional de Química - VI CONDEQUI, 2024. SUPERFÍCIE DE ÓXIDO DE GRAFENO MODIFICADA COM ÁCIDO FÓLICO PARA TERAPIAS FOTODINÂMICAS EM CÂNCER DE PELE NÃO MELANOMA UTILIZANDO NANOBASTÕES DE OURO E ZINCO FENIL-TIO-FTALOCIANINA. 2024.
(Apresentação oral)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Neste trabalho, objetiva-se a síntese de um material com propriedades fotodinâmicas para que este seja usado no tratamento fototerápico do câncer de pele. Como base para este material foi utilizado o óxido de grafeno, devido a sua biocompatibilidade. Sua síntese segue o método de Hammers modificado. Quando há a inserção de nanopartículas metálicas na estrutura, permite-se que o material atinja uma temperatura maior quando incidida sob ele uma radiação eletromagnética, é sabido que nanopartículas de ouro em formatos de bastões interagem com luz no infravermelho próximo, o qual é o comprimento de onda mais absorvido pela pele humana, podendo assim ser utilizado como agente fototérmico. As Ftalocianinas pertencem a classe de fotossensibilizadores de segunda geração e são compostos promissores para o seu uso em terapia fotodinâmica por apresentar as características necessárias como sua absorção dentro da faixa de comprimento de onda. Foi utilizado então o Zinco Fenil-Tioftalocianina, que ao ser excitado gera espécies reativas de oxigênio, os quais atacarão as células causando sua necrose e/ou apoptose. Com o intuito de que o composto não interaja com as células saudáveis foi adicionado ácido fólico, este pode se ligar facilmente aos receptores de folato que em células normais são expressos em baixa quantidade e em células tumorais em grandes quantidades, resultando em um material seletivo para o câncer. Os resultados de espectroscopia na região do infravermelho, feitos em cada etapa da síntese, mostram que em cada etapa planejada foi obtido o produto desejado. A mudança do comportamento térmico das amostras também corrobora para o resultado de inserção dos compostos na estrutura do óxido de grafeno. A síntese das nanopartículas de ouro foi comprovada através da espectroscopia na região do ultravioleta/visível, que também nos indica o tamanho dessas partículas, de aproximadamente 100nm, que foram observadas também pela microscopia eletrônica de varredura junto com seu formato de nanobastões e a adesão dessas nanopartículas na estrutura do óxido de grafeno funcionalizado. A partir dos resultados de viabilidade celular, pode-se concluir que o material obtido não apresenta citotoxicidade, caracterizando o material planejado como um material com potencial terapêutico multifuncional para aplicações nas terapias fototérmicas e fotodinâmicas.

Palavras-chave: Fotoquimioterapia, óxido de grafeno, nanopartículas, fármacos fotossensibilizante, pele-câncer

ABSTRACT

In this study, the objective is the synthesis of a material with photodynamic properties for use in the phototherapeutic treatment of skin cancer. Graphene oxide was used as the base for this material due to its biocompatibility. Its synthesis follows the modified Hammers method. When metallic nanoparticles are inserted into the structure, it allows the material to reach a higher temperature when exposed to electromagnetic radiation. It is known that gold nanoparticles in rod shapes interact with near-infrared light, which is the wavelength most absorbed by human skin, making it suitable as a photothermal agent. Phthalocyanines belong to the class of second-generation photosensitizers and are promising compounds for use in photodynamic therapy due to their absorption characteristics within the wavelength range. Zinc Phthalocyanine was used, which, when excited, generates reactive oxygen species that will attack cells, causing necrosis and/or apoptosis. To ensure that the compound does not interact with healthy cells, folic acid was added. Folic acid can easily bind to folate receptors, which are expressed in low quantities in normal cells and in large quantities in tumor cells, resulting in a material selective for cancer. Results from infrared spectroscopy at each synthesis stage show that the desired product was obtained at each planned step. The change in the thermal behavior of the samples also supports the result of compound insertion into the graphene oxide structure. The synthesis of gold nanoparticles was confirmed through ultraviolet/visible spectroscopy, indicating their size of approximately 100nm. This size was also observed through scanning electron microscopy along with their nanorod shape and adherence of these nanoparticles to the functionalized graphene oxide structure. From the cell viability results, it can be concluded that the obtained material does not exhibit cytotoxicity, characterizing it as a multifunctional therapeutic material with potential applications in photothermal and photodynamic therapies.

Key-words: Photochemotherapy, graphene oxide, nanoparticles, photosensitizing drugs, skin-cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquematização autoexame para diagnóstico de câncer de pele.....	22
Figura 2. Diagrama de Jablonski adaptado.....	24
Figura 3. Esqueleto Ftalocianina (A) e metal-ftalocianina (B).....	25
Figura 4. Estrutura química da fenil-tio-ftalocianina de zinco (ZnS ₄ Pc) utilizada como ativo fotossensibilizador.....	26
Figura 5. Estrutura do óxido de grafeno e seus grupos oxigenados (a) epóxido, (b) hidroxilas, (c) ácidos carboxílicos.....	28
Figura 6. Esquematização LPSR.....	31
Figura 7. Esquematização da síntese de óxido de grafeno.....	35
Figura 8. Possíveis mecanismos envolvidos durante a segunda etapa de oxidação para (superior) quebra oxidativa das ligações C=C via formação de éster cíclico de manganato, resultando em duas carbonilas e formação de MnO ₂ ; (inferior) quebra oxidativa das ligações C=C em carbonos secundários, produzindo um grupo carboxila e outro carbonila. Kang <i>et al.</i> 2016.....	36
Figura 9. Esquematização reação de adição de ácido fólico.....	37
Figura 10. Mecanismo de reação da abertura do anel epóxi.....	38
Figura 11. Mecanismo de reação da transformação dos grupos OH em ácidos carboxílicos.....	39
Figura 12. Mecanismo de amidação via EDC/NHS.....	40
Figura 13. Mecanismo de crescimento dos nanobastões de ouro na presença de Ag ⁺	43
Figura 14. Mecanismo de funcionalização da Ftalocianina via acoplamento com DCC.....	44
Figura 15. Diferença nos níveis de energia das ligações C-H e C-O.....	51
Figura 16. Difratoograma de raios-x do material de partida (Grafite) e difratogramas do óxido de grafite e óxido de grafeno.....	53
Figura 17. Espectro de UV-vis do óxido de grafeno e grafite.....	54
Figura 18. Espectro de infravermelho do óxido de grafeno e óxido de grafeno com ácido fólico.....	55
Figura 19. Espectro RAMAN do óxido de grafeno e óxido de grafeno com ácido fólico.....	57
Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura para o óxido de grafeno (A) e oxido de grafeno com ácido fólico (B).....	58

Figura 21. Análise termogravimétrica do óxido de grafeno e óxido de grafeno com ácido fólico.....	59
Figura 22. Solução das nanopartículas de ouro.....	60
Figura 23. Espectro de UV-vis das nanopartículas de ouro.....	61
Figura 24. Imagens MEV nanopartículas de ouro.....	61
Figura 25. Resultados da análise de DLS para as nanopartículas de ouro.....	62
Figura 26. Espectrometria no infravermelho para a fenil-tio-Ftalocianina de Zn e o óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e o fotossensibilizador.....	63
Figura 27. Análise termogravimétrica do óxido de grafeno com ácido fólico com o fotossensibilizador.....	64
Figura 28. Comparação entre as análises térmicas do óxido de grafeno, óxido de grafeno com ácido fólico e óxido de grafeno com ácido fólico funcionalizado com o fotossensibilizador.....	65
Figura 29. Espectro de UV-vis para o composto de óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e fotossensibilizador.....	66
Figura 30. Imagem MEV do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e fotossensibilizador.....	67
Figura 31. Imagens MEV com elétrons retroespalhados do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e fotossensibilizador dopado com nanopartículas de ouro.....	67
Figura 32. Espectro UV-vis para o óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e fotossensibilizador e dopado com as nanopartículas de ouro.....	71
Figura 33. Viabilidade celular dos fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) após a exposição dos materiais sintetizados.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atribuições dos sinais de absorção na região do infravermelho para o OG e OG-FA	56
Tabela2 - Principal evento térmico extraídos da curva de TGA.....	60
Tabela 3 - Atribuições dos sinais de absorção na região do infravermelho para o OG-AF-ZnS4Pc.....	65
Tabela 4 - Grupos experimentais e sua Viabilidade celular e coeficiente de variação.....	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Câncer de pele.....	20
2.2 Tratamento Fotodinâmico (TFD).....	23
2.3 Ftalocianinas.....	24
2.4 Ácido Fólico.....	25
2.5 Óxido de grafeno.....	28
2.6 Terapia fototérmica (TFT).....	29
2.7 Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR).....	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivos gerais.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4. METODOLOGIA.....	34
4.1 Síntese de óxido de grafeno (OG).....	34
4.2 Síntese de OG- ácido fólico (OG-AF).....	37
4.2.1 Mecanismo de funcionalização de OG com ácido fólico.....	38
4.3 Síntese de nanopartículas de ouro (AuNPs).....	41
4.3.1 Mecanismo de formação das nanopartículas de ouro.....	41
4.4 Síntese de OG-AF-AuNPs.....	43
4.5 Síntese de OG-AF-AuNPs-ZnS ₄ Pc.....	43
4.5.1 Mecanismo de funcionalização do OG-AF com fenil-tio-ftalocianina de Zinco.....	44
4.6 Ensaio de viabilidade celular HDFn-Resazurina.....	47
4.7 Caracterização do composto proposto.....	48
4.7.1 Espectroscopia UV-vis.....	49
4.7.2 Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG).....	49
4.7.3 Espectroscopia Raman.....	50
4.7.4 Espectroscopia no infravermelho.....	50
4.7.5 Análise Termogravimétrica (TGA).....	51

4.7.6	<i>Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)</i>	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
5.1	Caracterizações	53
5.1.1	<i>Óxido de grafeno (OG) e óxido de grafeno com ácido fólico (OG-AF)</i>	53
5.1.2	<i>Nanobastões de ouro</i>	60
5.1.3	<i>Adição fotossensibilizador</i>	63
5.1.4	<i>Adição nanopartículas na estrutura OG-AF-ZnS4Pc</i>	67
5.2	Ensaio viabilidade celular para fibroblastos humanos dérmicos	69
6.	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

1. Introdução

O câncer de pele é o tipo de câncer mais comum no Brasil e no mundo, sua incidência é mais comum em pessoas com mais de 40 anos e é ocasionado principalmente pela exposição excessiva ao sol. O câncer de pele ocorre quando as células se multiplicam sem controle e é classificado em dois tipos: melanomático e não-melanomático, sendo esse primeiro quando o câncer tem origem nas células produtoras de melanina e o tipo mais raro do câncer (cerca de 3% dos casos de câncer de pele), o segundo é o tipo mais comum e menos perigoso e representa 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil (Ministério da Saúde, 2023).

O câncer de pele melanomático é o tipo mais grave devido à sua alta possibilidade de ocasionar metástase, que é a disseminação do câncer para outros órgãos, mas o prognóstico desse tipo de câncer é considerado bom se detectado em sua fase inicial. No Brasil a estimativa de novos casos desse tipo de câncer em 2020 foi de 8450 e o número de mortes registradas para esse tipo de câncer foi de 1978 mortes em 2019 (INCA, 2022).

O câncer de pele não-melanomático tem altas chances de cura se detectado e tratado precocemente, pode deixar mutilações na pele se não for tratado adequadamente e em casos extremos levar a morte. No Brasil a estimativa de novos casos desse tipo de câncer em 2020 foi de 176930 e o números de morte registrados no Brasil foi de 2616 em 2019 (INCA, 2022).

Segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer, órgão brasileiro auxiliar do Ministério da Saúde, no triênio 2023-2025 surgirão 211.200 novos casos de câncer de não melanomático. A Sociedade Norte-americana de Câncer mostra em seu levantamento que esse aumento do número de câncer está acontecendo a nível global e o número de novos casos de câncer passará de 14,6 milhões para 20,2 milhões por ano entre 2010 e 2030 e a maioria desses casos se dará em países em desenvolvimento, onde os fatores de risco e os processos de promoção e prevenção são em menor controle por parte das autoridades sanitárias (INCA, 2022)

Com esse crescimento exponencial nos casos de câncer, há também um crescimento nos gastos para o diagnóstico e tratamento da doença. Com o vasto território nacional o Sistema Único de Saúde (SUS) encontra-se um problema, pois acaba favorecendo aqueles que vivem nos Estados e municípios onde o SUS oferece melhores serviços para o tratamento da doença, desfavorecendo o grupo de pessoas mais pobres que não conseguem arcar com a locomoção até esses pontos de referência de tratamento.

No Brasil os gastos para tratamento de câncer passaram de 470 milhões em 1999 para 3,3 bilhões em 2015, isso se deve ao fato de que esses custos estão associados ao tratamento em estágios mais avançados da doença. No Brasil, segundo uma pesquisa encomendada pelo Tribunal de Contas da União, em 2010, 60,5% dos casos de câncer diagnosticados estavam nos estágios 3 e 4 da doença, isso quer dizer que o câncer já estava localmente avançado (estágio 3) ou espalhando para outros órgãos do corpo (estágio 4). Nestes estágios, os custos de tratamento costumam ser 60% a 80% mais caros que os diagnosticados em fase inicial (estágios 1 e 2) e também com possibilidade de cura menores. A incorporação de novas tecnologias para o tratamento de câncer também tende a ser mais barata em estágios iniciais da doença, portanto, poderão ser feitas economias significativas caso o diagnóstico possa ser feito logo nos estágios iniciais (GELBAND, 2016). Em específico do câncer de pele não-melanomático, estima-se que o custo do sistema público de saúde em 2010 foi de 37 milhões de reais (SOUZA, 2011).

A terapia fotodinâmica (TFD) tem sido estudada como uma alternativa de complemento aos tratamentos convencionais contra o câncer, como a quimioterapia, ou até sua total substituição para o tratamento de câncer em estágios iniciais. Essa técnica consiste na indução da citotoxicidade das células proliferativas por meio de uma fonte de luz. Para ocorrer esse processo são necessários 3 componentes: o fotossensibilizador, luz e oxigênio (TOREZAN, NIWA, FESTA NETO, 2009).

Essa técnica ocorre em duas etapas. Na primeira, o agente fotossensibilizador se acumula nas células tumorais após sua aplicação no tecido. Na segunda etapa, é emitido sobre o tecido uma onda eletromagnética cujo comprimento de onda seja igual ao do espectro de absorção do agente

fotossensibilizador. Nesta segunda etapa, o agente fotossensibilizador é ativado na presença de luz, levando o composto do estado de fundamental ao seu estado excitado (singleto). Dependendo do tipo de molécula usada como agente fotossensibilizante estas podem retornar ao estado de repouso, emitindo energia em forma de fluorescência ou progredir numa cadeia de reações químicas, até atingir o estado tripleto. As moléculas em seu estado tripleto transferem sua energia diretamente ao oxigênio intracelular, formando o oxigênio singleto (1O_2), altamente reativo, de meia vida curta e responsável pela morte celular (DOLMANS, FUKUMURA, JAIN, 2003).

Em consequência da reatividade do 1O_2 , a célula tumoral passa a apresentar falhas na integridade da membrana, o que leva às alterações na permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelulares. Outras alterações nas membranas do núcleo, mitocôndria, lisossomos e retículo endoplasmático também ocorrem, ocasionando uma morte celular induzida, apoptose, pela TFD devido a essa perda da integridade celular (DOLMANS, FUKUMURA, JAIN, 2003).

A seletividade do tratamento depende da área exposta à luz e do acúmulo preferencial do agente fotossensibilizante nas células tumorais em relação ao tecido normal. Devido à alta taxa de duplicação das células tumorais suas estruturas são alteradas, há uma maior permeabilidade às suas membranas por essas alterações, suas fibras de colágenos são imaturas e semelhantes às observadas em tecido embrionário, essas fibras imaturas constitui um local para retenção e acúmulo do agente fotossensibilizante. Outros fatores que colaboram para essa seletividade são sua rede linfática pouco desenvolvida, ligação das porfirinas a receptores de superfície de lipoproteínas de baixa densidade das células tumorais, presença de macrófagos e menor pH intracelular (TOREZAN, NIWA, FESTA NETO, 2009).

Uma das moléculas direcionadoras mais utilizados para promover essa seletividade em células cancerígenas é o ácido fólico, este pode se ligar facilmente aos receptores de folato que em células normais são expressos em baixa quantidade e em células tumorais em grandes quantidades (SAMADIA, *et al.* 2016)

O ácido fólico é uma molécula essencial na via de síntese do DNA, que é altamente necessária para que as células tumorais se dupliquem e estas possuem receptores de folato superior às células normais, devido esse fato há um direcionamento seletivo com ácido fólico funcionalizado ao fotossensibilizador (SAMADIA, *et al.* 2016).

A escolha do agente fotossensibilizante para a TFD é crucial, pois têm-se que pensar em dois principais fatores: o auto rendimento da molécula em um estado tripleto ao ser irradiado com a luz e o comprimento de onda que esse agente absorve (DE SOUZA, *et al.*, 2016).

No caso para o tratamento de câncer de pele, esse comprimento de onda deve ser de 650-1000 nm que é a faixa do espectro que tem maior penetração no tecido. Assim o fotossensibilizador também deve ter sua absorção dentro dessa faixa (SHARMA, *et al.*, 2011)

As Ftalocianinas pertencem a classe de fotossensibilizadores de segunda geração e são compostos promissores para o seu uso em TFD por apresentar as características necessárias como sua absorção dentro da faixa de comprimento de onda, sua seletividade em tecidos doentes e sua rápida eliminação pelo corpo reduzindo efeitos adversos. (DE SOUZA, *et al.*, 2016).

Ftalocianinas podem conter vários metais em sua cavidade central, como Cobre, Alumínio ou Zinco. As ftalocianinas de zinco têm sido de grande interesse no seu uso como fotossensibilizador para TFD devido as suas propriedades fotofísicas como alta taxa de rendimento em seu estado tripleto, ter uma longa meia-vida em seu estado de tripleto e uma alta capacidade de produzir oxigênios singleto pela transferência de energia. A ftalocianina de zinco apresenta uma banda de absorção intensa é de 670 nm, dentro da faixa de absorção da pele (MEDINA, *et al.*, 2011)

Devido a sua lipofilicidade, a ftalocianina de zinco tem baixa solubilidade em água dificultando sua administração sistêmica. Contudo, sua hidrofobicidade é um dos fatores responsáveis pela sua afinidade aos tumores. E em água, as moléculas de ZnPc se agregam reduzindo assim sua atividade fotofísica. (FADEL, *et al.*, 2010). Para superar esse obstáculo de baixa solubilidade em meios aquosos e sua agregação, as ftalocianinas de zinco são acopladas em

alguma estrutura como polímeros, nanopartículas, óxido de grafeno. Fotossensibilizadores acoplados vem sendo estudados e mostram ter vantagens adicionais como: possibilidade de alcançar sítios de ação específicos, aprimoramento na absorção celular e em tecidos, permeabilidade, acumulação seletiva em células e tecidos doentes e a possibilidade de fazer uma liberação da droga de forma controlada (DE SOUZA, *et al*, 2016).

O óxido de grafeno foi escolhido como o material suporte em que a ZnPc será acoplada devido às suas ótimas características biocompatíveis, sua alta hidrofiliabilidade, sua bioestabilidade e baixa citotoxicidade. (KALBACOVA, *et al*, 2010). Outra característica do óxido de grafeno é sua excelente estabilidade térmica, que pode ser aproveitada para incorporarmos junto à terapia fotodinâmica a terapia fototérmica.

Esta terapia consiste em aquecer um material fototérmico através da incidência de uma onda eletromagnética fazendo com que o material aumente em até 10°C a temperatura local de tecidos específicos, causando danos ao DNA das células e desnaturação das proteínas, resultando na ablação dos tecidos. As células cancerosas são mais sensíveis à mudanças de temperatura do que as células saudáveis, assim fazendo com que o aumento de temperatura seja seletivo para as células tumorais, isso se deve ao fato da má formação das células tumorais dificultarem sua dissipação do calor, ocasionando um maior aquecimento local. (NOROUZI, KHOSHGARD, AKBARZADEH, 2018)

Para combinar o tratamento fototérmico ao tratamento fotodinâmico precisamos encontrar um agente fototérmico em que seja excitado na faixa do espectro de absorção da pele (650-1000 nm) (NOROUZI, KHOSHGARD, AKBARZADEH, 2018). As nanopartículas de ouro em formato de bastões (nanorods) conseguem atingir temperaturas de até 55°C ao serem excitadas em comprimentos de onda perto de 700-800 nm, devido ao processo de ressonância de plasmon de superfície localizada (HU, *et al*, 2013). Metais nobres que apresentam ressonância de plasmon de superfície é amplamente utilizado em plataforma terapêutica, sendo aplicado em biossensores, bioimagem, terapia fototérmica e vetorização de drogas (MARANGONI, CANCELO-BERNARDI, ZUCOLOTTI, 2016). Esse uso se dá ao fato de que essa ressonância é uma oscilação coerente dos elétrons de condução superficial excitados por radiação

eletromagnética, isso faz com que o material detenha interações luz-matéria com várias aplicações. Ao se diminuir o tamanho da partícula para a escala nanométrica, faz com que a luz interaja com partículas menores que o comprimento de luz incidente, isso leva a um efeito plasmônico que oscila localmente ao redor da nanopartícula com uma frequência conhecida como ressonância de plasmon de superfície localizada (LSPR, em inglês), essa LSPR é sensível às mudanças no ambiente dielétrico local e eleva a temperatura dessas partículas (HU, *et al*, 2013).

Outra vantagem de utilizar nanopartículas de ouro é que a utilização de nanopartículas junto a um fotossensibilizador, diminuem a acumulação deste fotossensibilizador nos tecidos, diminuindo sua toxicidade, baixa solubilidade e aumento na seletividade, resultando em sistemas de óxido de grafeno com nanopartículas de ouro (OG-AuNPs) que podem ser usados como combinações de terapias fototermal e fotodinâmica (KONAN, GURNY, ALLÉMANN, 2002).

Tran e colaboradores (2015) realizaram experimentos com óxido de grafeno como carregador de drogas para o tratamento fototérmico e fotodinâmico de câncer de pele, neste trabalho eles verificaram a citotoxicidade do material em testes *in vitro*, mostrando a biocompatibilidade e baixa citotoxicidade do óxido de grafeno.

Assim, este trabalho busca a síntese do óxido de grafeno acoplado com nanopartículas plasmônicas de ouro e Zinco Fenil-Tio-ftalocianina como fotossensibilizador, funcionalizado com ácido fólico para o tratamento teranóstico e fotodinâmico do câncer.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Câncer de pele

O câncer de pele ocorre quando há um crescimento anormal e descontrolado das células que compõe a pele. Essas células se encontram entre as camadas da pele e de acordo com a área em que se localizam são definidos os diferentes tipos de câncer: o câncer de pele não melanomático, que é dividido

em carcinoma basocelulares e os epinocelulares, e o câncer de pele melanomático (Sociedade Brasileira de Demartologia, 2018)

O carcinoma basocelular é o de maior ocorrência dentre os tipos de câncer, este surge nas células basais, na camada mais profunda da epiderme. Possui baixa letalidade e facilmente tratado em estágios iniciais. Esse tipo de câncer é visto mais frequentemente nas regiões como face, orelhas, pescoço, couro cabeludo, ombros e costas, essas sendo áreas mais expostas ao sol, porém esse tipo de câncer não se limita a essas áreas, podendo aparecer em outras regiões da pele menos expostas ao sol (Sociedade Brasileira de Demartologia, 2018).

O carcinoma espinocelular é o segundo mais prevalente. Este se manifesta nas células escamosas, que constituem a maior parte das camadas superiores da pele. Assim como o basocelular, o aparecimento deste carcinoma se dá nas áreas mais expostas ao sol, mas também não limitado a essas regiões e não causado exclusivamente pela exposição ao sol, alguns casos deste carcinoma estão ligados a feridas crônicas e cicatrizes na pele, uso de drogas e exposição a certos agentes químicos ou à radiação (Sociedade Brasileira de Demartologia, 2018).

O Melanoma é o tipo menos frequente de câncer de pele e com o maior índice de mortalidade, porém com boas chances de cura quando detectado em estágios iniciais da doença. Este tipo de câncer tem origem nos melanócitos, células que produzem melanina. O melanoma tem a aparência de uma pinta ou sinal na pele, com tons acastanhados ou enegrecidos, o que dificulta de ser detectados por uma pessoa comum. Em estágios iniciais, o melanoma se desenvolve apenas na camada mais superficial da pele, podendo ser removido cirurgicamente, em estágios mais avançados, a lesão se torna mais profunda e espessa, o que aumenta a chance de se espalhar para outros órgãos, diminuindo a possibilidade de cura (INCA, 2022).

O câncer de pele pode se manifestar como lesões na pele, de tom avermelhado e que sangra facilmente, como pinta ou mancha que pode mudar de cor, textura, tamanho ou como ferida que não cicatriza, apresentando coceira, crostas e sangramento. Quando o câncer de pele melanoma se torna metastático

outros sintomas podem se manifestar como nódulos na pele, inchaço nos gânglios linfáticos, falta de ar, tosse, dores abdominais, dores de cabeça, dentre outros (INCA, 2022).

Pelo câncer de pele poder se assemelhar a pintas ou outras lesões na pele, dificulta-se a identificação deste por uma pessoa leiga, diminuindo as chances de a doença ser detectada nos estágios iniciais. Devido a este fato, os dermatologistas criaram o método ABDCE para detecção de um possível câncer de pele por uma pessoa leiga, podendo auxiliar na identificação dos sinais perigosos (INSTITUTO MELANOMA BRASIL, 2020).

Figura 1. Esquematização autoexame para diagnóstico de câncer de pele.

	benigno	maligno
A ssimetria (formato)	simétrico	assimétrico
B ordas	bordas regulares	bordas irregulares
C or	uma cor só	mais de uma cor
D íâmetro (tamanho)	menor que 6mm *	maior que 6mm
E volução	mudança rápida na aparência (tamanho, forma, cor ou espessura).	

*tamanho da largura de um lápis

Fonte: INSTITUTO MELANOMA BRASIL, 2020

Nessa metodologia, para verificar a assimetria (A) da mancha ou pinta, divide-se ela e verifica se suas metades são ou não simétricas, caso tiver um formato irregular é uma suspeita de câncer. Logo após se verifica as bordas da lesão (B), numa pinta as bordas devem ser lisas e regulares, caso não seja aumenta-se o indicativo de suspeita de câncer. Após, deve-se analisar as cores da pinta ou mancha (C), há variações nas cores de pintas e manchas normais,

podendo ser marro claro e variar até o marrom escuro, porém diferentes cores como vermelho, branco, preto ou tons cinza-azulados, maior a suspeita de que se trata de câncer. Deve-se olhar também o diâmetro (D) dos sinais, estes quando maiores de 0,6 cm são considerados com maior risco de ser câncer e por último a pessoa deve ver a evolução (E) verificar se houve algum crescimento ou modificação, caso tenha havido, pode se tratar de um câncer. (INSTITUTO MELANOMA BRASIL, 2020). Mesmo com todas as respostas indicando um câncer, a pessoa deve ir buscar um médico e somente este poderá afirmar se realmente trata-se de um câncer.

2.2 Terapia fotodinâmica (TFD)

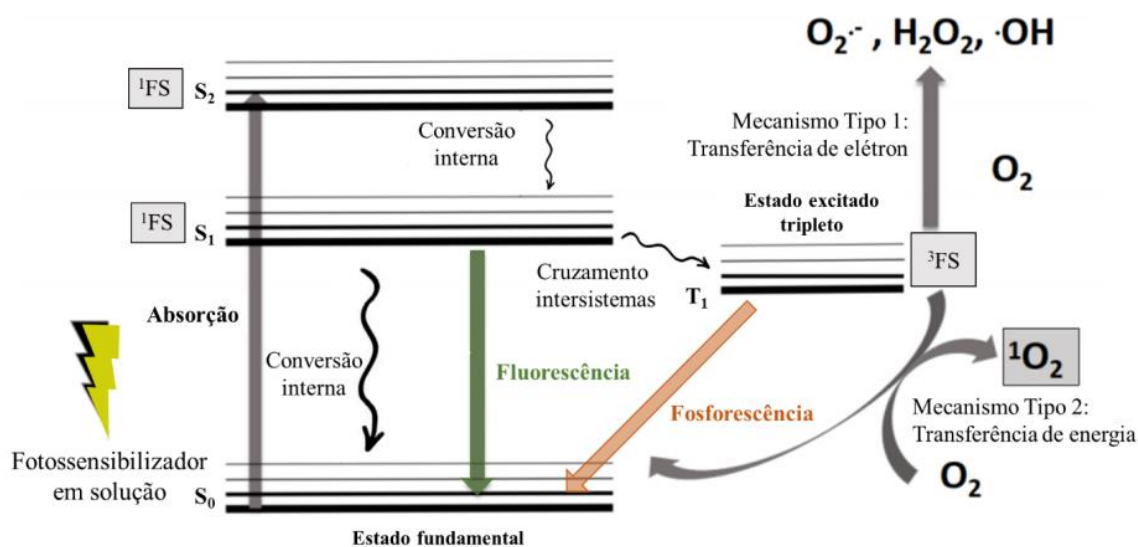
A TFD consiste em processos fotoquímicos e fotofísicos de absorção de luz e transferência de energia. Para isso é necessário que um agente fotossensibilizador passe de seu estado fundamental (S_0) para um estado excitado ao se incidir luz sobre este. Essa absorção de luz pelo fotossensibilizador faz com que seus elétrons passem para um orbital de maior energia, quando isso ocorre diz-se que o fotossensibilizador está em um estado excitado singlet (S_1). Este estado é bastante instável, com duração de nanossegundos, fazendo com que este perca essa energia em forma de emissão de luz (fluorescência) ou produzindo calor por condução interna. Contudo, o estado excitado singlete do fotossensibilizador pode sofrer um processo chamado de cruzamento intersistema, formando um estado excitado mais estável chamado tripleto (T_1) (ABRAHAMSE, HAMBLIN, 2016).

Nesse estado excitado tripleto, a relaxação para o estado fundamental é uma transição eletrônica de spin não permitida, visto que o spin do elétron em T_1 precisa sofrer inversão para retornar a S_0 , caracterizando um processo radiativo mais lento do que a fluorescência. Esse estado é muito mais estável que o estado singlete, tendo uma meia-vida de microssegundos. Isso faz com que o estado tripleto possa transferir sua energia para moléculas O_2 intracelular por meio de dois mecanismos. No primeiro mecanismo ocorre a transferência de elétrons do fotossensibilizador com biomoléculas presente no meio, gerando radicais livres que interagem com o oxigênio molecular do meio formando assim espécies reativas de oxigênio, como radicais ânion superóxidos ($O_2^{\bullet -}$) peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais hidroxil ($HO\bullet$). No segundo mecanismo, ocorre

a transferência de energia diretamente com o oxigênio livre formando o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) uma das espécies mais reativas de oxigênio. Ambos mecanismos ocorrem simultaneamente e são a base da TFD, essas espécies reativas de oxigênio e o oxigênio singlete produzidos podem causar stress oxidativos em biomoléculas visando principalmente as células cancerígenas (ABRAHAMSE, HAMBLIN, 2016).

Assim a TFD é codependente do tipo de fotossensibilizador que será utilizado, oxigênio do meio e da fonte de luz. Para que haja penetração da luz na pele, esta deve estar numa faixa de absorção próxima do infravermelho próximo, que varia de 650-1000 nm. Portanto o fotossensibilizador deve conseguir passar para o estado excitado absorvendo radiação nessa faixa de comprimento de onda (VAN STRATEN *et al.*, 2017).

Figura 2. Diagrama de Jablonski adaptado



Fonte: ABRAHAMSE, HAMBLIN, 2016

2.3 Ftalocianinas

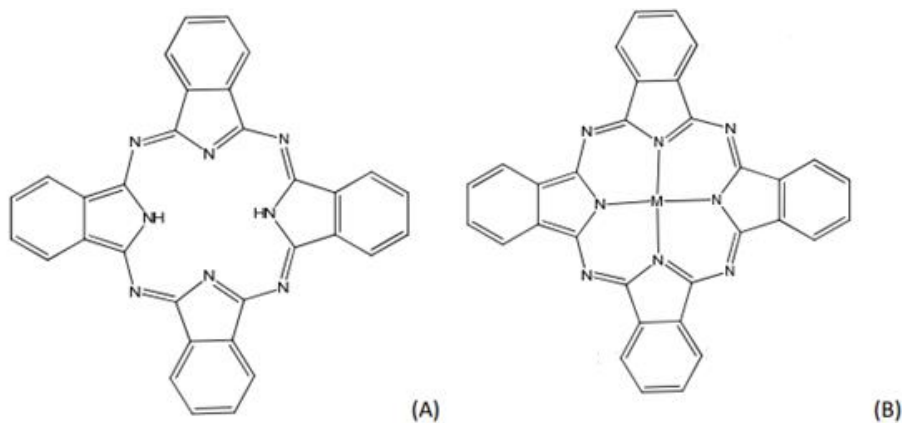
As ftalocianinas são compostos de origem sintética, descobertas em 1907 como um produto obsoleto ao se aquecer 2-cianobenzamida e confundidas como contaminantes em 1928 quando uma empresa escocesa de corantes tentaram preparar ftalimida a partir de uma mistura de anidrido ftálico. Apenas em 1932 o químico inglês Sir Patrick Linstead mostrou que este subproduto se tratava de complexos de ftalocianinas de ferro, depois deste trabalho nos

próximos anos possibilitou a produção em escala industrial desse composto, sendo muito utilizado como corante de tecidos e tintas (MILGROM, SMITH, 1998).

As ftalocianinas têm seu núcleo constituído de quatro unidades de isoindol ligados através de nitrogênios em ponte. Isso faz com que essa classe de moléculas possua características interessantes como estabilidade química e térmica e uma grande eficiência na transferência eletrônica. Isso faz com que diversos estudos sejam desenvolvidos utilizando esses compostos para a criação de novos materiais com diversas aplicabilidades, desde sensores químicos à fotossensibilizadores para a terapia fotodinâmica (SAKAMOTO, OKUMURA, 2009).

Uma das características mais interessantes das ftalocianinas é a possibilidade de complexação com mais de 70 tipos de elementos diferentes, originando diversos compostos de metal-ftalocianinas (KADISH, SMITH, GUILARD, 2017).

Figura 3. Esqueleto Ftalocianina (A) e metal-ftalocianina (B)



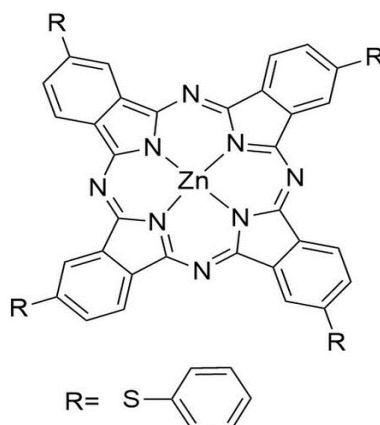
Fonte: Próprio autor

Ftalocianinas são compostos fotossensibilizadores de segunda geração, isto é, apresentam alto rendimento de formação de oxigênio singlete, melhor seletividade para tecidos cancerígenos e maior penetração em tecidos mais profundos, além de ter absorção na faixa de comprimento de onda de 600-800 nm. Outra característica dos FS de segunda geração é ter menos efeitos colaterais devido a uma eliminação mais rápida deste do corpo (DE SOUZA, *et al*, 2016).

A Ftalocianina de Zinco (ZnS₄Pc) vem se tornando objeto de estudo como agente fotossensibilizante em terapia fotodinâmica por apresentar propriedades fotofísicas que encaixam nos fotossensibilizadores de segunda geração, tais como uma alta taxa de rendimento no estado excitado tripleto, assim como uma duração de meia-vida grande nesse estado, sua alta capacidade de produção de oxigênio tripleto e de boa transferência de energia. A banda de absorção da ftalocianina de zinco é em volta de 670 nm, dentro da janela de comprimento de onda dos FS de segunda geração (TOMAZINI et al. 2007).

Apesar de apresentar características perfeitas para seu uso em TFD, a ZnS₄Pc é um composto lipofílico e pouco solúvel em água ou solventes fisiológicos e essa hidrofobicidade impede seu uso direto em administrações sistêmicas. Para contornar essa desvantagem de baixa solubilidade, vêm-se estudando o acoplamento ou encapsulamento da ZnS₄Pc em nanoestruturas, polímeros, óxido de grafeno ou micelas (TOMAZINI et al. 2007).

Figura 4. Estrutura química da fenil-tio-ftalocianina de zinco (ZnS₄Pc) utilizada como ativo fotossensibilizador



Fonte: Próprio autor

2.4 Ácido Fólico

O ácido fólico é uma vitamina hidrossolúvel do complexo B e tem participação em várias funções do organismo. É obtido por meio de uma dieta equilibrada e saudável, esse micronutriente é encontrado em alimentos de origem animal e vegetal, tais como fígado, ovos, verduras ver-escuras, lentilhas, frutas cítricas, feijão e outros grãos integrais. Ao ser ingerido, o ácido fólico é convertido em dihidrofolato e tetraidrofolato no organismo, sendo envolvido em

vários processos bioquímicos. É importante para os processos de divisão e crescimento das células, reparação do DNA, formação de eritrócitos (hemácias ou glóbulos brancos) e na produção de proteínas (COZZOLINO et al., 2015).

Estudos demonstram que o metabolismo do folato para a replicação do DNA é fundamental para as células cancerígenas, que são, portanto, particularmente sensíveis a drogas que inibem o metabolismo de folato. Isso se deve ao fato de que as células cancerígenas desenvolvem muito mais receptores de folatos que em tecidos normais. Assim, pode-se explorar esses receptores de folato super expressos nas células cancerígenas como um potente direcionador de ligantes a células cancerígenas (MARCHETTI et al. 2014).

Há dois tipos de rotas para o transporte de folato para as células. A primeira rota é através dos transportadores de folato reduzido, que possui pouca afinidade por folato, a segunda rota é através dos receptores de folato, que possuem uma alta afinidade por folatos. A primeira rota é mais comum em tecidos saudáveis e é o transporte de folato mais comum. O segundo caminho não é comumente expresso nos tecidos normais, mas muito expresso em células cancerígenas, o que faz com que estas células captem mais suprimentos de folato. Desta forma os receptores de folato podem ser explorados como um potente direcionador de ligantes a células cancerígenas, fazendo com que ao se funcionalizar o óxido de grafeno com o ácido fólico, este tenha maior afinidade as células cancerígenas (BELOQUI, DES RIEUX, PRÉAT, 2016; (SAMADIA, *et al.* 2016).).

2.5 Óxido de grafeno

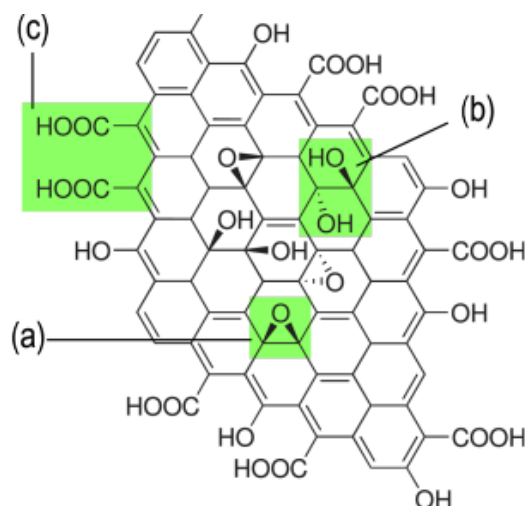
O grafeno foi descoberto em 2004, na Universidade de Manchester, na Inglaterra, pelos pesquisadores Andre Geim e Konstantin Novoselov. Eles obtiveram o material através do processo de exfoliação do grafite, sua descoberta fez com que eles recebessem o Prêmio Nobel de Física em 2010 (NOVOSELOV et al., 2004).

A revolução deste material está em ser um material bidimensional, formado apenas por átomos de carbono, de hibridização sp^2 , que resultam em hexágonos. Este material possui boas propriedades elétricas, térmicas e ópticas, fazendo com que seja aplicado em diversas áreas, como compósito, energia,

eletrônica, catálise, sensores e biossensores. O grafeno pode ser modificado quimicamente, resultando em novos materiais com propriedades químicas e físicas diferentes, mas também relevantes para a aplicabilidade deste em diversas áreas (OLIVEIRA, POLETTTO, SEVERO, 2018).

Um desses materiais é o óxido de grafeno, que possui estrutura semelhante ao grafeno, mas possui grupos funcionais contendo oxigênio, carbonilas, hidroxilas, grupos epóxi. Isso permite que o material possa sofrer reações com esses grupos e confere a ele características hidrofílicas. O óxido de grafeno vem sendo estudado em aplicações biomédicas, pois apresenta baixa citotoxicidade e alta bioestabilidade (FENG et al., 2011).

Figura 5. Estrutura do óxido de grafeno e seus grupos oxigenados (a) epóxido, (b) hidroxilas, (c) ácidos carboxílicos



Fonte: Próprio autor

Outras propriedades físicas também contribuem para este interesse em se usar óxido de grafeno, o material é capaz de absorver luz na região do ultravioleta ao infravermelho próximo e subsequente libera essa luz absorvida em forma de calor, mas essa ampla absorção do espectro e baixa eficiência quântica tem relativamente pouca eficiência na conversão fototermal. A performance fototérmica do óxido de grafeno pode ser melhorada quando coberto com uma nanopartícula plasmônica em sua superfície ou quando essa nanopartícula é ancorada na sua superfície. Esse aumento da performance se dá ao fato de que as nanopartículas plasmônicas agem não somente como fonte

fotothermal mas também incrementam a eficiência de absorção de luz do OG na frequência plasmônica da nanopartícula (PAIVA, 2017).

2.6 Terapia fototérmica (TFT)

A TFT não depende do oxigênio local, os agentes fototérmicos convertem a luz irradiada em calor aumentando a temperatura local dos tecidos em aproximadamente 10°C. Este aquecimento faz com que haja danos ao DNA, assim desnaturando as proteínas e deturpando as membranas celulares resultando na ablação dos tecidos (NOROUZI, KHOSHGARD, AKBARZADEH, 2018).

Células cancerosas apresentam maior sensibilidade ao aumento da temperatura e são destruídas assim de forma seletiva, poupando células saudáveis vizinhas. Isso se deve ao fato de que os tecidos tumorais têm estruturas vasculares diferentes das células saudáveis, isso torna difícil a dissipação do calor por essas estruturas da célula, resultando em um maior aquecimento local (HUANG et al., 2006).

A hipertermia causada pela TFT desencadeia a destruição das células através de dois principais mecanismos: a apoptose e a necrose. A apoptose ocorre quando há geração de espécies reativas de oxigênio ou quando as temperaturas de aquecimento variam de 41 a 47°C. A apoptose faz com que haja encolhimento celular e organelar, condensação de cromatina nuclear, clivagem de DNA e externalização das fosfatidilserinas presentes no lado interno da membrana plasmática. A necrose acontece por choque térmico em temperaturas superiores a 50°C, é uma via de morte celular mais rápida e baseia-se na desnaturação de proteínas e alterações fisiopatológicas graves, como inchaço mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e vazamento de conteúdo intracelular (SPYRATOU, et al., 2017)

Como óxido de grafeno não é capaz de desempenhar um papel como agente fototérmico, mesmo com sua boa capacidade de absorver, liberar e dissipar calor (PAIVA, 2017). necessita-se gerar esses agentes a base de materiais nanoestruturados, como as nanopartículas de ouro, que apresentam maior eficiência de absorção e são livres de ocorrer fotodegradação como outros agentes fototérmicos, como os corantes (ABAKUMOVA et al., 1999).

2.7 Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR)

A Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada (LSPR) é um fenômeno óptico gerado pela luz quando esta interage com nanopartículas condutoras. O campo elétrico da luz interage com os elétrons da banda de condução da partícula resultando em uma oscilação coerente e localizada dos chamados *plasmons* de superfície. Esse fenômeno é comum às nanopartículas metálicas, por estes serem bons condutores elétricos (PETRYAYEVA, KRULL, 2011).

Os átomos isolados possuem níveis de energia bem definidos, à medida que o número de átomos aumenta, formando uma estrutura cristalina sólida, os níveis de energia mais altos, de cada um dos átomos agrupados, tornam-se contínuos, dando origem as bandas de energia. Os elétrons da camada de valência deixam então de pertencer aos átomos individuais e passam a ocupar essas bandas de energia formadas, formando a banda de valência, que é preenchida com os elétrons de níveis energéticos mais altos, e a banda de condução, energeticamente mais alta e podendo ser parcialmente ocupada por elétrons ou desocupada. Nos metais, os elétrons da banda de valência facilmente ocupam os níveis energéticos mais altos, passando a ocupar a banda de condução. Dessa forma, os elétrons de condução são capazes de percorrer livremente a extensão metálica da nanopartícula e produzir efeitos ópticos peculiares sob condições específicas (WALKER, J. et al., 2009).

Quando uma onda incide sobre uma partícula de dimensões reduzidas, onde o raio dessa nanopartícula seja menor que o comprimento de onda da luz incidente, o campo elétrico oscilante da onda eletromagnética provoca uma oscilação ressonante dos elétrons de condução do metal. Isso cria uma polarização da densidade de carga e induz o surgimento de forças restauradoras, que farão com que os elétrons oscilem frente ao núcleo. Esse fenômeno é conhecido como Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada e é bem característico em nanopartículas superiores a 10 nm (partículas inferiores a esse tamanho são fortemente influenciadas pelo regime quântico assumidos pelos elétrons de condução) (WILLETS, VAN DUYNE, 2007).

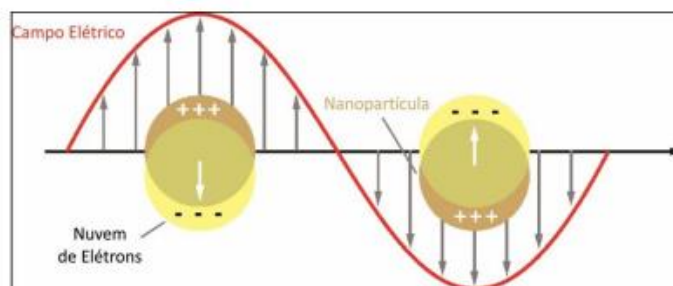
A excitação dos plasmon oscilantes em nanopartículas metálicas induz uma forte absorção e espalhamento da luz incidente que depende da

composição do material, sua dimensão e morfologia, como também da constante dielétrica do meio. A energia absorvida pelas nanopartículas plasmônicas pode ser liberada pela reemissão dos fótons (luminescência) ou pela geração de fônons (calor). A taxa de conversão em luminescência das nanopartículas plasmônicas está abaixo de 1%, podendo assumir-se que toda a energia absorvida é transformada em calor (CHEN, et al., 2021).

Quando se incide luz em nanoestruturas plasmônicas, essas absorvem a luz em um certo comprimento de onda, o que induz a LSPR e causa a oscilação de seus elétrons. Os elétrons então saltam para um estado de energia excitado, e segue-se para a dispersão elétron-elétron, levando assim a redistribuição de *hot electrons* (elétrons que ganharam níveis muito altos de energia cinética). Esse calor então é transferido pela estrutura do metal através do acoplamento elétron-fônnon e depois dispersado pela estrutura para o meio pelo acoplamento fônnon-fônnon em nanossegundos. Diferente dos métodos tradicionais de aquecimento, este método permite que o aquecimento seja localizado em espaços submicrométricos, o que permite em aplicações interessantes, como por exemplo a terapia fotodinâmica (DE ABERASTURI, et al., 2015; BRONGERSMA, NORDLANDER, 2015).

Nanopartículas de ouro e prata são os principais metais utilizados para se explorar os efeitos plasmônicos devido a capacidade destes de produzir esses efeitos de forma mais intensa que os outros metais. O ouro, por sua vez, apresenta maior estabilidade, maior resistência à oxidação e maior biocompatibilidade do que a prata e em combinação com suas grandes seções de absorção o torna um candidato promissor para a TFT ((RIOUX, MEUNIER, 2015)

Figura 6. Esquematização LSPR



Fonte: DE ABERASTURI, et al., 2015

O comprimento de onda de absorção máxima correlaciona-se com o tamanho e forma da partícula. Nanopartículas de ouro de dimensões menores absorvem em comprimentos de ondas menores, em formato de bastonetes, em virtude de sua anisotropia, absorvem em dois comprimentos de onda, uma por volta de 700 nm e outra de menor intensidade em torno de 500 nm. Elas produzem dois modos de ressonância, uma longitudinal e outra transversal (MEHTALA, et al., 2014). A absorção na região do infravermelho permite a aplicação das nanopartículas de ouro, em conchas e estrelas, na terapia fototérmica guiada por imagem, a fim de promover a destruição térmica de células tumorais sem afetar tecidos adjacentes (CHIRICO, G., et al., 2015).

3 Objetivos

Objetivos gerais

Sintetizar e caracterizar o óxido de grafeno acoplado com nanopartículas plasmônicas de ouro e fotossensibilizador Fenil-Tio-ftalocianina de Zinco, funcionalizado com ácido fólico para o tratamento fototérmico e fotodinâmico do câncer de pele não-melanomático.

Objetivos específicos

- Sintetizar o óxido de grafeno e nanopartículas de ouro
- Funcionalização com ácido fólico e fenil-tio-ftalocianina de zinco
- Caracterização do material obtido através de espectroscopias, microscopia eletrônica de varredura e comportamento térmico do material em diferentes etapas da síntese.
- Viabilidade celular do composto sintetizado
- Comparar viabilidade celular do composto obtido em cada etapa da síntese a fim de verificar se o composto final é o menos tóxico

4 Metodologia

4.1 Síntese do óxido de grafeno (OG):

A síntese do óxido de grafeno foi feita através do processo de Hammer modificado (HUMMERS, OFFEMAN, 1958, GOLLAVELLI, LING, 2012), o qual substitui a utilização de NaNO_3 pela oxidação do grafite em flocos, para que se evite a formação do gás NO_2 . Como fonte de carbono foi usado o grafite em flocos (100 mesh) Aldrich, o qual foi adicionado 1,0 g em um balão de três bocas de 250 ml junto a 23,0 mL de ácido sulfúrico concentrado por 24 horas mantendo constante agitação.

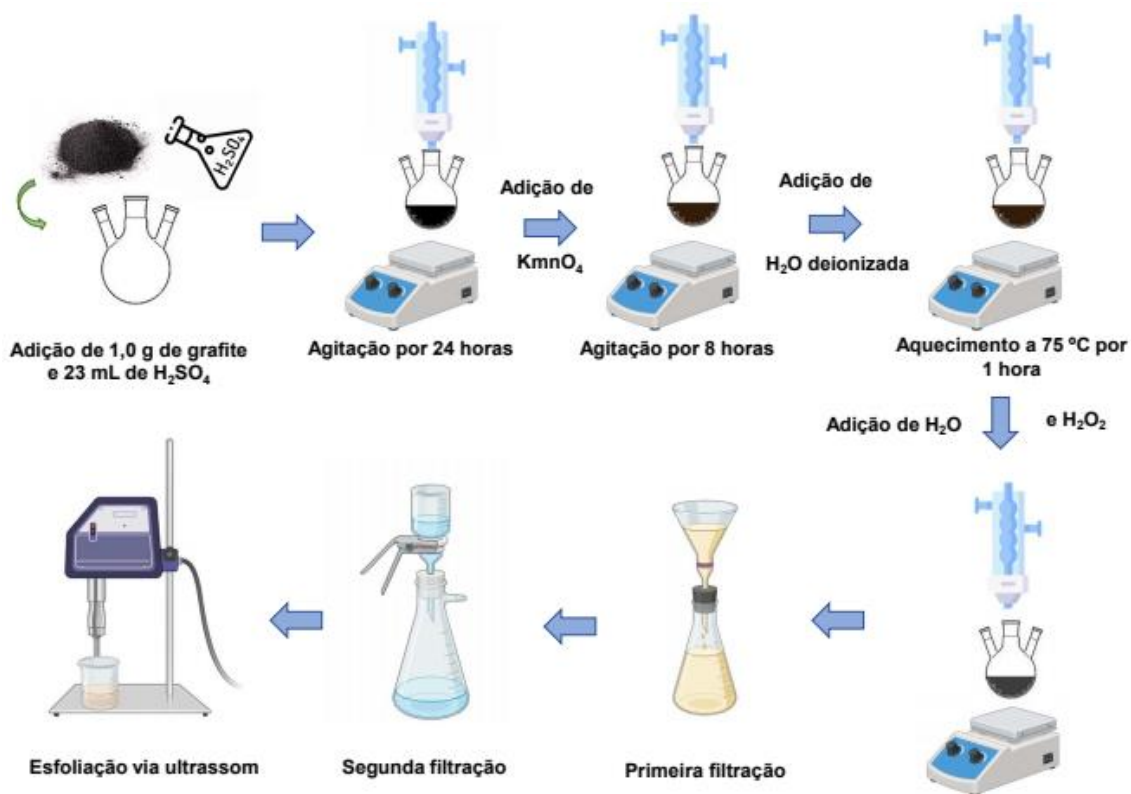
A mistura no balão foi então levada a um banho de gelo até atingir temperatura de aproximadamente 8 °C e então é adicionado 3,0 g de KMnO_4 como agente oxidante. A mistura foi então agitada por 8 horas e após esse período foi aquecida a 40 °C por 30 minutos em banho de óleo.

Finalizado esse processo, adicionou-se 50,0 mL de água deionizada e eleva-se a temperatura a 75 °C por 1 hora, ainda sob agitação constante. Ao se resfriar essa solução a temperatura ambiente, adicionou-se mais 150,0 mL de água destilada e 5,0 mL de H_2O_2 30% (v/v) para reagir com KMnO_4 que estiverem em excesso.

No passo seguinte é feita uma filtração a vácuo da solução obtida. O sobrenadante retirado é passado por uma membrana de fluoreto de polivinilideno, poro 0,22 μm . A membrana é então coletada e seca, a amostra retirada é transferida a um béquer com 50,0 mL de H_2O .

Para separar as folhas de grafeno é feita uma esfoliação utilizando uma ponteira ultrassônica por 30 minutos, utilizando-se uma amplitude de 30% em modo pulsado (2 segundos ligado e 2 segundos desligado). Então obtém-se o óxido de grafeno em solução, o qual é filtrado em membrana de fluoreto de polivinilideno e seco em temperatura ambiente.

Figura 7. Esquemática da síntese de óxido de grafeno.



Fonte: Próprio autor

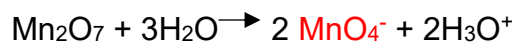
O processo de oxidação do grafite pode ser separado em duas principais etapas, na primeira etapa o grafite é oxidado pela adição do ácido sulfúrico e o permanganato de potássio, sendo essa a etapa principal, e segunda etapa pela a adição de água em temperaturas acima de 70° C (MARCANO, 2010).

Na primeira etapa de oxidação, o KMnO_4 em meio ácido contendo H_2SO_4 concentrado é transformado em Mn_2O_7 e no íon trióxido de manganês (MnO_3^+). Estas duas espécies são as responsáveis por todo o processo de oxidação do grafite no método Hummers (DIMIEV, 2020). O processo de formação dessas espécies é descrito como:



Eq. 1

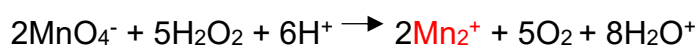
Após a adição de água, os oxidantes da primeira etapa são removidos e o íon MnO_4^- , o principal agente oxidante da segunda etapa de oxidação, é formado em meio aquoso, conforme as reações abaixo:



Eq. 2



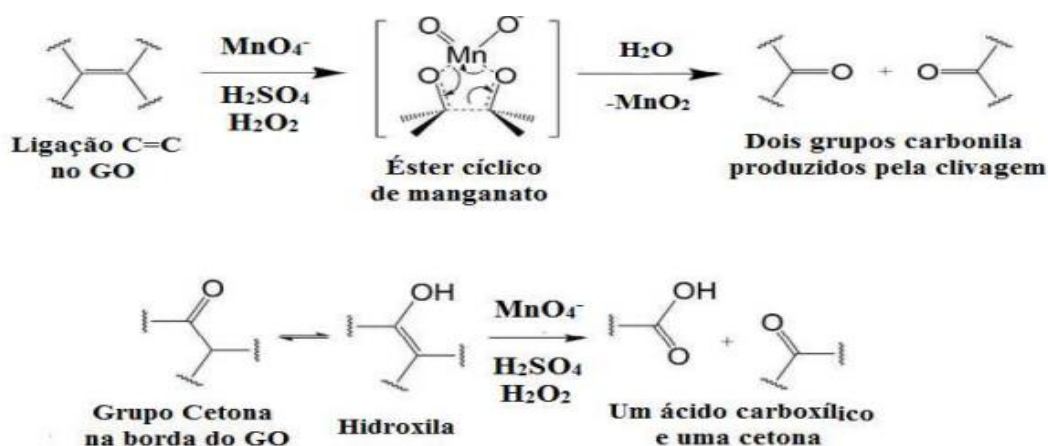
A adição de H_2O_2 no meio que contém os oxidantes da primeira etapa eliminam a possibilidade de contato entre as folhas do óxido de grafite com os íons MnO_4^- , pois reduzem diretamente as espécies Mn_2O_7 e MnO_3^+ em íons de manganês com menores estados de oxidação (como os íons Mn^{2+} , por exemplo) (KANG, *et al.* 2016). Isso interrompe o processo de oxidação via íon permanganato, como mostrado na reação:



Eq. 3

Durante a segunda etapa de oxidação ocorre um acoplamento do íon MnO_4^- com os carbonos sp^2 presentes na rede do óxido de grafite, formando um éster cíclico de manganato. Conseqüentemente, acontece a quebra da ligação $\text{C}=\text{C}$, seguida da oxidação dos átomos envolvidos nesta ligação. Os produtos formados na reação dependem do tipo de carbono envolvidos na dupla ligação, os carbonos secundários dão origem a grupos carboxila, enquanto os carbonos terciários formam grupos carbonila ou cetonas (KANG, *et al.* 2016).

Figura 8. Possíveis mecanismos envolvidos durante a segunda etapa de oxidação para (superior) quebra oxidativa das ligações $\text{C}=\text{C}$ via formação de éster cíclico de manganato, resultando em duas carbonilas e formação de MnO_2 ; (inferior) quebra oxidativa das ligações $\text{C}=\text{C}$ em carbonos secundários, produzindo um grupo carboxila e outro carbonila. Kang *et al.* 2016.



Fonte: Adaptado de Kang *et al.* 2016.

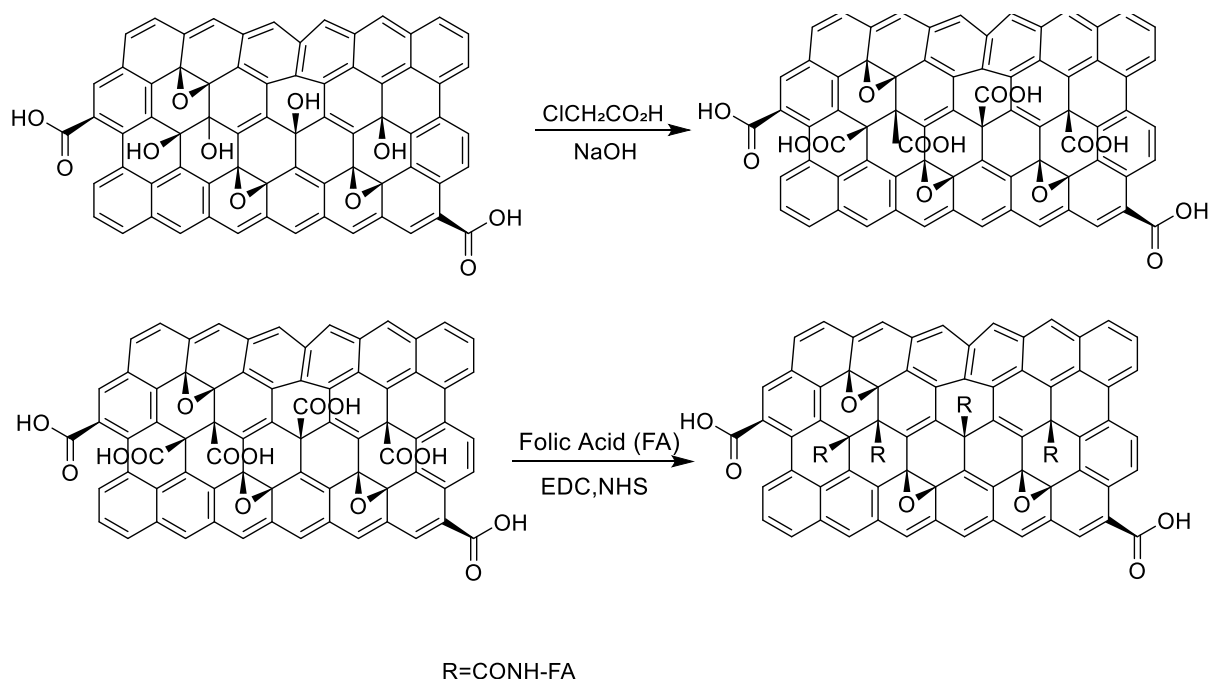
Quando o grafite passa pelo processo de oxidação promove-se a adição de grupos carboxil, epóxi e hidroxil na estrutura do grafite. Estes grupos funcionais tornam o óxido de grafite altamente hidrofílico e diminuem a energia

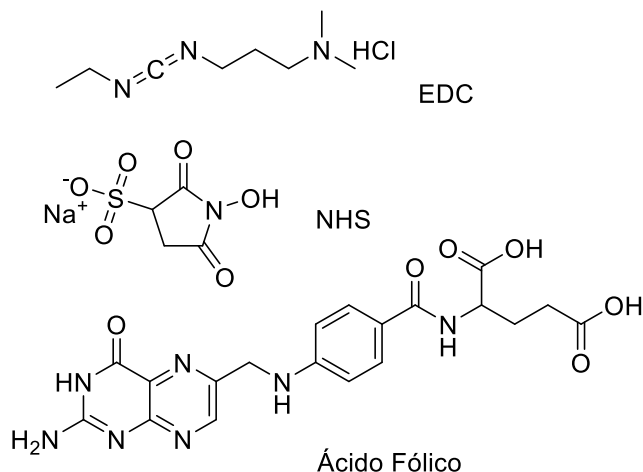
de interação entre as camadas do grafeno, resultando no enfraquecimento das forças de van der Waals entre as camadas. Podendo assim facilmente ser esfoliado, formando suspensões estáveis de óxido de grafeno (LERF, 2016).

4.2 Síntese OG-ácido fólico (OG-AF):

A síntese segue os métodos descritos por Qin, X.C. e colaboradores (QIN, *et al.*, 2013). Para a carboxilação do OG, foi adicionado em uma suspensão de OG (10 ml, 2 mg/ml) 1,2 g de NaOH e 1,0 g de ácido monocloroacético, seguido por um banho de sonificação durante 3 horas, convertendo os grupos OH em COOH. Após a conversão, tem-se OG-COOH, os quais irão ser convertidos em OG-AF. Para isso, é necessário acrescentar 2 mg de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e NHS (N-Hidroxisuccinimida) junto a uma suspensão GO-COOH (10 ml, 1mg/ml) e sonificado durante 2 horas. Após passado o tempo, foi adicionado a essa suspensão, 2ml de uma solução 0,5% de ácido fólico (cujo pH foi elevado para 8.0 usando bicarbonato de sódio) e agitada durante 12 horas. O precipitado foi centrifugado e lavado por três vezes para retirar o excesso de ácido fólico.

Figura 9. Esquemática reação de adição de ácido fólico



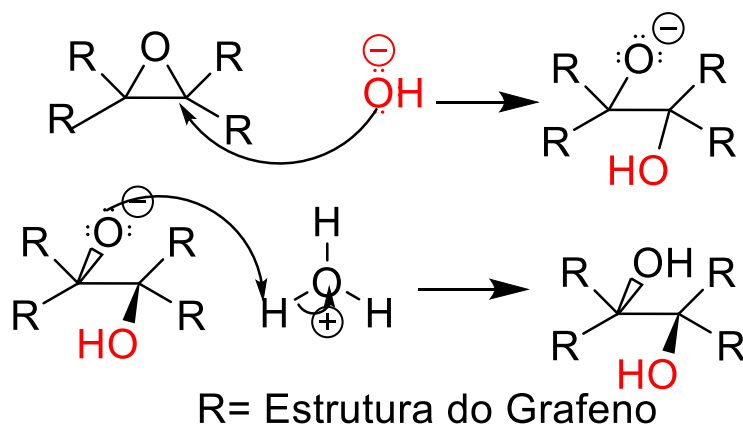


Fonte: Próprio Autor

4.2.1 Mecanismo de funcionalização do OG com ácido fólico:

Para poder funcionalizar o OG com o ácido fólico foi necessário a conversão de alguns grupos oxigenados em ácidos carboxílicos, para assim poder reagir em uma reação de acoplamento EDC/NHS com o ácido fólico. Assim temos duas etapas, a primeira a conversão dos grupos epóxidos em grupos hidroxilas e depois a conversão dos grupos hidroxilas em carboxilas (KLEIN,2021).

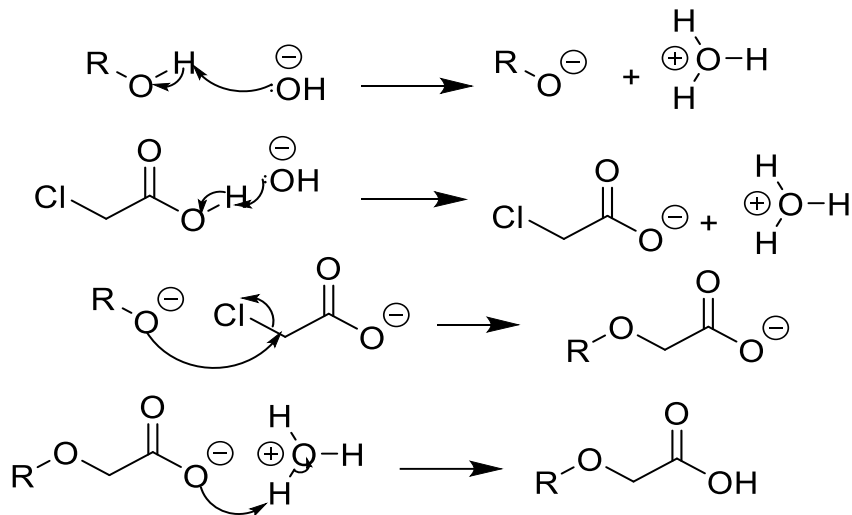
Figura 10. Mecanismo de reação da abertura do anel epóxi.



Fonte: Próprio Autor

Assim, com a abertura do anel epóxi convertendo-os em grupos hidroxilas, pode-se então transformá-los em grupos carboxilas através da reação (KLEIN,2021):

Figura 11. Mecanismo de reação da transformação dos grupos OH em ácidos carboxílicos.

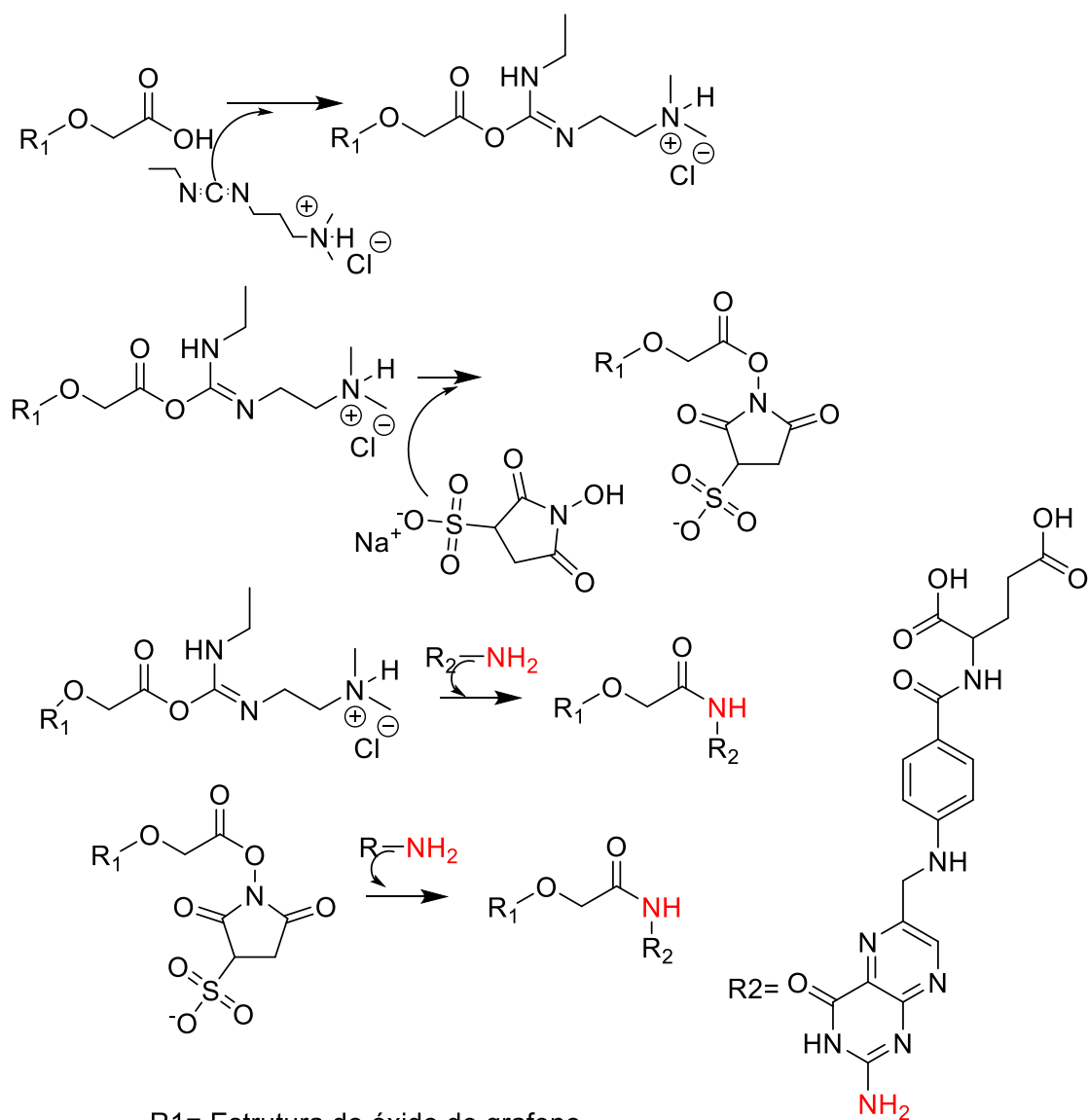


R = Estrutura do Grafeno

Fonte: Próprio Autor

Com os grupos carboxílicos formados, caminha-se pra última etapa dessa reação, a adição do ácido fólico via uma amidação usando acoplamento EDC/NHS que segue o seguinte mecanismo (HERMANSON, 2013):

Figura 12. Mecanismo de amidação via EDC/NHS.



4.3 Síntese Nanopartículas de ouro (AuNPs):

A síntese de nanopartículas de ouro foi obtida seguindo os métodos descritos por LI, Li; LU, Hongmei e DENG, Liu (2013). Esta síntese consiste no processo chamado de seed-growth, no qual é feita duas soluções de ouro, um chamado de semente que servirá como ponto de nucleação para o crescimento das nanopartículas na outra solução, por isso o nome seed-growth (crescimento da semente em tradução livre).

A solução semente foi preparada utilizando-se 5 ml de uma solução de Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) 0,2 mol L⁻¹, junto com uma solução de 5

ml de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Ao deixar as duas soluções em agitação por dois minutos, foi adicionado uma solução recém preparada de $0,6 \text{ ml}$ de borohidreto de sódio (NaBH_4) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, que foi resfriada em banho de gelo até que o recipiente estivesse bem gelado, e deixado sob agitação vigorosa. Nesta etapa a solução mudará de cor de um amarelo vibrante para um marrom-amarelado, indicando a formação das sementes. A solução resultante é então guardada em local escuro por pelo menos três horas, para garantir a total formação das sementes.

Para a solução de crescimento (growth) foi colocado 50 ml de CTAB $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ junto a uma solução de 50 ml de HAuCl_4 1 mmol L^{-1} com $1,5 \text{ ml}$ de AgNO_3 4 mmol L^{-1} adicionados previamente. Ao agitar essas soluções por dois minutos foi adicionado aos poucos 1 ml de ácido ascórbico $0,08 \text{ mol L}^{-1}$, tornando a solução que era dourada em incolor.

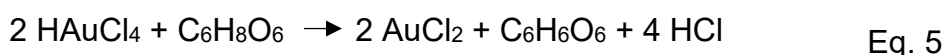
Para a formação dos nanobastões foi então adicionado $120 \mu\text{L}$ da solução semente na solução de crescimento e posto em repouso durante $10\text{-}20$ minutos, a qual a solução passa de incolor para uma cor azul, indicando a formação das nanopartículas e podendo indicar a formação dessas em formato de bastões, pois neste formato as nanopartículas de ouro produzem uma solução de cor azul.

4.3.1 Mecanismo de formação das nanopartículas de ouro

Para a formação das sementes é necessário que o ouro do ácido cloroáurico seja encapsulado pelas moléculas de CTAB e após a formação das miscelas, seja reduzido de Au (III) a Au^0 .



Na solução de crescimento (growth) é necessária uma redução incompleta do HAuCl_4 utilizando um agente redutor mais fraco, o ácido ascórbico, produzindo AuCl_2^- (KHAN, 2013).



Subsequente temos a junção da solução semente com a de crescimento para que haja o alongamento assimétrico das nanoesferas de ouro (sementes) em uma única direção que é influenciado pela interação com o surfactante CTAB e íons prata. Inicialmente, os átomos de ouro são organizados em uma estrutura

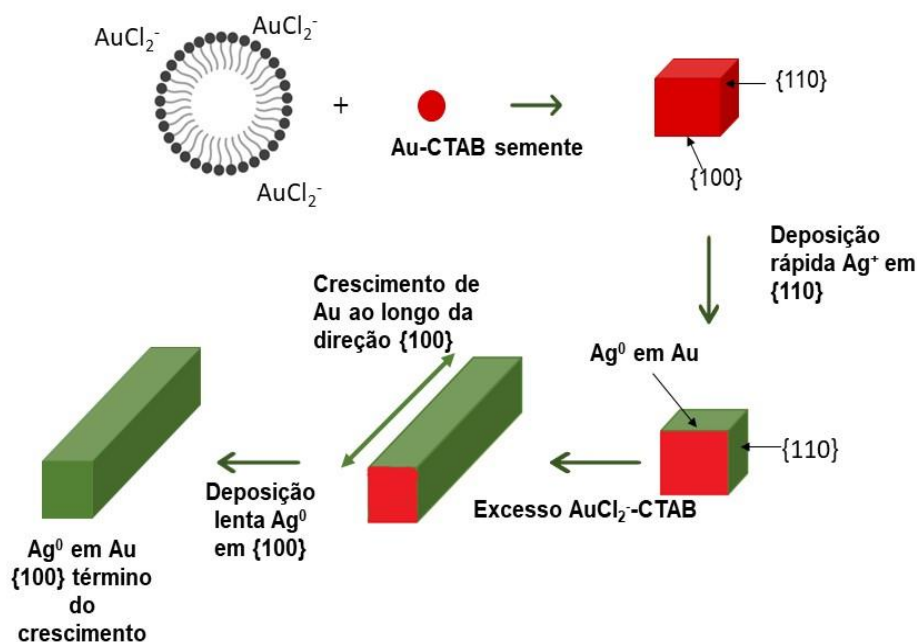
cúbica de face centrada, e a deposição subsequente de átomos de ouro da solução de crescimento quebra a simetria dessa estrutura, dando início ao crescimento na direção da deposição inicial (ORENDORFF; MURPHY, 2006).

A diferença estrutural resultante leva a variações conformacionais e a faces com diferentes energias de superfície. Essa disparidade é crucial para a interação preferencial do surfactante e os íons prata com regiões específicas para o crescimento do nanobastão. A face onde o crescimento teve início possui um espaçamento entre os átomos mais propensos à interação com o CTAB, enquanto as outras faces, com maior energia de superfície, são estabilizadas pela interação com o surfactante (VIGDERMAN, *et al.*,2012).

Na solução de crescimento os átomos de ouro se encontram na forma de AuCl_2^- ligados a micelas de CTAB. A interação entre os campos elétricos do AuCl_2^- e da semente de crescimento favorece colisões mais frequentes na extremidade onde o crescimento foi iniciado, direcionando o alongamento em forma de bastão (VIGDERMAN, *et al.*,2012).

Além do papel do CTAB, os íons prata exercem duas atividades no controle da síntese. Primeiramente, reduzem a densidade de carga dos íons brometos, diminuindo a repulsão entre as moléculas de CTAB ligadas às faces não-crescente da semente. O outro papel a ser desempenhado é limitar o tamanho dos nanobastões ao reduzir os íons Ag^+ a Ag^0 , seguido pela deposição lenta nas faces em que houve alongamento, limitando o comprimento dos nanobastões (ORENDORFF; MURPHY, 2006). brometos, diminuindo a repulsão entre as moléculas de CTAB ligadas às faces não-crescente da semente. O outro papel a ser desempenhado é limitar o tamanho dos nanobastões ao reduzir os íons Ag^+ a Ag^0 , seguido pela deposição lenta nas faces em que houve alongamento, limitando o comprimento dos nanobastões (ORENDORFF; MURPHY, 2006).

Figura 13. Mecanismo de crescimento dos nanobastões de ouro na presença de Ag^+ .



Fonte: Adaptado de ORENDORFF e MURPHY 2006

4.4 Síntese OG-AF-AuNPs:

Para incorporar as nanopartículas de ouro no óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico foi utilizado uma suspensão de 10 ml (1mg/ml) do OG-AF e adicionou-se 5 ml da solução de AuNPs e deixado em agitação por 12 horas.

4.5 Síntese OG-AF-AuNPs-ZnS4Pc:

A adição da Ftalocianina de Zinco se deu através dos métodos descritos por SONG, Weina, *et al.* (2014) e WONG, Aijian, *et al* (2019). Foi preparada uma dispersão OG-AF-AuNPs 1mg/ml em 40 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) em ultrassom durante 30 minutos. Após adicionou-se 40 mg de Diciclohexilcarbodiimida (DCC) dissolvida em 5 ml de DMSO e colocado sob agitação durante uma hora. Ao decorrer deste tempo foi adicionado uma solução de 60 mg de ZnS4Pc dissolvido em 10 ml de DMSO, o balão colocado sob agitação e protegido com papel alumínio para não expor o fotossensibilizador a luz durante um dia, após aqueceu-se a solução a 70°C constante durante mais

três dias. Ao final a solução foi filtrada e o precipitado foi lavado com DMSO e álcool para retirar qualquer ZnS4Pc não reagido. A amostra é então secada a 80°C durante 6 horas e é obtido uma amostra preta azulada/esverdeada.

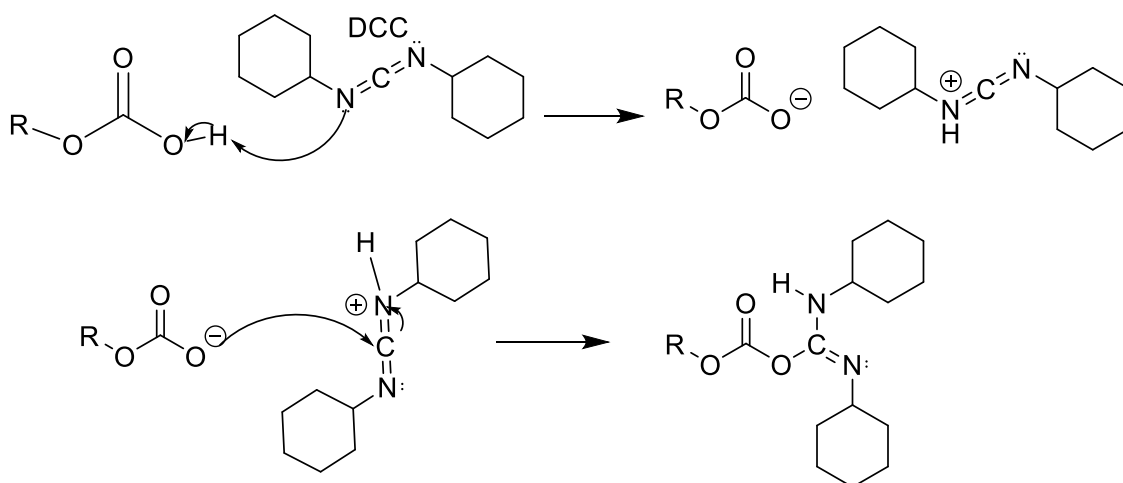
4.5.1 Mecanismo de funcionalização do OG-AF com fenil-tio-ftalocianina de Zinco:

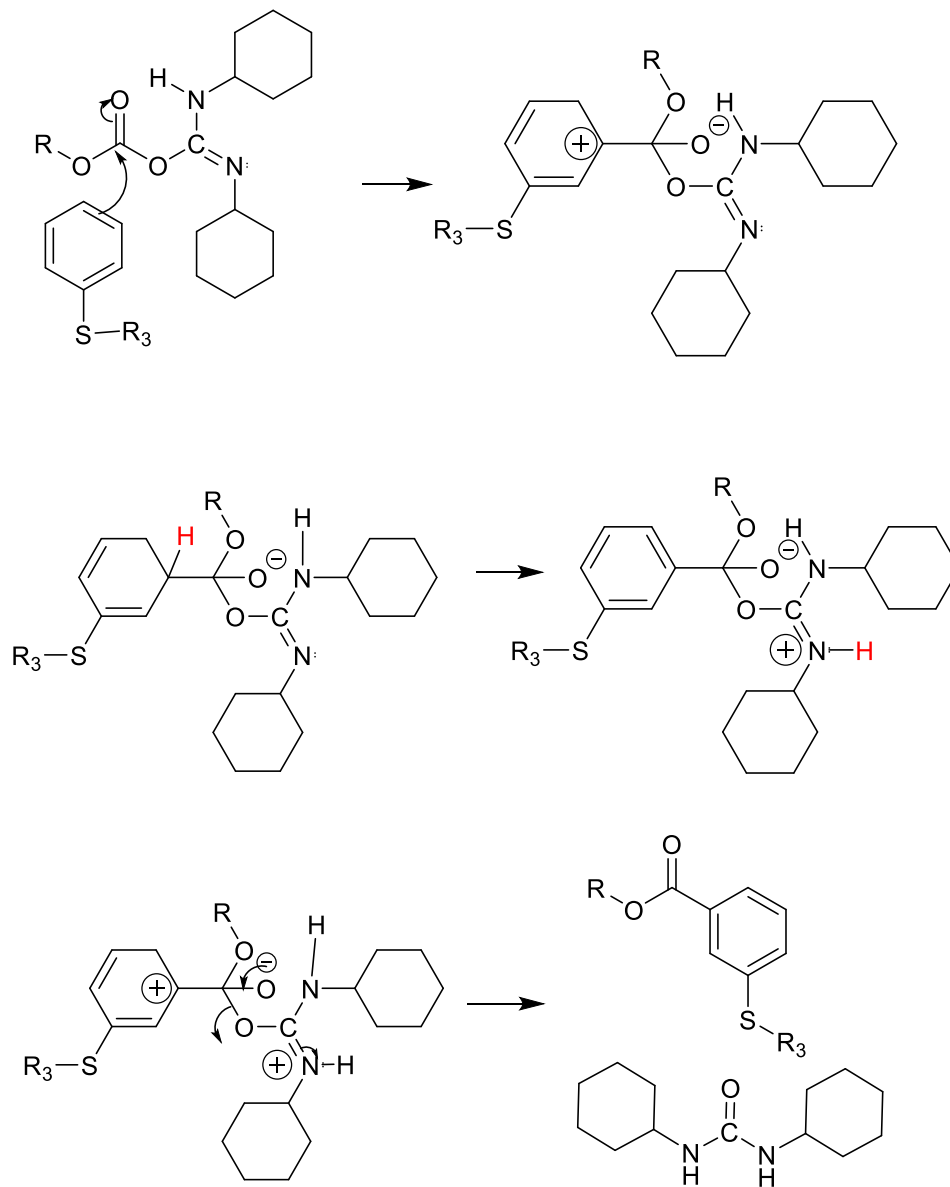
A reação para a funcionalização com a fenil-tio-ftalocianina de zinco segue o mecanismo de acoplamento com DCC. Seguindo o seguinte mecanismo (HERMANSON, 2013):

Primeiramente, como a hidroxila não é um bom grupo de saída, o DCC irá desprotonar a hidroxila do ácido carboxílico formando um carboxilato e este fará um ataque nucleofílico ligando o DCC na estrutura (Figura 17).

Logo após o carbono da carbonila estará suscetível ao ataque nucleofílico do anel e após uma transferência de próton na estrutura, temos a diciclohexourea como um bom grupo de saída, obtendo a estrutura desejada (Figura 17) (SONG, *et al*, 2014).

Figura 14. Mecanismo de funcionalização da Ftalocianina via acoplamento com DCC.





R₃= Ftalocinanina de zinco

Fonte: Próprio Autor

4.6 Ensaio de viabilidade celular HDFn – Resazurina

O ensaio de viabilidade celular em fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) é uma técnica crucial para avaliar a capacidade de sobrevivência e proliferação dessas células em condições específicas.

Neste ensaio as células são preparadas cultivando os HDFn em condições apropriadas, como meio de cultura celular específico e temperatura controlada. As células então são submetidas a diferentes condições experimentais, que podem incluir exposição a compostos químicos, agentes terapêuticos, ou outros fatores de interesse (LEMOS,2018).

São adicionados corantes específicos, como azul de tripano ou azul de trypan, que são absorvidos por células não viáveis, corando-as de forma distinta das células viáveis. Utilizando-se técnicas de microscopia ou citometria de fluxo, é feita a contagem de células viáveis (que excluíram o corante) e células não viáveis (coradas pelo corante). Com base nessa contagem, calcula-se a porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células, fornecendo uma medida quantitativa da viabilidade celular (LEMOS,2018).

Os resultados são submetidos a análises estatísticas para determinar a significância das diferenças entre grupos experimentais. A viabilidade celular nos HDFn fornece informações sobre a toxicidade, eficácia terapêutica ou influência de diferentes condições experimentais nas células. Resultados mais altos indicam boa viabilidade, enquanto uma diminuição pode sugerir efeitos adversos (JACOB,2011).

Esse tipo de ensaio é amplamente utilizado em pesquisas biomédicas, farmacológicas e toxicológicas para avaliar o impacto de substâncias ou condições específicas nas células HDFn, contribuindo para o desenvolvimento seguro de terapias e compreensão de mecanismos celulares (JACOB,2011).

Preparação das Células NIH-3T3

As células NIH-3T3 foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (penicilina/estreptomicina). As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular a 37°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após o descongelamento das células do estoque criopreservado, as mesmas foram subcultivadas duas a três vezes antes de serem utilizadas nos experimentos, seguindo as diretrizes da norma ISO 10993-5:2009.

Quando as células atingiram 80-90% de confluência, foram tratadas com tripsina-EDTA 0,25% para a dissociação celular. Em seguida, as células foram contadas utilizando um hemocítmetro, e uma alíquota correspondente a 1x10⁴ células foi semeada em cada poço de placas de 96 poços, contendo 100 µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas por 24 horas para adesão ao fundo dos poços.

Grupos Experimentais

Foram estabelecidos cinco grupos experimentais, cada um com diferentes tratamentos, conforme descrito a seguir:

- **Controle Negativo (C-):** Células NIH-3T3 tratadas apenas com DMEM 5% SFB (36 poços).
- **Controle Positivo (C+):** Células NIH-3T3 tratadas com óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (OG-AF) a uma concentração de 5,0 µg/mL em DMEM 5% SFB (36 poços).
- **G1:** Células tratadas com óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e dopado com nanopartículas de ouro (OG-AF-AuNp) nas concentrações de 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL (72 poços).
- **G2:** Células tratadas com óxido de grafeno funcionalizado com ftalocianina (OG-ZnS4Pc) nas concentrações de 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL (72 poços).
- **G3:** Células tratadas com óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e ftalocianina dopado com nanopartículas de ouro (OG-AF-ZnS4Pc-AuNp) nas concentrações de 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL (72 poços).

Cada grupo experimental foi distribuído em triplicata, utilizando um total de 288 poços.

Tratamento das Células

Após 24 horas do plaqueamento inicial, o meio de cultura foi removido, e 100 µL das diferentes soluções de tratamento, preparadas em DMEM contendo 5% de SFB, foram adicionadas aos respectivos poços. O volume total necessário de cada grupo para o preparo das diluições foi de 1 mL.

As concentrações utilizadas para os tratamentos foram as seguintes:

- **C-:** DMEM 5% SFB (Controle Negativo).
- **C+:** 5,0 µg/mL de OG-AF em DMEM 5% SFB (Controle Positivo).

- **G1:** OG-AF-AuNp nas concentrações de 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL.
- **G2:** OG-ZnS4Pc nas concentrações de 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL.
- **G3:** OG-AF-ZnS4Pc-AuNp nas concentrações de 1,0 µg/mL, 2,5 µg/mL e 5,0 µg/mL.

As células foram incubadas com as formulações por um período de 24 horas a 37°C, com 5% de CO₂.

Avaliação da Viabilidade Celular com Resazurina

Após o período de incubação, o meio de cultura foi cuidadosamente removido de cada poço, e as células foram lavadas com 150 µL de PBS. Em seguida, 100 µL de solução de resazurina a 10% em DMEM (concentração final de 25 µg/mL) foi adicionada a cada poço. As placas foram incubadas por mais 4 horas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂.

Após a incubação, a viabilidade celular foi avaliada pela medição da fluorescência gerada, utilizando um leitor de microplacas com comprimento de onda de excitação de 560 nm e de emissão de 590 nm. A intensidade de fluorescência foi registrada e comparada entre os grupos experimentais para determinar o efeito citotóxico das diferentes formulações testadas.

Análise dos Dados

Os dados de fluorescência obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o software apropriado. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação ao controle negativo. A análise de variância (ANOVA) seguida por testes post-hoc foi realizada para determinar a significância das diferenças entre os grupos experimentais.

4.7 Caracterizações do composto proposto:

A cada etapa de síntese as amostras OG, AuNPs, OG-AF e OG-AF-AuNps e OG-AF-AuNps-ZnS4Pc, foram caracterizadas de modo a verificar suas composições, morfologia e estrutura, submetendo-as às técnicas de caracterizações descritas abaixo:

4.7.1 Espectrometria UV-vis:

A espectroscopia UV-vis compreende a análise da absorção da luz feita por uma amostra. Diferentes comprimentos de ondas eletromagnéticas na região do ultravioleta e visível (190nm - 800nm) são incididas na amostra e a quantidade de luz absorvida por esta é calculada pelo espectrofotômetro. Dividindo a intensidade da luz antes de passar pela amostra (I_0) e a intensidade da luz depois de atravessá-la (I), tem-se então a transmitância da amostra dada por (I/I_0). A partir dessa informação a absorbância é determinada para esse certo comprimento de onda ou como uma função de uma faixa de comprimentos de onda (HARRIS, D. C., 2005).

A espectrometria UV-vis foi utilizada para monitorar a formação das nanopartículas de ouro, assim como seu formato em bastões e para determinar a região de absorção das nanopartículas e do fotossensibilizador no material obtido. Os espectros de UV-Vis foram adquiridos em um Espectrofotômetro de feixe duplo UV/VIS/NIR, Perkin Elmer Lambda 1050, operando na faixa espectral de 200 a 800 nm em modo de absorbância, com largura da banda de absorção de 0,2 nm. As amostras foram diluídas a ponto de ter uma absorbância máxima próxima a 1.

4.7.2 Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG):

Em um microscópio eletrônico de varredura (MEV), a imagem é formada em um tubo de raio catódico sincronizado com uma sonda de elétrons à medida que escaneia a superfície de uma amostra. O (MEV) usa um feixe focado de elétrons de alta energia para gerar uma variedade de sinais na superfície de materiais sólidos. Os sinais emitidos encontram-se sob a forma de elétrons secundários, retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados, etc., os quais são captados por detectores no equipamento, amplificados e processados num sistema analisador específico para cada tipo de sinal (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Os sinais que derivam de interações de amostras com o feixe de elétrons revelam propriedades sobre a amostra, incluindo morfologia externa (textura), composição química, estrutura cristalina e orientação dos materiais que compõem a amostra. Na maioria das aplicações, os dados são coletados sobre uma área selecionada da superfície da amostra a partir dos quais uma imagem

bidimensional é gerada demonstrando aquelas propriedades (ORÉFICE *et al.*, 2006).

Em um MEV-FEG, na fonte de feixe de elétrons é utilizado um sistema denominado de field emission gun (FEG), que consiste em uma ponta de tungstênio extremamente fina o que resulta a uma resolução muito melhor do que a do filamento de um MEV convencional. Assim, o MEV-FEG consegue uma resolução nominal de pelo menos 2,0 nm, podendo conseguir aumentos de 100.000 a 300.000, com excelentes resolução e contraste da amostra (MALISKA, 2005).

Com o intuito de analisar as características morfológicas, como topografia, tamanho e formato do material e das nanopartículas foram feitas análises por Microscopia de Varredura Eletrônica de Alta resolução (FEG-MEV; JEOL modelo 7500F). Para isso, foram feitas suspensões das amostras em água deionizada e 10 μ L das suspensões foram gotejadas em um substrato de óxido de silício (SiO₂/Si), e então secas a temperatura ambiente.

4.7.3 Espectroscopia Raman:

A espectroscopia Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional que fornece informações sobre a composição molecular e estrutura molecular da amostra. Ela se baseia no espalhamento inelástico da luz que foi incidida na amostra, gerando uma radiação com comprimento de onda diferente da luz incidente. Esta diferença de energia está relacionada à energia com que os átomos atingidos pela radiação estão vibrando, e é esta frequência de vibração que permite a identificação de como os átomos estão ligados (GADELHA, 2013).

A espectroscopia Raman foi feita utilizando o LabRAM RH (Horiba), equipado com um laser de Ar arrefecido He-Ne no comprimento de onda de 632,81 nm e de potência de excitação de 0,17 mW. As amostras foram secas, maceradas e então aplicadas sobre uma lâmina de vidro. Os espectros foram obtidos de 300-3000 cm^{-1} , tendo como tempo de integração 60 segundos.

4.7.4 Espectroscopia no Infravermelho:

A radiação infravermelha causa excitações vibracionais nas ligações de uma molécula. Para cada ligação na molécula, a diferença de energia entre os estados vibracionais é intrinsecamente dependente da natureza desta ligação,

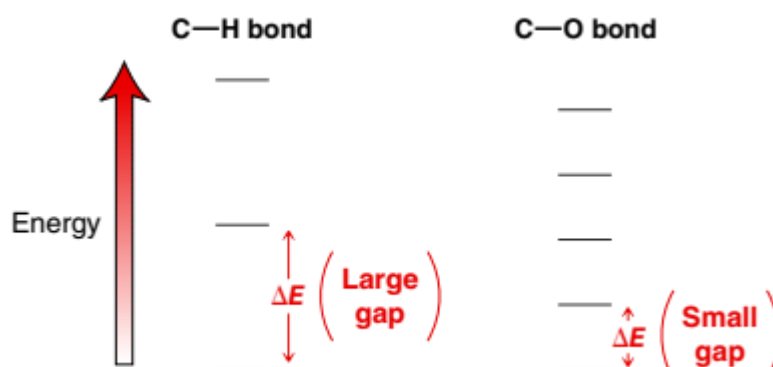
por exemplo, a diferença energética dos estados vibracionais entre uma ligação C-H é muito maior que a diferença para a ligação C-O (Figura 10).

Ambas as ligações irão absorver a radiação no infravermelho, mas para o caso da ligação C-H, esta absorverá fótons com maior energia. Assim, cada tipo de ligação irá absorver numa frequência característica, fazendo com que possa ser determinado quais os tipos de ligação presentes no composto analisado.

Para realizar uma análise é irradiado sob a amostra todas as frequências da radiação no infravermelho e então detectado quais frequências foram absorvidas pela amostra, fornecendo a informação de quais grupos funcionais estão presentes nessa amostra (KLEIN, 2021).

Os espectros no infravermelho foram obtidos utilizando um Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier - VERTEX 70 da BRUKER, empregando reflexão total atenuada (FTIR-ATR). As amostras foram secas, maceradas e então aplicadas diretamente no ATR, e feita uma varredura na região de 400-4000 cm^{-1} .

Figura 15. Diferença nos níveis de energia das ligações C-H e C-O



Fonte: KLEIN, 2021

4.7.5 Análise Termogravimétrica (TGA):

A análise termogravimétrica é uma técnica analítica muito usada em ciências dos materiais para o estudo da mudança na massa de uma amostra em função da temperatura ou tempo. Esse método permite avaliar a estabilidade térmica de um material, a sua decomposição e composição.

Em uma análise termogravimétrica uma pequena parte da amostra é aquecida em um ambiente controlado e são monitoradas as mudanças na massa. Em seu aparato consiste em uma balança de precisão conectada a um forno. Conforme a temperatura aumenta, a amostra passa por transformações químicas e/ou físicas, levando a um aumento ou perda de sua massa. A balança registra essas mudanças, gerando uma curva termogravimétrica que ilustra o comportamento da amostra mediante diferentes condições de temperatura (BEVIS, 2008).

As análises térmicas foram feitas no equipamento METTLER TOLEDO SC STARe System em atmosfera de ar sintético com uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹ de 30 a 800°C, com 3mg de cada amostra seca.

4.7.6 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS):

O equipamento de medidas por DLS relaciona o movimento Browniano de partículas em suspensão com o tamanho do diâmetro hidrodinâmico da partícula (que é o tamanho da partícula levando em consideração as camadas de solvatação ou até a agregação entre as partículas). Isto ocorre, pois, ao passar um feixe de luz por uma partícula estática, esta espalhará a luz em todas as direções. Se houver um conjunto de partículas e um detector próximo, este irá receber um padrão que será o resultante das interferências construtivas e destrutivas em cada região do detector. Como as partículas em suspensão estão em movimento browniano, o padrão de interferência detectado irá variar com o tempo. Fazendo uso da taxa de variação das intensidades pontuais bem como do fato de que partículas menores possuem maior velocidade de movimento browniano, o equipamento é capaz de calcular o tamanho do diâmetro hidrodinâmico dessas partículas.

Além da estimativa de tamanho, o equipamento é capaz de calcular o índice de polidispersividade (Pdl - *polydispersity index*). Isto se dá graças ao fato de ser capaz de medir a distribuição de tamanho. Logo, o Pdl é uma medida da largura da distribuição de tamanho e consiste em um valor adimensional. Os valores de Pdl variam de 0 a 1, onde 0 é um material altamente homogêneo (monodisperso) e 1 altamente heterogêneo (polidisperso) (KUMAR; DIXIT, 2017). Assim sendo, caso o valor seja próximo de 1, trata-se de um indicativo de polidispersão/agregação/sedimentação do material e a amostra não é adequada

para a medida em DLS. As análises foram feitas em um Zetasizer Nano ZS90 (Malvern) com um volume de 2 ml da amostra diluída em água e feito a análise em triplicata.

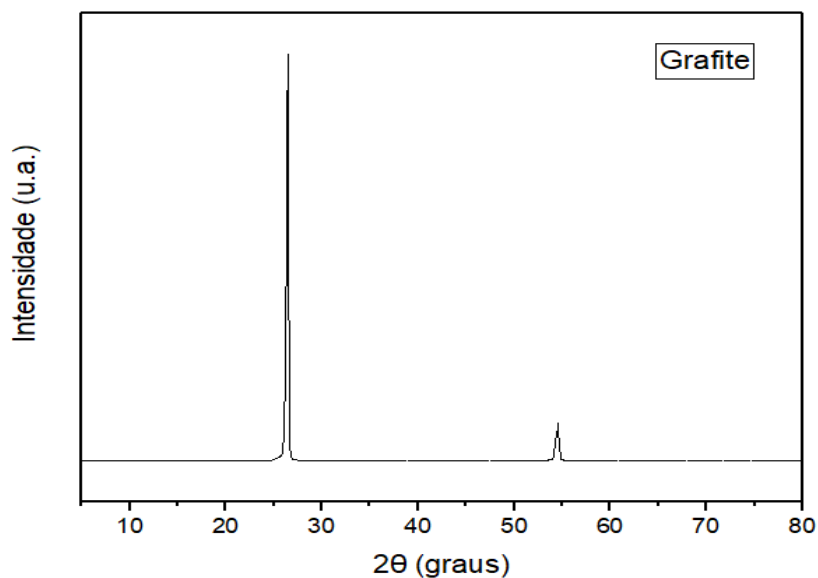
5 Resultados e Discussões

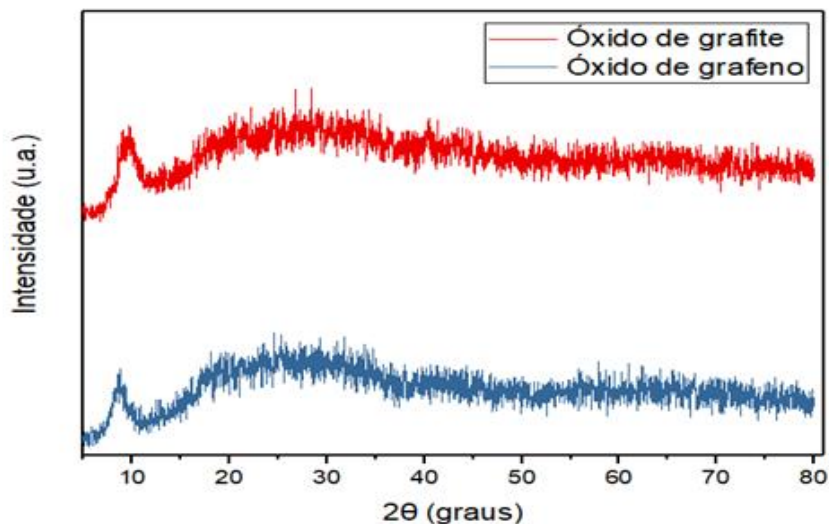
5.1 Caracterizações

5.1.1 Óxido de Grafeno (OG) e Óxido de Grafeno com Ácido Fólico (OF-AF)

Há uma quebra na cristalinidade do material pode ser observada na análise de raios-x (Figura 16) que nos mostra o grafite como um material cristalino com picos definidos ($26,38^\circ$ e $54,53^\circ$) e o óxido de grafeno com muitos ruídos devido essa perda na cristalinidade do material e seus picos característicos que variam de $7-12^\circ$. Para o óxido de grafite, esse pico se encontra em $9,62^\circ$ e o óxido de grafeno em $8,7^\circ$ (SUN ,2008).

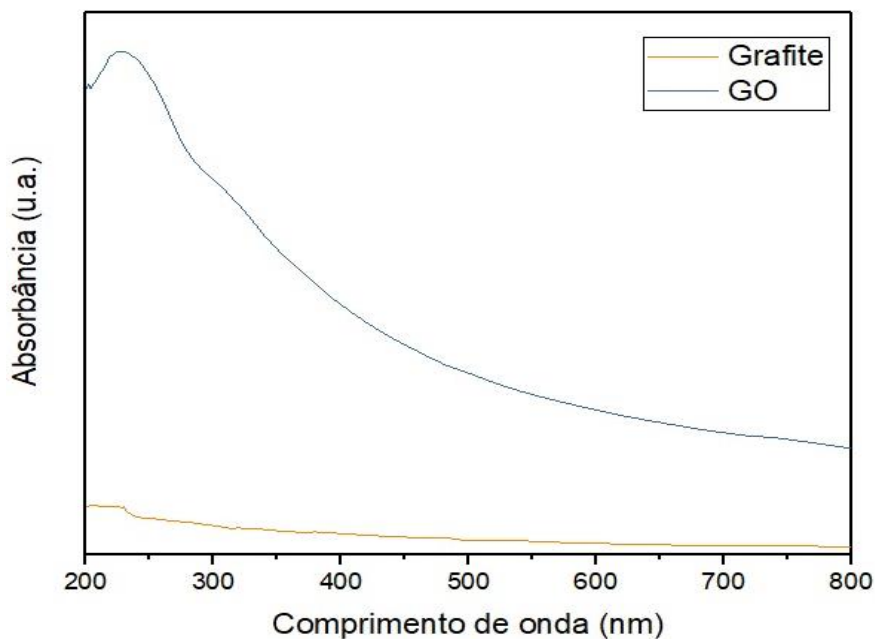
Figura 16. Difratograma de raios-x do material de partida (Grafite) e difratogramas do óxido de grafite e óxido de grafeno.





Fonte: Próprio Autor

Figura 17. Espectro de UV-vis do óxido de grafeno e grafite.



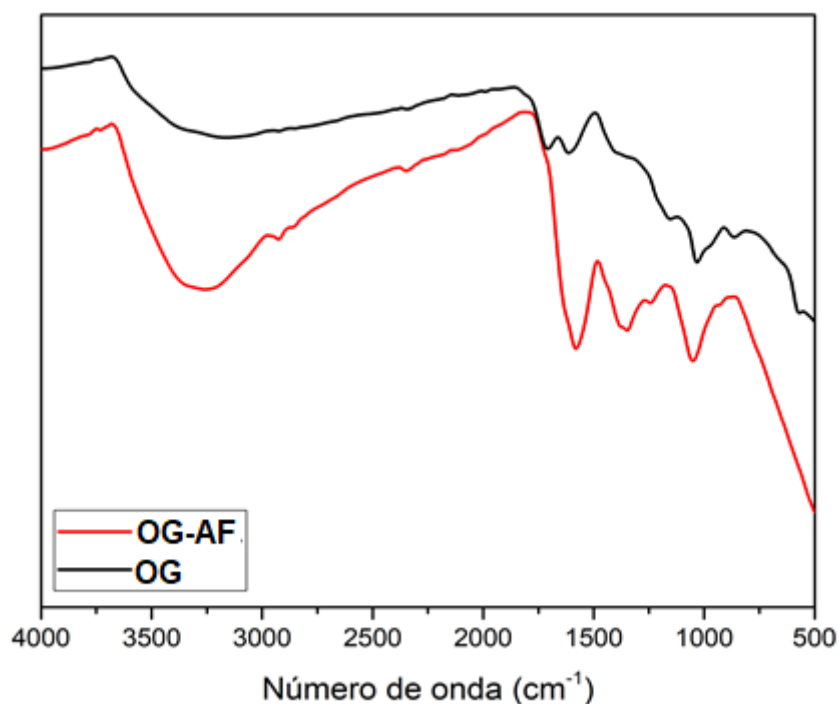
Fonte: Próprio Autor

Como visto na Figura 17, a primeira absorção é um ombro (banda larga e de baixa intensidade) em aproximadamente 310 nm correspondente ao pico de absorção do óxido de grafeno, essa absorção é atribuída às transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos carbonila e carboxilas ($C=O$ e $HO-C=O$). Esta transição envolve a promoção de um elétron de um orbital não-ligante do átomo de oxigênio para um orbital anti-ligante π^* através da absorção de um fóton. A segunda é uma banda

mais estreita e de alta intensidade, centrada em 230 nm. Essa absorção corresponde às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações C=C dos anéis aromáticos. À medida que o grafite em flocos é oxidado, átomos de carbono sp^2 são convertidos em átomos com hibridização sp^3 , causando uma diminuição no tamanho médio das conjugações da rede. Conseqüentemente, ocorre um deslocamento na posição das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ para menores comprimentos de onda. A diferença de intensidade entre essas duas bandas pode ser explicada em razão da baixa absorvidade molar das transições $n \rightarrow \pi^*$ em oposição das transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (DIMIEV, EIGLAR, 2016).

A figura 18 mostra os espectros obtidos para o óxido de grafeno (OG), óxido de grafeno com ácido fólico (OG-AF) e junto com a Tabela 1 descrevendo as principais regiões de absorção dessas moléculas.

Figura 18. Espectro de infravermelho do óxido de grafeno e óxido de grafeno com ácido fólico.



Fonte: Próprio Autor

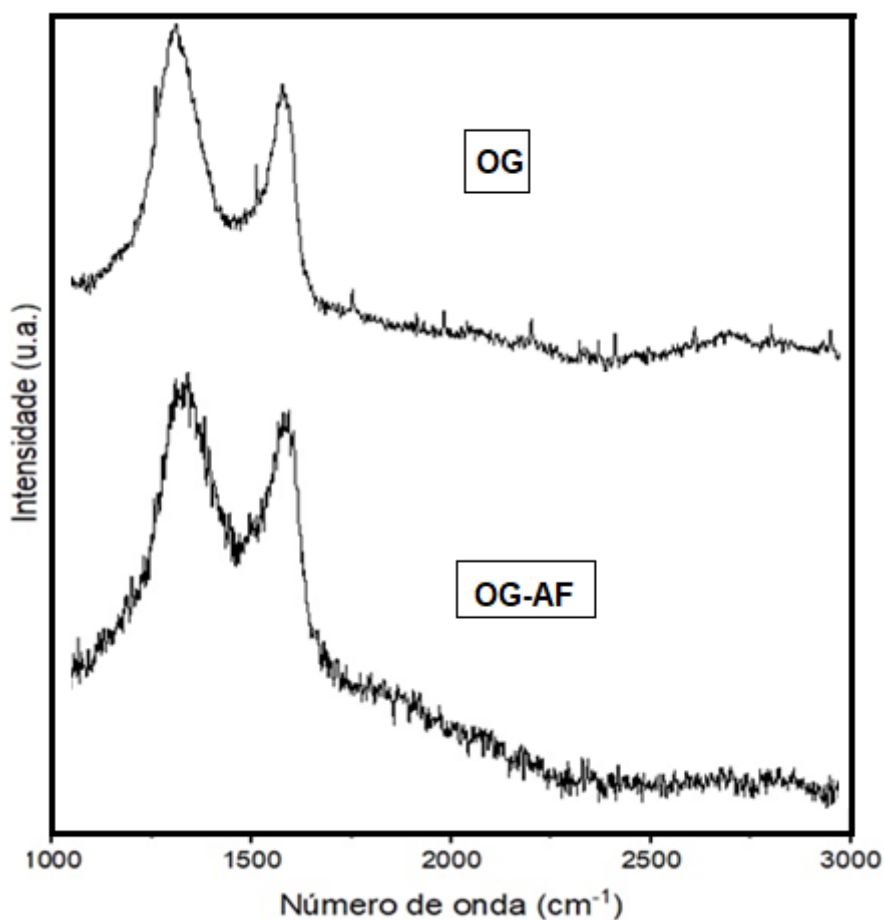
Tabela 1. Atribuições dos sinais de absorção na região do infravermelho para o OG e OG-FA

Número de onda/cm⁻¹		
	OG	OG-AF
vOH	3300	3300
vC=O	1710	1630
vC=C_{aromático}	1612	Sobreposto
δ-C=C-H_{alifática}	1027	1053
v -C-O-C epóxi	1160	-
δ-C-O-C epóxi	570	-
vNH	-	3300
δNH	-	1580
vCN	-	1360
δCO	-	1245

Ao comparar os espectros no infravermelho, podemos observar um aumento na absorção em 3300 no OG-AF, isso se deve ao fato de além de apresentar o estiramento da ligação OH, o OG-AF apresenta o estiramento NH da amida formada que absorve na mesma região. No OG temos o estiramento C=O característico dos ácidos carboxílicos presentes, enquanto no OG-AF esse estiramento se encontra em 1630, representando a amida formada na reação.

Outra região importante para a caracterização das amostras são o estiramento C-O-C e a deformação C-O-C do epóxido que só é observado no grafeno, indicando que os epóxidos foram transformados em OH como previsto no mecanismo de reação. As bandas referentes à deformação da ligação NH (1580) e estiramento da ligação C-N (1360) também são apenas observadas no espectro do OG-FA. O estiramento da ligação C-O do éter formado no OG-AF se encontra em 1245, que é característica de éteres ligados em anel aromáticos, enquanto no OG se encontra 1160, característica dos epóxidos (QIN, *et al.*, 2013).

Figura 19. Espectro RAMAN do óxido de grafeno e óxido de grafeno com ácido fólico.



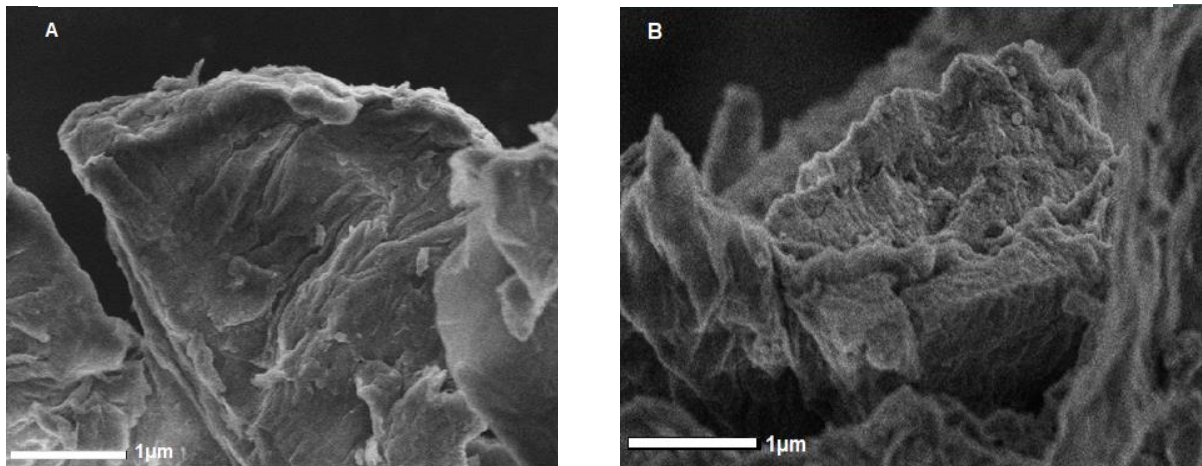
Fonte: Próprio Autor

Na figura 19, temos os espectros Raman do OG e OG-AF, esta técnica é muito importante para a caracterização do grafeno, pois ela correlaciona os defeitos na superfície do óxido de grafeno com as alturas e larguras das bandas D (que variam entre 1200-1400) e G (que variam entre 1500-1600). Para a banda D é atribuído a desordem e defeitos na estrutura do grafeno e a banda G corresponde as vibrações das ligações sp^2 dos átomos de carbono (ZEDAN, *et al.*, 2013).

Assim observa-se que para o OG-AF há uma pequena mudança na posição da banda D comparada com o OG, de 1333 para 1360, e um aumento na intensidade da banda G. Isso indica que há um aumento nos defeitos da estrutura e um aumento de carbonos com ligações sp^2 (QIN, *et al.*, 2013).

Esses defeitos estruturais também puderam ser confirmados através da análise de microscopia eletrônica de varredura (figura 20).

Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura para o óxido de grafeno (A) e óxido de grafeno com ácido fólico (B).



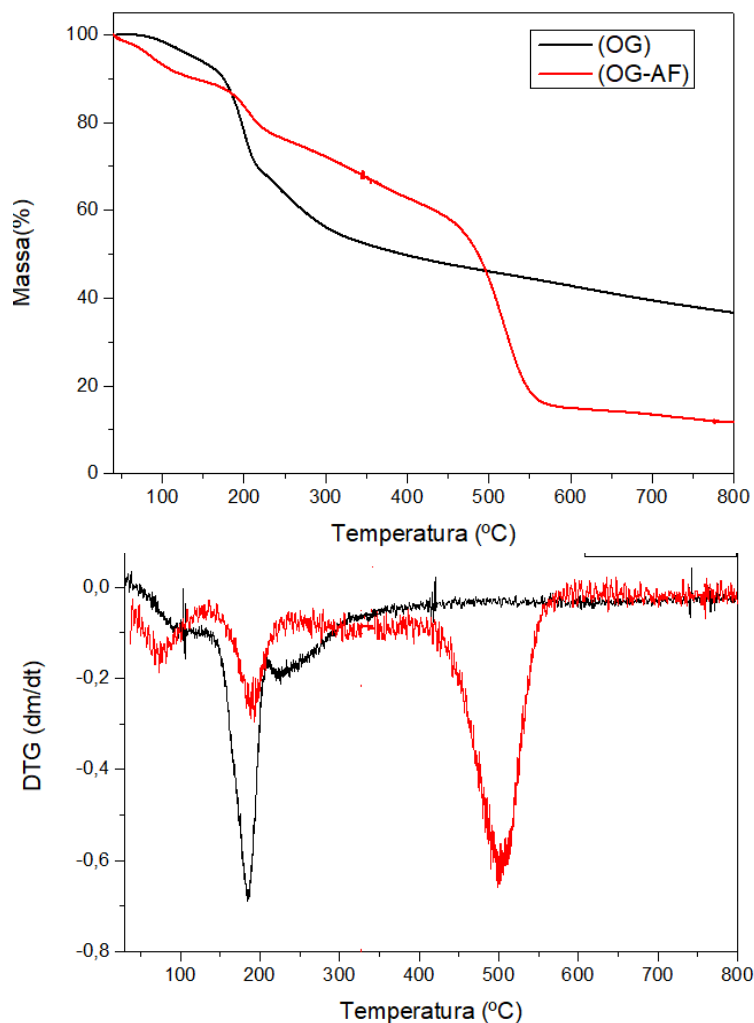
Fonte: Autor

O OG apresentou um aspecto de folhas, com rugas e dobras em sua superfície. Isso se deve ao fato das interações entre os grupos funcionais oxigenados epóxi, hidroxil e carbonil, presentes entre as folhas, enquanto o OG-AF com a inserção do ácido fólico na estrutura houve uma mudança na morfologia superficial do óxido de grafeno, devido as novas interações intermoleculares que a adição desta molécula provoca (YANG, *et al.*, 2013).

Na Figura 21, o comportamento térmico dos materiais estudados foi avaliado e os principais eventos térmicos (perda de massa, eventos térmicos e temperaturas máximas de degradação) encontram-se resumidos na Tabela 2.

Como mostra o gráfico, há três eventos de perda de massa para o OG, a primeira perda se dá em aproximadamente 75°C, proveniente da liberação de água adsorvida na superfície. O segundo evento ocorre em 149°C-209°C, sendo essa perda atribuída aos grupos funcionais oxigenados do material. Por fim de 206°C-307°C, atribui-se ao início de combustão da rede carbônica, a qual vai perdendo massa até restar com 36% da massa original (KAROUSIS, *et al.*, 2012).

Figura 21. Análise termogravimétrica do óxido de grafeno e óxido de grafeno com ácido fólico



Fonte: Autor

Já para o OG-AF o primeiro evento térmico se dá início em aproximadamente 50°C e termina em 126°C, este evento é característico à perda de água residual da amostra. De 158°C-227°C há um segundo evento, o qual pode ser atribuído a perda de grupos oxigenados presentes. De 230°C-405°C, há uma perda de 17% de massa da amostra, neste evento, praticamente todo ácido fólico presente foi decomposto. Por último, temos um evento em 430-560°C que é atribuído a queima do esqueleto carbônico do material, perdendo 41% de massa. Depois deste último evento a amostra vai se deteriorando até chegar a 10% da massa original (KAROUSIS, *et al.*, 2012).

Tabela 2. Principal evento térmico extraídos da curva de TGA

	Temperatura inicial de degradação (°C)	Temperatura final de degradação (°C)	Temperatura máxima de degradação (°C)	Perda/massa (%)
OG	158	277	184	64
OG-AF	430	560	500	90

5.1.2 Nanobastões de ouro

As nanopartículas de ouro podem possuir formatos diferentes, como bastões, esferas, prismas, entre outros. Essa diversidade de formatos implica diretamente na coloração das soluções obtidas, devido a diferença da absorção da luz que cada forma apresenta, como por exemplo, nanoesferas possuem uma coloração no vermelho, enquanto nanobastões possuem uma coloração azul (Figura 22) (ATTIA, *et al.*, 2015).

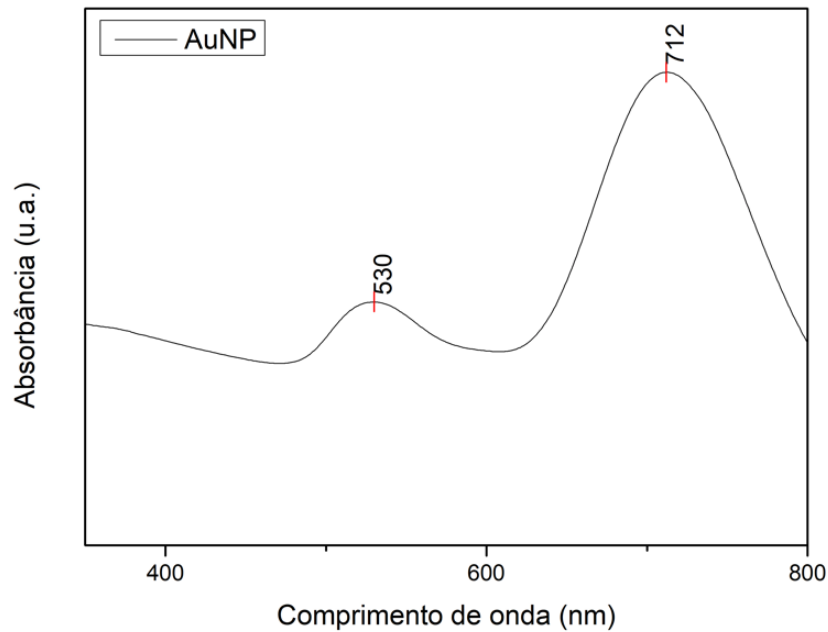
Este fenômeno dá-se ao seu efeito da Ressonância de Plasmon de Superfície Localizada e é característico de cada formato das nanopartículas de ouro. Com a espectrometria UV-vis podemos verificar o comprimento de onda no qual está ocorrendo o efeito da LSPR e verificar a formação das nanopartículas de ouro no formato de nanobastões (ATTIA, *et al.*, 2015).

Figura 22. Solução das nanopartículas de ouro.



Fonte: Próprio Autor

Figura 23. Espectro de UV-vis das nanopartículas de ouro.

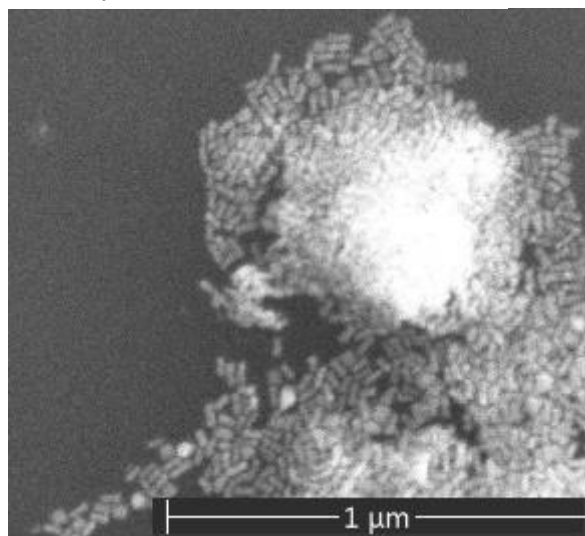


Fonte: Próprio Autor

Como observado no espectro UV-vis, a nanopartícula de ouro apresentou duas regiões de absorção. A de 530 nm corresponde a possível sementes que não cresceram no processo de síntese, esta absorção é característica de nanoesferas. Já a absorção em 712 nm é a absorção característica dos nanobastões de ouro (700-1000 nm dependendo do comprimento dos nanobastões) (KUMAR, *et al.*, 2019).

O formato das nanopartículas foi corroborado também na análise de microscopia eletrônica de Varredura (Figura 24). Em que pode ser observado os formatos de bastonetes com tamanhos aproximados de 100 nm de comprimento.

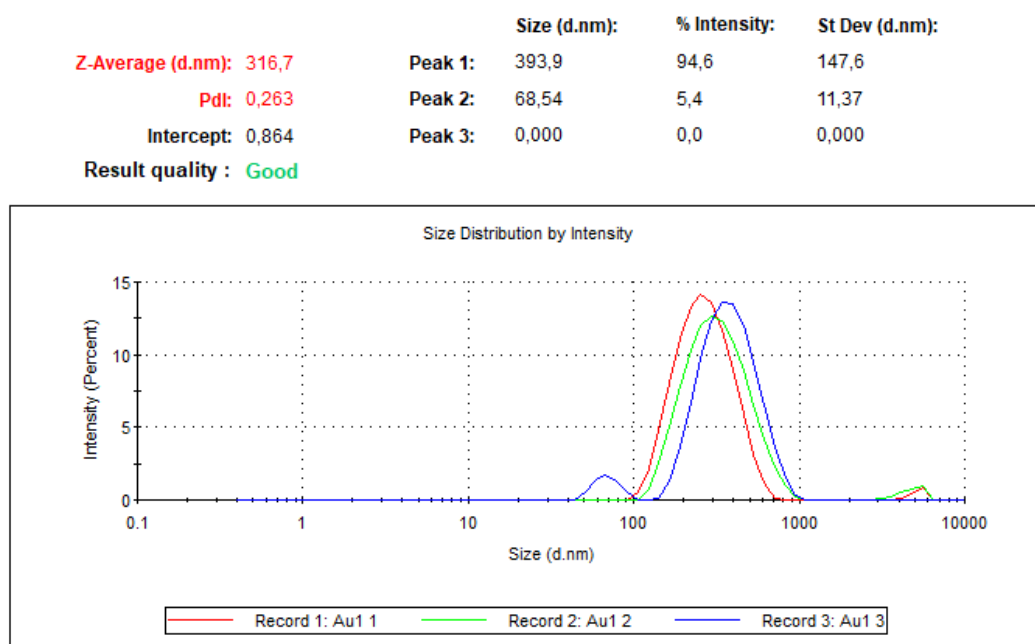
Figura 24. Imagens MEV nanopartículas de ouro.



Fonte: Próprio Autor

O espalhamento de luz dinâmico mede a luz espalhada por partículas em soluções. Como a intensidade da luz espalhada é proporcional ao tamanho da partícula, estas que forem maiores produzirão sinais melhores do as partículas menores. Assim, um baixo percentual de aglomerados terá uma intensidade de sinal maior comparada com ampla proporção de partículas menores. Uma vantagem da técnica DLS é que as amostras podem ser analisadas rapidamente em solução para determinar se as AuNPs estão agregadas ou não.

Figura 25. Resultados da análise de DLS para as nanopartículas de ouro.



Fonte: Próprio Autor

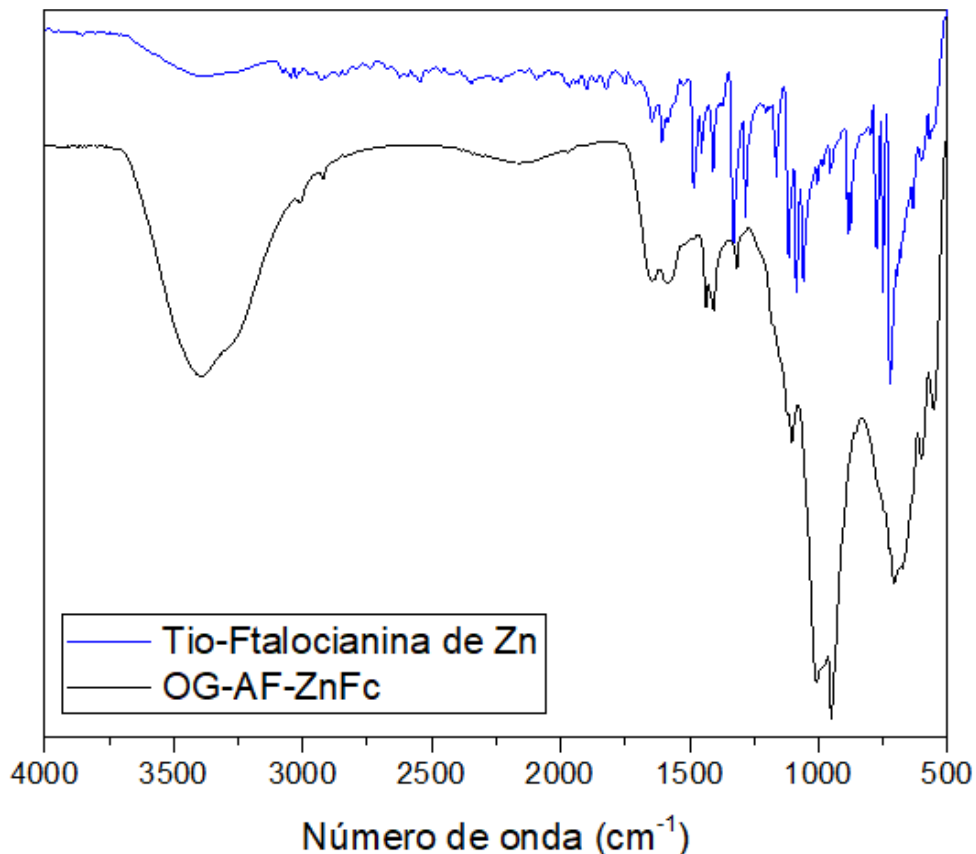
Os resultados obtidos das medidas do tamanho hidrodinâmico das AuNPs por meio do espalhamento de luz são mostrados nas Figura 25.

A análise de DLS foi feita em triplicata, podemos observar que a média dos raios hidrodinâmicos das nanopartículas ficou em torno de 316,7 nanômetros e o índice de polidispersividade (Pdl - *polydispersity index*) é de 0,263, indicando uma homogeneidade na amostra (monodisperso). O outro pico com raio de 68.54 nanômetros se atribui as nanoesferas providas das sementes que não cresceram na síntese e não foram completamente retiradas na centrifugação, mas como mostrado pela intensidade do sinal, há poucas sementes na amostra, que foi corroborado com o espectro UV-vis desta.

5.1.3 Adição do fotossensibilizador

A figura 26 mostra os espectros obtidos para o OG-AF-ZnS4Pc e compara com a fenil-tio-Ftalocianina de Zn e junto com a Tabela 3 descrevem as principais regiões de absorção do OG-AF-ZnS4Pc.

Figura 26. Espectrometria no infravermelho para a fenil-tio-Ftalocianina de Zn e o óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e o fotossensibilizado.



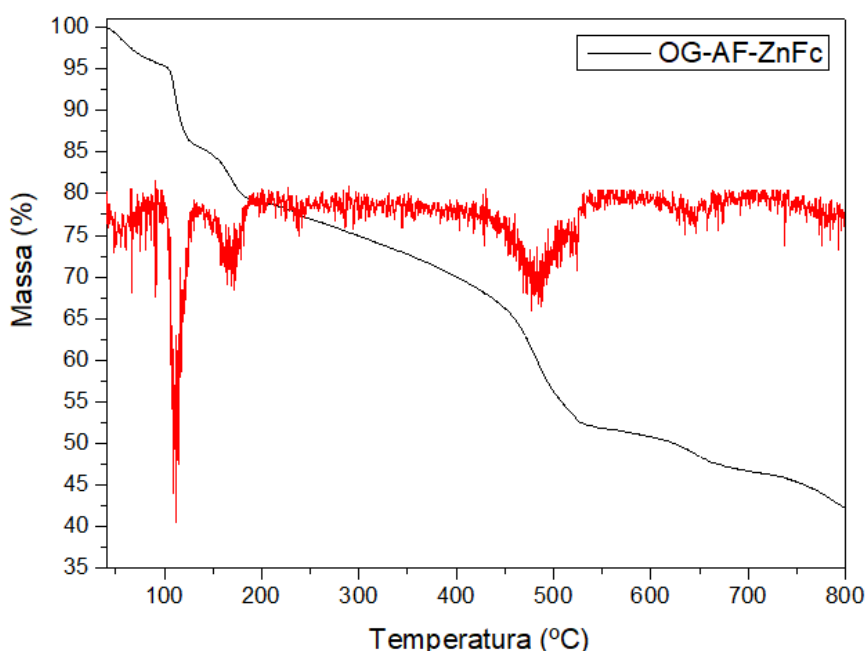
Fonte: Próprio Autor

Tabela 3. Atribuições dos sinais de absorção na região do infravermelho para o OG-AF-ZnS4Pc

Número de onda/cm ⁻¹	
OG-AF-ZnS4Pc	
ν OH	3300
ν -C=N	1408
ν C=C _{aromático}	1438
δ -C=C-H _{alifática}	1013
ν -C-S-C	701
ν NH	3300
δ NH	1589
δ CN	1320
δ CO	1107
Zn-N	946 – 551
ν C=O _{amida}	1651

Obtemos nesse espectro várias bandas de absorção características muito importantes das ftalocianinas. A banda em 1320 cm^{-1} referentes à deformação do grupo pirrol da Ftalocianina e a banda em 1408 cm^{-1} atribuída à deformação de C–N=C, observadas em amins secundárias cíclicas, o sinal em 701 cm^{-1} proveniente da ligação C-S-C e os sinais indicando a ligação do metal central da ftalocianina com o Nitrogênio que são observados em 946 cm^{-1} e 551 cm^{-1} (NEGRI, 2015). Além dos sinais do próprio OG-AF, da ligação C=O proveniente da amida em 1651 cm^{-1} , o estiramento da ligação OH e NH na região de 3300 cm^{-1} (QIN, *et al.*, 2013).

Figura 27. Análise termogravimétrica do óxido de grafeno com ácido fólico com o fotossensibilizador.



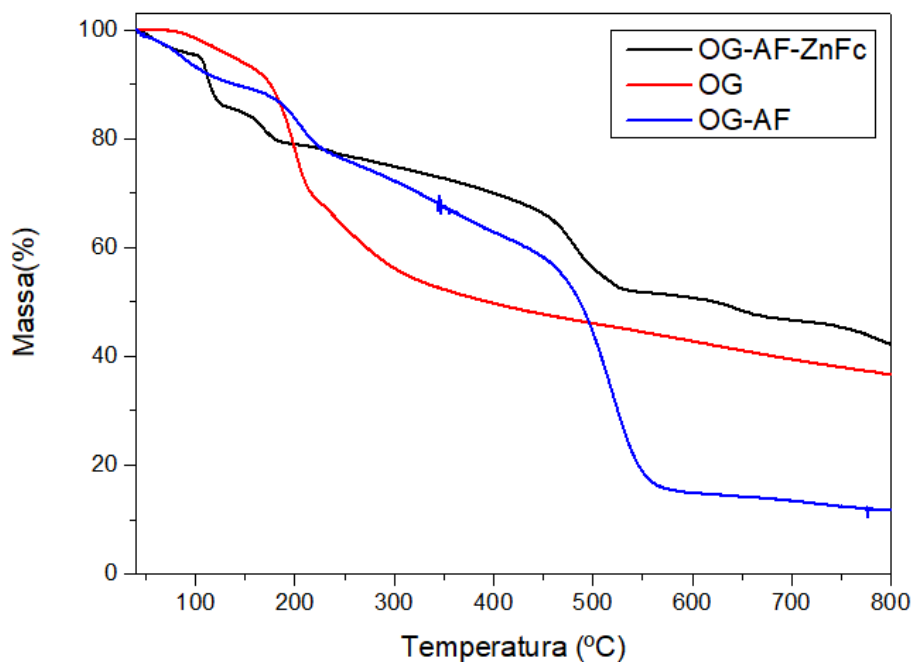
Fonte: Próprio Autor

Foi avaliado o comportamento térmico do material sintetizado e seus principais eventos térmicos (perda de massa, eventos térmicos e temperaturas máximas de degradação) mostrados na figura 27.

O termograma mostra uma perda de massa de 22% até 200 °C, acontecendo em três eventos, que se dão a perda de água adsorvida nas folhas (45°C-82°C), o segundo evento (100°C-130°C) atribuídos a perda de unidades de grupos funcionais presentes e o terceiro evento (137°C-200°C) ao começo da perda do ácido fólico presente na amostra até chegar em 32% de massa perdida,

que é quando começa o quarto evento. Neste evento (423°C-525°C) começa a perda da ftalocianina presente na estrutura do grafeno e por último o evento (629°C-662°C) caracterizando a perda do esqueleto do grafeno. Seguindo a decomposição até restar 42% da massa original (COSTA JUNIOR, 2017).

Figura 28. Comparação entre as análises térmicas do óxido de grafeno, óxido de grafeno com ácido fólico e óxido de grafeno com ácido fólico funcionalizado com o fotossensibilizador



Fonte: Próprio Autor

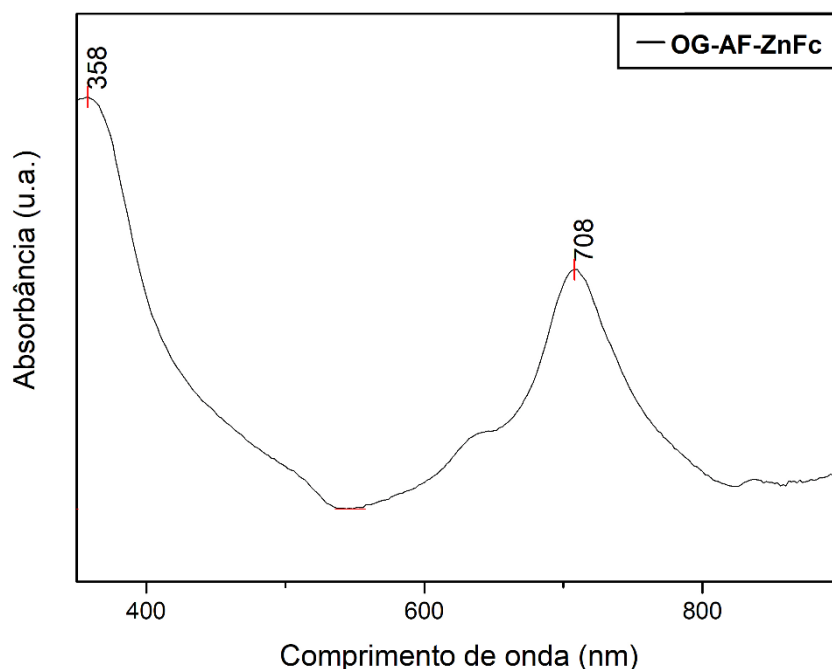
Ao comparar os termogramas vemos que o OG-AF-ZnS4Pc foi o composto que menos degradou com o aumento da temperatura, isso já era esperado, pois os íons metálicos de Zn não seriam degradados nessa temperatura, já os materiais orgânicos e segundo Nikolaos Karousis et al., as ftalocianinas dopadas no grafeno protegem a estrutura deste, fazendo com que seja mais estável a termodecomposição, visto que o esqueleto carbônico deste apenas começou a ser degradado em 629°C.

O espectro UV-vis foi realizado nesta amostra a fim de verificar a absorção da fenil-tio-Ftalocianina de Zinco funcionalizada no óxido de grafeno corresponde faixa de comprimento de onda desejado para o propósito do material.

Como mostrado na figura 29, houveram dois picos de absorção no UV-vis, um em 358 nm, correspondente ao pico de absorção do óxido de grafeno e

do ácido fólico, essa absorção é atribuída às transições $n \rightarrow \pi^*$ dos grupos carbonila e carboxilas ($C=O$ e $HO-C=O$) (WONG, *et al.*, 2021). E o outro pico de absorção se dá à fenil-tio-Ftalocianina de Zinco em 708 nm, este era o comprimento de onda esperado, pois Ftalocianinas coordenadas aos metais que apresentam os orbitais d totalmente preenchidos interagem com o orbital molecular ocupado de mais baixa energia (HOMO) de forma repulsiva, diminuindo o gap de energia entre HOMO e o LUMO, estabilizando o orbital molecular. Essa diminuição confere um deslocamento no espectro eletrônico de UV-vis para a ZnS4Pc, comparando com uma ftalocianina livre.

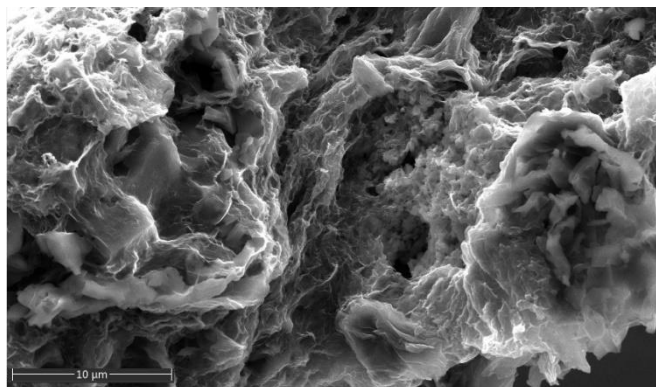
Figura 29. Espectro de UV-vis para o composto de óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e fotossensibilizador



Fonte: Próprio Autor

Outra caracterização importante é a morfologia do composto OG-AF-ZnS4Pc, que através de imagens de MEV (Figura 30) podemos observar uma maior rugosidade e defeitos na estrutura do material, que será importante para a inserção das nanopartículas de ouro devido ao poder de adsorção física de materiais mais defeituosos.

Figura 30. Imagem MEV do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e fotossensibilizador

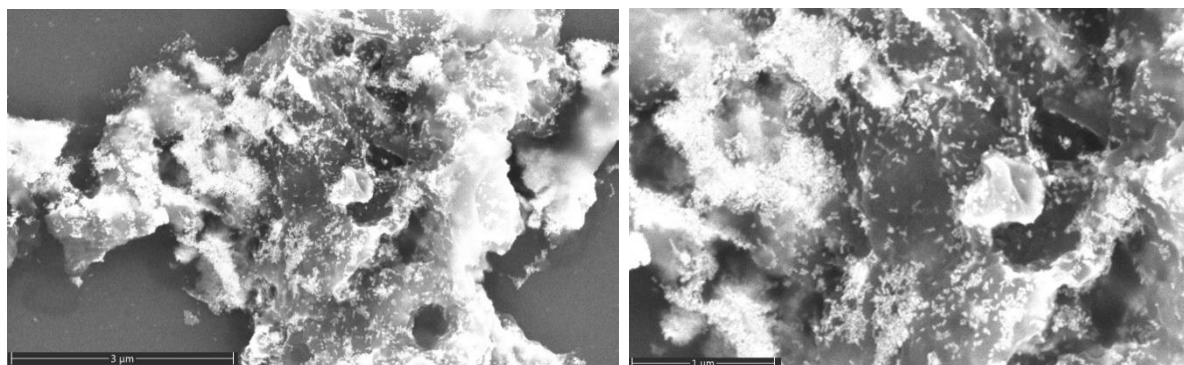


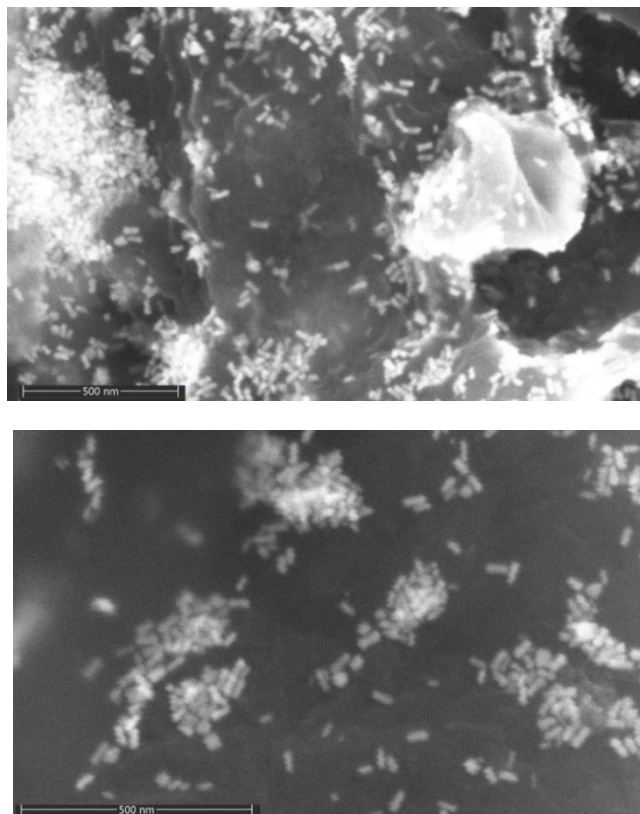
Fonte: Próprio Autor

5.1.4 Adição nanopartículas na estrutura OG-AF-ZnS4Pc

A adição das nanopartículas na estrutura foi confirmada pela imagem de microscopia eletrônica de varredura e pela Espectrometria UV-vis. Na Figura 31, temos a imagem MEV utilizando elétrons retroespalhados, neste tipo de análise os elétrons incidentes interagem na amostra, sendo parte deles retroespalhados, ou seja, desviados de volta na direção oposta ao feixe incidente. Esses elétrons são sensíveis à densidade atômica da amostra, proporcionando um contraste para materiais mais densos, como os metais, para as nanopartículas de ouro, oferece uma visualização mais detalhada da morfologia e tamanho das partículas.

Figura 31. Imagens MEV com elétrons retroespalhados do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e fotossensibilizador dopado com nanopartículas de ouro.



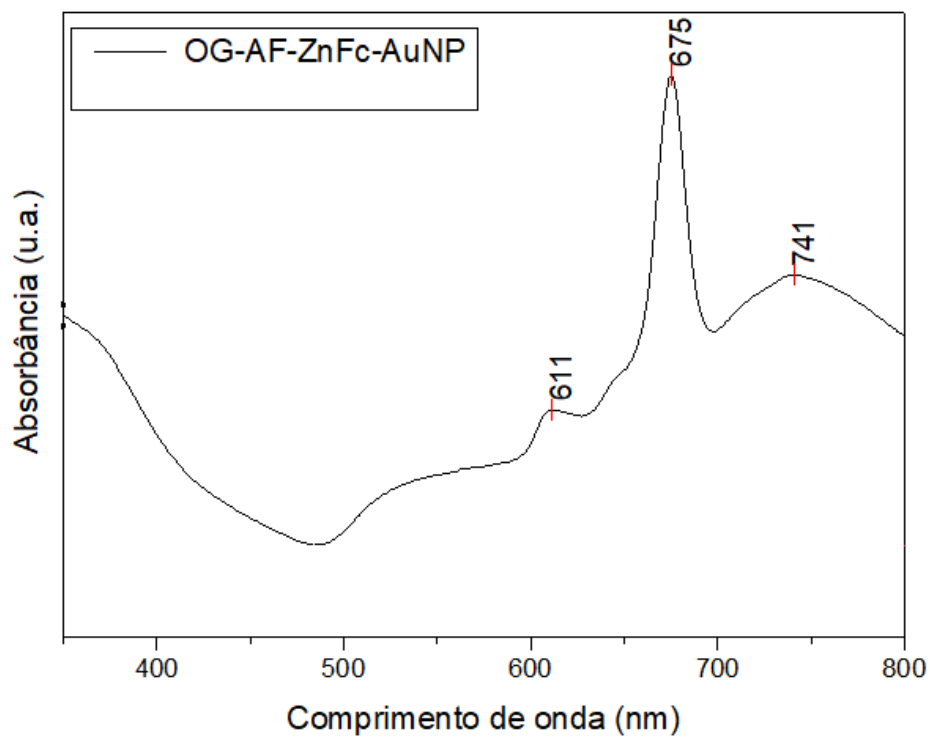


Fonte: Próprio Autor

Temos na figura 31 as imagens MEV com elétrons retroespalhados do OG-AF-ZnS₄Pc-AuNP da mesma região aumentado em 25000x, 50000x e 100000x, e uma em outra região da amostra aumentada 150000x, podemos ver a adsorção dos nanobastões na superfície da amostra.

No espectro de UV-vis para a amostra (Figura 32) observamos os comprimentos de onda que o material sintetizado absorve. Atribui-se o sinal em 611 nm as sementes de Au presentes e em 741 nm aos nanobastões de Au, Segundo (HU, *et al.*, 2013) o acoplamento de plasmonônico entre as AuNPs adsorvidos na superfície do OG é responsável por esse deslocamento para o vermelho apresentado no espectro. Essas interações dos materiais fizeram com que a absorção da fenil-tio-ftalocianina de Zn diminuísse o comprimento de onda (deslocamento para o azul) apresentando um pico de absorção em 675 nm, ainda dentro da faixa espectral esperada.

Figura 32. Espectro UV-vis para o óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e fotossensibilizador e dopado com as nanopartículas de ouro.



Fonte: Próprio Autor

5.2 Ensaio viabilidade celular para fibroblastos humanos dérmicos

De acordo com a figura 33, obtemos os seguintes resultados para os grupos experimentais:

Figura 33. Viabilidade celular dos fibroblastos dérmicos humanos (HDFn) após a exposição dos materiais sintetizados.

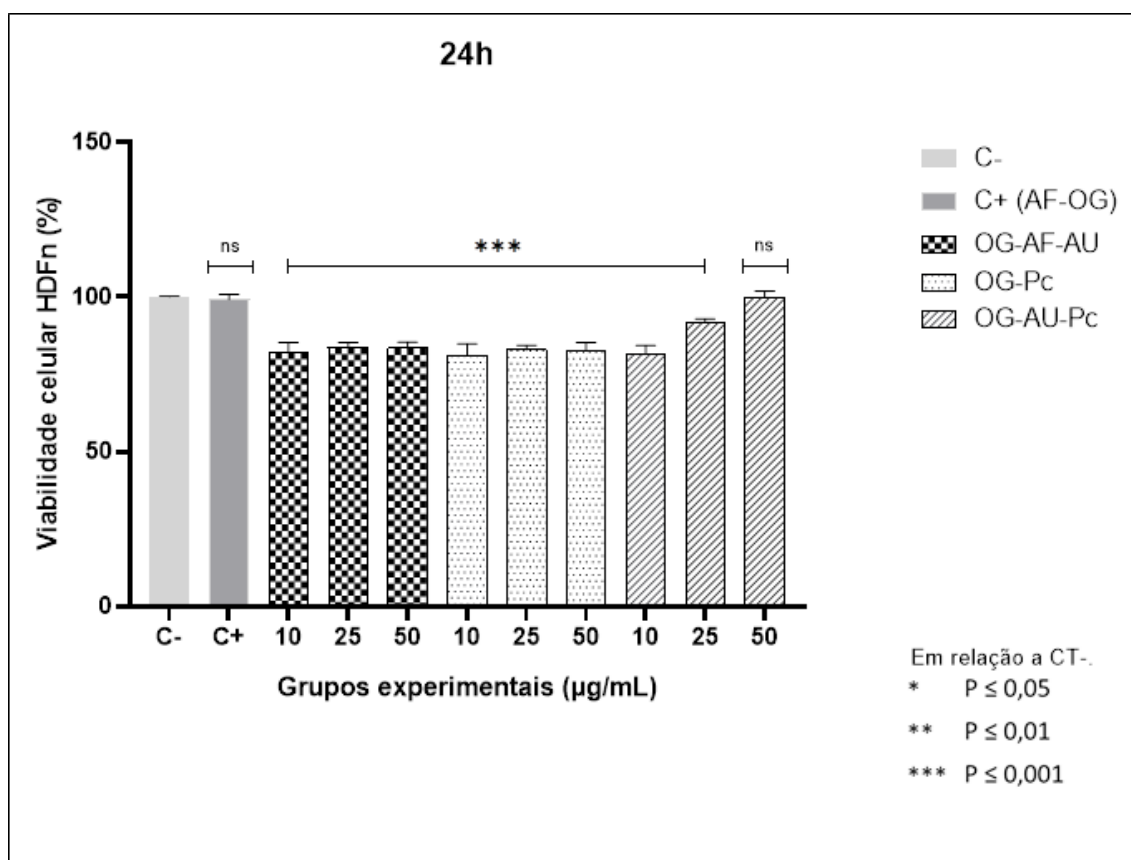


Tabela 4. Grupos experimentais e sua Viabilidade celular e coeficiente de variação

	%	CV%
C-	100	0,311831
C+	99,30	1,57
G1 (50 µg.mL ⁻¹)	83,44	1,98
G1 (25 µg.mL ⁻¹)	83,69	1,56
G1 (10 µg.mL ⁻¹)	82,04	3,31
G2 (50 µg.mL ⁻¹)	82,49	2,71
G2 (25 µg.mL ⁻¹)	82,95	1,39
G2 (10 µg.mL ⁻¹)	81,23	3,69
G3 (50 µg.mL ⁻¹)	99,76	2,13
G3 (25 µg.mL ⁻¹)	91,62	1,32
G3 (10 µg.mL ⁻¹)	81,65	2,68

Fonte: Próprio Autor

Controle Negativo (C-)

O controle negativo apresentou 100% de viabilidade celular com um coeficiente de variação (CV%) de 0,31%, como esperado para células não tratadas. Este resultado serve como referência para a saúde celular ideal.

Controle Positivo (C+)

No controle positivo, onde as células foram expostas ao óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico (OG-AF) a 5,0 µg/mL, a viabilidade celular foi de 99,30% com um CV% de 1,57%. Este resultado indica que o OG-AF, nesta concentração, tem uma toxicidade mínima.

Grupo 1 (G1): OG-AF-AuNp

O grupo G1, com óxido de grafeno, ácido fólico e nanopartículas de ouro (OG-AF-AuNp), apresentou uma viabilidade celular em torno de 82-83% em todas as concentrações testadas:

- 50 µg/mL: 83,44% (CV% = 1,98)
- 25 µg/mL: 83,69% (CV% = 1,56)
- 10 µg/mL: 82,04% (CV% = 3,31)

Esses resultados mostram que, embora haja uma leve diminuição na viabilidade celular, ela permanece acima de 75% (ISO 10993-5:2009), o que indica uma boa biocompatibilidade das formulações G1, mesmo com a adição de nanopartículas de ouro.

Grupo 2 (G2): OG-AF-ZnS4Pc

O grupo G2, composto por óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e ftalocianina (OG-AF-ZnS4Pc), apresentou viabilidades celulares semelhantes às de G1:

- 50 µg/mL: 82,49% (CV% = 2,71)
- 25 µg/mL: 82,95% (CV% = 1,39)
- 10 µg/mL: 81,23% (CV% = 3,69)

Assim como no G1, a viabilidade celular para G2 também se manteve acima de 75% em todas as concentrações testadas, sugerindo que essa combinação é relativamente segura para as células NIH-3T3.

Grupo 3 (G3): OG-AF-ZnS4Pc-AuNp

O grupo G3, que contém óxido de grafeno, ácido fólico, ftalocianina e nanopartículas de ouro (OG-AF-ZnS4Pc-AuNp), apresentou os seguintes resultados:

- 50 µg/mL: 99,76% (CV% = 2,13)
- 25 µg/mL: 91,62% (CV% = 1,32)
- 10 µg/mL: 81,65% (CV% = 2,68)

O G3, especialmente na concentração de 50 µg/mL, demonstrou uma viabilidade celular quase igual ao controle negativo (99,76%), indicando uma toxicidade praticamente inexistente.

Com base nos resultados, todas as formulações testadas mantiveram uma viabilidade celular acima de 75%, o que é considerado bom. O composto final (G3) mostrou-se particularmente promissor, com viabilidades muito próximas ao controle negativo, especialmente na maior concentração testada. Mesmo as formulações intermediárias (G1 e G2) demonstraram viabilidade celular adequada, sugerindo que as modificações feitas ao longo do processo de síntese resultaram em materiais que são seguros para uso em células NIH-3T3.

Esses resultados reforçam o potencial das formulações desenvolvidas para aplicações biomédicas, onde a manutenção de alta viabilidade celular é crucial.

6 Conclusão

Em conclusão, a síntese bem-sucedida do óxido de grafeno funcionalizado com ácido fólico e fotossensibilizador e dopado com nanopartículas de ouro resultou na obtenção de um material teranóstico multifuncional promissor para aplicações nas terapias fototérmicas e fotodinâmicas. A incorporação de ouro e do fotossensibilizador conferiu a absorção deste material na faixa espectral desejada, faixa do infravermelho próximo, tornando-o eficiente como agente fototérmico para tratamento de câncer de pele. A adição estratégica de Zinco Fenil-Tio-ftalocianina como fotossensibilizador, juntamente com ácido fólico para seletividade tumoral, demonstra uma abordagem inovadora para terapias específicas.

A caracterização detalhada por espectroscopia no infravermelho, espectroscopia UV-vis, análise termogravimétrica, microscopia eletrônica e testes de viabilidade celular validaram a eficácia da síntese, evidenciando a presença da funcionalização do óxido de grafeno e o comportamento térmico do material. Além disso, a ausência de citotoxicidade, para esta linhagem de célula, nas análises de viabilidade celular confirma a biocompatibilidade do material, destacando seu potencial para aplicações clínicas.

Esses resultados encorajadores sugerem que o material desenvolvido possui propriedades terapêuticas valiosas, abrindo caminho para futuras pesquisas e aplicações na área de nanomedicina e tratamento do câncer cutâneo.

Referências

- ABAKUMOVA, O. Yu et al. Novel drug form of chlorin e6. In: **Laser Use in Oncology II**. SPIE, 1999. p. 130-138.
- ABRAHAMSE, Heidi; HAMBLIN, Michael R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **ABNT NBR ISO 10993-5:2009**. Avaliação biológica de dispositivos médicos — Parte 5: Ensaio de citotoxicidade: métodos in vitro. Rio de Janeiro: ABNT, 2009. 34 p.
- ATTIA, Yasser A. et al. Photostability of gold nanoparticles with different shapes: The role of Ag clusters. **Nanoscale**, v. 7, n. 26, p. 11273-11279, 2015.
- BELOQUI, Ana; DES RIEUX, Anne; PRÉAT, Véronique. Mechanisms of transport of polymeric and lipidic nanoparticles across the intestinal barrier. **Advanced drug delivery reviews**, v. 106, p. 242-255, 2016.
- BEVIS, J. A. et al. **Principles and applications of thermal analysis**. Blackwell, Oxford, UK, 2008.
- BRONGERSMA, Mark L.; HALAS, Naomi J.; NORDLANDER, Peter. Plasmon-induced hot carrier science and technology. **Nature nanotechnology**, v. 10, n. 1, p. 25-34, 2015.
- Câncer de pele. Ministério da Saúde, Brasília. Assuntos. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/cancer-de-pele>>. Acesso em: 11 de mar. de 2023
- Câncer de pele. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DEMARTOLOGIA, Rio de Janeiro, 3 de dez. de 2018. Doenças. Disponível em: <<https://www.sbd.org.br/doencas/cancer-da-pele/>>. Acesso em: 10 de mar. de 2023.
- CHEN, Jinxing, et al. Plasmonic nanostructures for photothermal conversion. **Small Science**, v. 1, n. 2, p. 2000055, 2021.
- CHIRICO, Giuseppe; BORZENKOV, Mykola; PALLAVICINI, Piersandro. **Gold nanostars: synthesis, properties and biomedical application**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2015.
- COSTA JÚNIOR, Antônio Eufrázio da. **Nano-híbridos baseados em complexos de ftalocianina derivados do cardanol, óxido de grafeno e magnetita**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química, Fortaleza, 2017.
- COZZOLINO, Silvia M. Franciscato. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Editora Manole, 2015.
- DE ABERASTURI, Dorleta Jimenez; SERRANO-MONTES, Ana Belén; LIZ-MARZÁN, Luis M. Modern applications of plasmonic nanoparticles: from energy to health. **Advanced Optical Materials**, v. 3, n. 5, p. 602-617, 2015.

DE SOUZA, Thiane Depra et al. Evaluation of photodynamic activity, photostability and in vitro drug release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 88-98, 2016.

DIMIEV, Ayrat M.; EIGLER, Siegfried (Ed.). **Graphene oxide: fundamentals and applications**. John Wiley & Sons, 2016.

DIMIEV, Ayrat M.; SHUKHINA, Ksenia; KHANNANOV, Artur. Mechanism of the graphene oxide formation: The role of water, “reversibility” of the oxidation, and mobility of the C–O bonds. **Carbon**, v. 166, p. 1-14, 2020.

DOLMANS, Dennis EJGJ; FUKUMURA, Dai; JAIN, Rakesh K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380-387, 2003.

FADEL, Maha; KASSAB, Kawser; ABDEL FADEEL, Doa. Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. **Lasers in medical science**, v. 25, p. 283-292, 2010.

FENG, Lingyan et al. A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2930-2937, 2011.

GADELHA, Andreij de Carvalho. Elementos de espectroscopia Raman em grafeno. 2013.

GELBAND, Hellen et al. Costs, affordability, and feasibility of an essential package of cancer control interventions in low-income and middle-income countries: key messages from Disease Control Priorities. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2133-2144, 2016.

GOLLAVELLI, Ganesh; LING, Yong-Chien. Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe. **Biomaterials**, v. 33, n. 8, p. 2532-2545, 2012.

HUMMERS JR, William S.; OFFEMAN, Richard E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the american chemical society**, v. 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958.

Harris, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro (RJ): Ltc, 2005.

HERMANSON, Greg T. **Bioconjugate techniques**. Academic press, 2013.

HU, Chaofan et al. Fabrication of a graphene oxide–gold nanorod hybrid material by electrostatic self-assembly for surface-enhanced Raman scattering. **Carbon**, v. 51, p. 255-264, 2013.

HUANG, Xiaohua et al. Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use of immunotargeted gold nanoparticles. **Photochemistry and photobiology**, v. 82, n. 2, p. 412-417, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), Estimativa 2023 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2022.

JACOB, V. P. **Estudo da influência da idade dos fibroblastos em cultura na resposta ao 17 β -estradiol. 73f.** Dissertação de Mestrado – Universidade da Beira Interior (Ciências da Saúde) – 2011.

KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R. Phthalocyanines: properties and materials. **The porphyrin handbook**. 17 ed. San Diego: Editora Academic Press, 2017.

KALBACOVA, Marie et al. Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. **Carbon**, v. 48, n. 15, p. 4323-4329, 2010.

KANG, Jong Hun et al. Hidden second oxidation step of Hummers method. **Chemistry of Materials**, v. 28, n. 3, p. 756-764, 2016.

KAROUSIS, N.; SANDANAYAKA, A.S.D.; HASOBE, T.; ECONOMOPOULOS, S.P.; SARANTOPOULOU, E.; TAGMATARCHIS, N. Zinc phthalocyanine-graphene hybrid material for energy conversion: Synthesis, characterization, photophysics, and photoelectrochemical cell preparation. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, p. 20564– 20573, 2012

KAROUSIS, Nikolaos et al. Zinc phthalocyanine–graphene hybrid material for energy conversion: synthesis, characterization, photophysics, and photoelectrochemical cell preparation. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 38, p. 20564-20573, 2012.

KHAN, Zaheer et al. Au (III)–CTAB reduction by ascorbic acid: Preparation and characterization of gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 11-17, 2013.

KLEIN, David. **Organic Chemistry**. Fourth edition. Hoboken, NJ: Wiley, (2021)

KONAN, Yvette Niamien; GURNY, Robert; ALLÉMANN, Eric. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KUMAR, A.; DIXIT, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**, p. 44–58, 2017

KUMAR, Rahul et al. Determination of the Aspect-ratio Distribution of Gold Nanorods in a Colloidal Solution using UV-visible absorption spectroscopy. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17469, 2019.

LEMOS, R. C. **Testes de citotoxicidade in vitro no controle da qualidade de biomateriais empregados em luvas utilizadas por profissionais da FIOCRUZ. 119f.** Dissertação de Mestrado – Programa de PósGraduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz – 2018.

LERF, Anton. Graphite oxide story—from the beginning till the graphene hype. **Graphene Oxide: Fundamentals and Applications**, p. 1-35, 2016.

LI, Li; LU, Hongmei; DENG, Liu. A sensitive NADH and ethanol biosensor based on graphene–Au nanorods nanocomposites. **Talanta**, v. 113, p. 1-6, 2013.

MALISKA, Ana Maria. Microscopia eletrônica de varredura. **Florianópolis: Laboratório de Caracterização Microestrutural e Análise de Imagens. Universidade Federal de Santa Catarina**, 2005.

MARANGONI, Valeria S.; CANCINO-BERNARDI, Juliana; ZUCOLOTTI, Valtencir. Synthesis, physico-chemical properties, and biomedical applications of gold nanorods—a review. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1136-1158, 2016.

MARCANO, Daniela C. et al. Improved synthesis of graphene oxide. **ACS nano**, v. 4, n. 8, p. 4806-4814, 2010.

MARCHETTI, Claudia et al. Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review. **OncoTargets and therapy**, p. 1223-1236, 2014.

MEDINA, Wanessa SG et al. Nanocarriers to deliver photosensitizers in topical photodynamic therapy and photodiagnosics. **Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care**, p. 287-310, 2011.

MEHTALA, Jonathan G. et al. Citrate-stabilized gold nanorods. **Langmuir**, v. 30, n. 46, p. 13727-13730, 2014.

MILGROM, Lionel R.; SMITH, Richard A. The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds. **Journal of Chemical Education**, v. 75, n. 4, p. 420, 1998.

MOORES, Audrey; GOETTMANN, Frederic. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. **New Journal of Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 1121-1132, 2006.

NEGRI, Laísa Bonafim. **Complexo de rutênio-ftalocianina como fotosensibilizadores para terapia fotodíâmina. Aspectos fotoquímicos e fotobiológicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

NICOMEDES, Daniel Nilson. Deposição e caracterização de revestimentos de hidroxiapatita com incorporação de óxido de grafeno. 2017.

NOROUZI, Hasan; KHOSHGARD, Karim; AKBARZADEH, Fatemeh. In vitro outlook of gold nanoparticles in photo-thermal therapy: a literature review. **Lasers in medical science**, v. 33, p. 917-926, 2018.

NOVOSELOV, Kostya S. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. **science**, v. 306, n. 5696, p. 666-669, 2004.

OLIVEIRA, Morgana; POLETTI, Matheus; SEVERO, Tiago Cassol. Rota química para produção de óxido de grafeno a partir de oxidação do grafite comercial. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, v. 3, n. 6, p. 16-20, 2018.

ORÉFICE, Rodrigo Lambert; PEREIRA, Marivalda de Magalhães; MANSUR, Herman Sander. Biomateriais: fundamentos e aplicações. In: **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. 2006. p. 538-538.

ORENDORFF, Christopher J.; MURPHY, Catherine J. Quantitation of metal content in the silver-assisted growth of gold nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 9, p. 3990-3994, 2006.

PAIVA, Juliana Moreno de. **Nanoestruturas de óxido de grafeno magnético: modificação e funcionalização de superfície para terapia fotodinâmica e fototérmica**. 2017.

PETRYAYEVA, Eleonora; KRULL, Ulrich J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. **Analytica chimica acta**, v. 706, n. 1, p. 8-24, 2011.

QIN, X. C. et al. Folic acid-conjugated graphene oxide for cancer targeted chemophotothermal therapy. **Journal of photochemistry and photobiology B: Biology**, v. 120, p. 156-162, 2013.

RIOUX, David; MEUNIER, Michel. Seeded growth synthesis of composition and size-controlled gold–silver alloy nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 23, p. 13160-13168, 2015.

SAKAMOTO, K.; OKUMURA, E. O. Syntheses and functional properties of phthalocyanines. **Materials**, v. 2, p. 1127-1179, 2009.

SAMADIAN, H.; HOSSEINI-NAMI, S.; KAMRAVA, S. K.; GHAZNAVI, H.; SHAKERI-ZADEH, A. Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, [s. l.], v. 142, n. 11, p. 2217–2229, 2016.

SHARMA, Sulbha K.; CHIANG, Long Y.; HAMBLIN, Michael R. Photodynamic therapy with fullerenes in vivo: reality or a dream?. **Nanomedicine**, v. 6, n. 10, p. 1813-1825, 2011.

SONG, Weina et al. Synthesis and nonlinear optical properties of reduced graphene oxide hybrid material covalently functionalized with zinc phthalocyanine. **Carbon**, v. 77, p. 1020-1030, 2014.

SOUZA, Reynaldo José Sant'Anna Pereira de et al. Estimativa do custo do tratamento do câncer de pele tipo não-melanoma no Estado de São Paulo-Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 657-662, 2011.

SPYRATOU, Ellas et al. Recent advances in cancer therapy based on dual mode gold nanoparticles. **Cancers**, v. 9, n. 12, p. 173, 2017.

SUN, Xiaoming et al. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. **Nano research**, v. 1, n. 3, p. 203-212, 2008

TOMAZINI, Marília Vannuchi et al. Topical photodynamic therapy with zinc phthalocyanine: evaluation of fluorescence intensity, skin absorption, skin

histological and immunohistochemical changes in animal model. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 535-541, 2007.

TOREZAN, Luís; NIWA, Ane Beatriz Mautari; FESTA NETO, Cyro. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 445-459, 2009.

TRAN, Tuan Hiep et al. Development of a graphene oxide nanocarrier for dual-drug chemo-phototherapy to overcome drug resistance in cancer. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 51, p. 28647-28655, 2015.

VAN STRATEN, Demian et al. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. **Cancers**, v. 9, n. 2, p. 19, 2017.

VIGDERMAN, Leonid; KHANAL, Bishnu P.; ZUBAREV, Eugene R. Functional gold nanorods: synthesis, self-assembly, and sensing applications. **Advanced materials**, v. 24, n. 36, p. 4811-4841, 2012.

WALKER, Jearl; HALLIDAY, David; RESNICK, Robert. **Fundamentos de física: Vol. 4**. LTC, vol.4, cap 42, 6 ed., 2009.

WANG, Aijian, et al. Graphene-oxide-supported covalent organic polymers based on zinc phthalocyanine for efficient optical limiting and hydrogen evolution. **Journal of colloid and interface science**, v. 556, p. 159-171, 2019.

WILLETS, Katherine A.; VAN DUYNE, Richard P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, v. 58, p. 267-297, 2007.

WONG, Xin Yi et al. Integrating gold nanoclusters, folic acid and reduced graphene oxide for nanosensing of glutathione based on “turn-off” fluorescence. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 2375, 2021.

YANG, Jing-He et al. Cobalt phthalocyanine–graphene oxide nanocomposite: Complicated mutual electronic interaction. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 8, p. 3785-3788, 2013.

ZEDAN, Abdallah F. et al. Ultrasmall gold nanoparticles anchored to graphene and enhanced photothermal effects by laser irradiation of gold nanostructures in graphene oxide solutions. **ACS nano**, v. 7, n. 1, p. 627-636, 2013.