

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

EMERSON LEANDRO DA SILVA

**“SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PLATAFORMAS
FOTOSENSIBILIZADORAS HÍBRIDAS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA
EM MELANOMA USANDO INFRAVERMELHO PRÓXIMO”**

Bauru
2026

EMERSON LEANDRO DA SILVA

**"SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PLATAFORMAS
FOTOSSENSIBILIZADORAS HÍBRIDAS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA
EM MELANOMA USANDO INFRAVERMELHO PRÓXIMO"**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Área de Concentração Química dos Materiais. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marina Piacenti da Silva



Bauru
2026



Silva, Emerson Leandro.

Síntese, Caracterização e Otimização de
Plataformas Fotossensibilizadoras Híbridas para
Terapia Fotodinâmica em Melanoma Usando
Infravermelho Próximo / Emerson Leandro da Silva.
– Bauru, 2026
125 f. : il.

Tese (Doutorado)-Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru
Orientador: Marina Piacenti da Silva

1. Terapia fotodinâmica. 2. Óxido grafeno
funcionalizado. 3. NIR. 4. Melanoma.
I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de
Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ÉMERSON LEANDRO DA SILVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 06 de maio de 2026, às 13h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ÉMERSON LEANDRO DA SILVA, intitulada "'SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PLATAFORMAS FOTOSSENSIBILIZADORAS HÍBRIDAS PARA TERAPIA FOTODINÂMICA EM MELANOMAUSANDO ÍNFRASVERMELHO PRÓXIMO'". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof.^a Dr.^a MARINA PIACENTI DA SILVA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Física e Meteorologia / UNESP / Câmpus de Bauru - FC, Profa. Dra. ROSE MARIA CARLOS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Universidade Federal de São Carlos, Profa. Dra. CRISTINA PACHECO SOARES (Participação Virtual) do(a) Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento / Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP, Dra. SABRINA ALESSIO CAMACHO AOKI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biotecnologia / UNESP / Câmpus de Assis - FCLAs, Prof. Dr. DANIEL RINALDO (Participação Presencial) do(a) Departamento de Química / UNESP / Câmpus de Bauru - FC, Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO _____. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

documento assinado digitalmente
 MARINA PIACENTI DA SILVA
Data: 11/05/2026 15:52:26-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof.^a Dr.^a MARINA PIACENTI DA SILVA

À minha esposa e aos meus filhos, por serem meu alicerce nos momentos mais desafiadores desta jornada.

Agradeço pelo amor incondicional, pela paciência diante das ausências e pela compreensão silenciosa que sustentou cada etapa deste caminho. Vocês foram a motivação constante, a força nos dias difíceis e a razão maior para não desistir.

Esta conquista também é de vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Marina Piacenti da Silva, pela orientação, confiança, dedicação e valiosas contribuições ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campi de Bauru, Assis e Araraquara, pelo apoio na minha formação e pelo incentivo ao desenvolvimento intelectual, prático e analítico.

Aos alunos e professores do GFAMN da UNESP Bauru, pela convivência, colaboração e troca de conhecimentos ao longo desta jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da UNESP Bauru, pela estrutura e suporte acadêmico oferecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido na etapa final deste trabalho.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

Leandro-Silva, E. **Síntese, Caracterização e Otimização de Plataformas Fotossensibilizadoras Híbridas para Terapia Fotodinâmica em Melanoma Usando Infravermelho Próximo**. 2026. 125f. Tese (Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais)- UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2026.

RESUMO

O melanoma apresenta elevada agressividade biológica e limitações importantes para terapias fotoativadas, devido sobretudo à forte absorção da melanina na região do visível. Nesse contexto, a ativação no infravermelho próximo (NIR) constitui uma alternativa promissora, embora ainda limitada pela instabilidade fotofísica, agregação e baixa eficiência fotoquímica de muitos fotossensibilizadores. Diante disso, este trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar e avaliar plataformas híbridas baseadas em óxido de grafeno (GO) para aplicações em terapia fotodinâmica (PDT) e terapia fototérmica (PTT) sob irradiação em 808 nm. Inicialmente, foram obtidos híbridos GO-PS de primeira geração (HPG) com ácido fólico, riboflavina e ftalocianina de cobre, visando investigar o efeito da ancoragem molecular sobre as propriedades do GO. Em seguida, foi desenvolvido um sistema de segunda geração (HSG) a partir da modificação estrutural do GO por síntese hidrotermal assistida por micro-ondas, gerando o material mNGO, posteriormente funcionalizado com indocianina verde (ICG), originando o híbrido mNGO@ICG. A caracterização estrutural foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), difratograma de Raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), espectroscopia Raman, espectroscopia UV-Vis (ultravioleta-visível), fluorescência, potencial zeta (PZ) e ensaios fotoquímicos com a sonda DPBF, além de estudos fototérmicos e ensaios *in vitro* em células de melanoma A375. As análises estruturais mostraram a transformação progressiva do grafite em GO e, posteriormente, em um compósito funcionalizado (mNGO) com alterações morfológicas, defeitos estruturais e incorporação de fase magnética. Por Raman, observou-se aumento da razão I(D)/I(G) de 0,59 para o grafite, 1,07 para o GO, 1,18 para o NGO e 1,32 para o mNGO, indicando aumento progressivo da desordem estrutural. Por DRX, o desaparecimento do pico característico do GO e o surgimento de novos picos atribuídos à magnetita confirmaram a formação do compósito magnético. Os resultados de FT-IR, UV-Vis e fluorescência corroboraram a modificação da rede carbonácea, a formação de estados eletrônicos intermediários e a interação eficiente entre a matriz e a ICG. O PZ do mNGO em pH 6,8 foi de 11,57 ($\pm 2,1$) mV na diluição 1:100 e 17,15 ($\pm 5,7$) mV na diluição 1:1000, indicando estabilidade coloidal moderada e superfície positivamente carregada. Os HPG apresentaram modificações eletrônicas, porém desempenho limitado sob excitação NIR. Em contraste, o HSG, sistema mNGO@ICG, exibiu resposta fotoativa superior, com efeito batocrômico da ICG após ancoragem, maior estabilidade fotônica sob 808 nm, supressão parcial de fluorescência e geração de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) evidenciada pela degradação da sonda DPBF. Nos ensaios fototérmicos, sob a dose de luz igual a 200 mW.cm^{-2} e radiação em 808 nm, o híbrido apresentou resposta dependente da

concentração, atingindo uma variação térmica em torno de 9°C em 300 s e 2,50 mg/mL, com perfil térmico mais estável que nos componentes separados. Nos testes *in vitro*, sob a mesma dose de luz, observou-se redução inicial da viabilidade celular após irradiação, seguida de recuperação parcial em 24 h, indicando que a atividade biológica ainda depende da otimização de parâmetros como concentração, tempo de incubação e condições de irradiação. De forma integrada, os resultados demonstram que a eficiência do sistema não depende apenas da presença do PS, mas da interação entre a matriz modificada e a ICG. A estrutura do mNGO contribui para a estabilização fotofísica do corante e para a modulação dos processos de transferência de carga e dissipação de energia, enquanto a ICG desempenha papel central na absorção da radiação em 808 nm. Assim, o sistema mNGO@ICG configura-se como uma plataforma multifuncional promissora para aplicações combinadas em PDT/PTT.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica; Óxido grafeno funcionalizado; *NIR*; Melanoma.

LEANDRO-SILVA, E. **Synthesis, Characterization, and Optimization of Hybrid Photosensitizing Platforms for Photodynamic Therapy in Melanoma Using Near-Infrared Light**. 2026. 125 f. Doctoral thesis in Materials Science and Technology — São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Bauru, 2026.

ABSTRACT

Melanoma is a highly aggressive malignancy that presents major challenges for photoactivated therapies, primarily because of the strong absorption of visible light by melanin. In this context, near-infrared (NIR) activation represents a promising alternative, although its application remains limited by the photophysical instability, aggregation, and low photochemical efficiency of many photosensitizers. Therefore, this study aimed to synthesize, characterize, and evaluate graphene oxide (GO)-based hybrid platforms for photodynamic therapy (PDT) and photothermal therapy (PTT) under 808 nm irradiation. Initially, first-generation GO–photosensitizer hybrids (FGHs) containing folic acid, riboflavin, and copper phthalocyanine were prepared to investigate the effects of molecular anchoring on the physicochemical properties of GO. Subsequently, a second-generation system (SGH) was developed through the structural modification of GO via microwave-assisted hydrothermal synthesis, yielding mNGO, which was subsequently functionalized with indocyanine green (ICG) to produce the mNGO@ICG hybrid. Structural and physicochemical characterization was performed using scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, ultraviolet–visible (UV–Vis) spectroscopy, fluorescence spectroscopy, zeta potential measurements, and photochemical assays using 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) as a probe. Photothermal studies and in vitro assays using A375 melanoma cells were also conducted. Structural analyses revealed the progressive transformation of graphite into GO and subsequently into the functionalized mNGO composite, accompanied by morphological changes, the formation of structural defects, and the incorporation of a magnetic phase. Raman spectroscopy showed an increase in the I_{D/I_G} ratio from 0.59 for graphite to 1.07 for GO, 1.18 for NGO, and 1.32 for mNGO, indicating a progressive increase in structural disorder. XRD analysis showed the disappearance of the characteristic GO peak and the emergence of new diffraction peaks attributed to magnetite, confirming the formation of the magnetic composite. FTIR, UV–Vis, and fluorescence spectroscopy further supported the modification of the carbonaceous framework, the formation of intermediate electronic states, and the effective interaction between the mNGO matrix and ICG. At pH 6.8, the zeta potential of mNGO was 11.57 ± 2.1 mV at a 1:100 dilution and 17.15 ± 5.7 mV at a 1:1000 dilution, indicating moderate colloidal stability and a positively charged surface. Although the first-generation hybrids exhibited electronic modifications, their performance under NIR excitation was limited. In contrast, the second-generation mNGO@ICG system displayed superior photoactive behavior, including a bathochromic shift in ICG absorption following molecular anchoring, enhanced photostability under 808 nm irradiation, partial fluorescence quenching, and singlet oxygen (1O_2) generation, as demonstrated by DPBF degradation. In the photothermal assays, conducted under 808 nm

irradiation at an irradiance of $200 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, the hybrid exhibited a concentration-dependent response, reaching a temperature increase of approximately $9 \text{ }^{\circ}\text{C}$ after 300 s at a concentration of $2.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The hybrid also exhibited a more stable thermal profile than its individual components. In the in vitro experiments performed under the same irradiation conditions, an initial reduction in cell viability was observed after irradiation, followed by partial recovery after 24 h. These findings indicate that the biological response remains dependent on the optimization of parameters such as hybrid concentration, incubation time, and irradiation conditions. Overall, the results demonstrate that the efficiency of the system depends not only on the presence of the photosensitizer but also on the interactions established between the modified matrix and ICG. The mNGO structure contributes to the photophysical stabilization of the dye and modulates charge-transfer and energy-dissipation processes, whereas ICG plays a central role in the absorption of 808 nm radiation. Therefore, the mNGO@ICG system represents a promising multifunctional platform for combined PDT/PTT applications.

Keywords: Photodynamic therapy; Functionalized graphene oxide; *NIR*; Melanoma

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Melanoma Maligno. Fonte: Grupo Brasileiro de Melanoma (© 2021) ⁴⁰	6
Figura 2: Principais Características de um PS Eficiente (a) – Estrutura química do PS ftalocianina; (b) - Espectro de absorbância de octaetilporfirina apresentando uma banda de grande intensidade (Banda de Soret) e quatro bandas menores (bandas Q). Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2005) ⁵⁹	9
Figura 3: Resumo do Diagrama de Jablonski. Fonte: Modificado de Lovatto; Silva (2023) ⁶¹	10
Figura 4: Transição Eletrônica por Orbital Molecular. π e σ – Orbitais moleculares ligantes; π^* e σ^* – Orbitais moleculares anti-ligantes; n – elétrons livres (não ligantes). Fonte: Modificado de Glogauer; Akcelrud (2004) ⁶³	11
Figura 5 – Orbital Molecular e Transição Eletrônica do Oxigênio. Fonte: Adaptado de Gonçalves; Pinheiro (2010) ⁸¹	14
Figura 6 - Decaimento por Relaxação Vibracional Não Radioativa. Fonte: Próprio autor.....	15
Figura 7 – Penetração em Função do Comprimento de Onda. Fonte: Adaptado de Portilho (2023) ⁹³	17
Figura 8 – Exemplificação do Acoplamento GO-PS. Cromóforo: Molécula fotossensibilizante em luz visível. Fonte: Próprio autor.....	18
Figura 9 – Síntese do GO por Oxidação do Grafite. Fonte: Próprio autor	19
Figura 10 – Estrutura do Ácido Fólico. Fonte: Próprio autor.....	21
Figura 11 - Estrutura da Riboflavina. Fonte: Próprio autor	22
Figura 12 – Estrutura do Ácido Fólico. Fonte: Próprio autor.....	23
Figura 13 – Estrutura da Indocianina Verde. Fonte: Próprio autor.....	24
Figura 14 – Reação de Amidação via DCC e NHS. Fonte: Próprio autor.....	26
Figura 15 – Reação de Esterificação via DCC e NHS. Fonte: Próprio autor....	27
Figura 16 – Empilhamentos π - π de Núcleos Aromáticos Planos e Conjugados. Fonte: Próprio autor.....	28
Figura 17: Sistema de Agitação Mecânica para Adsorção e Obtenção do Híbrido mNGO@ICG. Fonte: Próprio autor	34

<i>Figura 18 – Equipamento Utilizado para Irradiação NIR. Fonte: Próprio autor.</i>	39
<i>Figura 19 – Representação das Estruturas das Possíveis. Interações Químicas entre GO com AF e RB (GO-AF). Reação de amidação e esterificação entre GO AF e RB. Fonte: Próprio autor</i>	42
<i>Figura 20 – Interação GO-PcCu Via Adsorção. Fonte: Próprio autor.</i>	44
<i>Figura 21 - Espectroscopia FT-IR das Amostras de GO, AF e GO-AF. Fonte: Próprio autor.</i>	45
<i>Figura 22 - Espectroscopia FT-IR das Amostras de GO, RB e GO-RB. Fonte: Próprio autor.</i>	46
<i>Figura 23 - Espectroscopia FT-IR das Amostras de GO, PcCu e GO-PcCu. Fonte: Próprio autor.</i>	48
<i>Figura 24 - Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Fluorescência do GO, AF e GO-AF. Fonte: Próprio autor.</i>	49
<i>Figura 25 - Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Fluorescência do GO, RB e GO-RB. Fonte: Próprio autor.</i>	51
<i>Figura 26 - Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Fluorescência do GO, PcCu e GO- PcCu. Fonte: Próprio autor</i>	52
<i>Figura 27 - Plataforma Estruturada de GO Modificada. Fonte: Próprio autor...</i>	55
<i>Figura 28 - Parâmetros de Síntese em Única Etapa do mNGO e NGO. Fonte: Próprio autor.</i>	58
<i>Figura 29 - Microscopia Eletrônica de Varredura do Grafite, GO e mNGO. 1: Grafite; 2: Óxido de Grafeno; 3 e 4: GO Funcionalizado com sais de Fe (mNGO). Fonte: Próprio autor.</i>	61
<i>Figura 30 - Demonstração da Resposta Magnética do Compósito mNGO na Presença de um Campo Magnético Externo (ímã). Fonte: Próprio autor</i>	63
<i>Figura 31 - Difrátogramas de Raios X do Graf, GO e mNGO. Graf: Grafite; GO: Oxido de Grafeno; mNGO: GO Funcionalizado (rota hidrotermal assistida). Fonte: Próprio autor.</i>	64
<i>Figura 32 - Espectroscopia Raman do Graf, GO, NGO e mNGO. Graf: Grafite; GO: Óxido de Grafeno; NGO: Funcionalização do óxido de grafeno sem os sais de Fe (rota hidrotermal assistida); mNGO: Funcionalização do óxido de grafeno com os sais de Fe (rota hidrotermal assistida). Fonte: Próprio autor</i>	66
<i>Figura 33 - Espectroscopia de Infravermelho do Graf, GO e mNGO. Graf: Grafite; GO: Oxido de Grafeno; mNGO: GO Funcionalizado (rota hidrotermal assistida). Fonte: Próprio autor.</i>	68

Figura 34 - UV-Vis (a) e Emissão de Fluorescência (b) do Graf, GO e mNGO. Fonte: Próprio autor.....71

Figura 35 - Potencial Zeta do Compósito mNGO. Potencial Zeta das diluições 1:100 e 1:1000 do GO modificado via reação hidrotermal assistida por micro-ondas. Fonte: Próprio autor.....73

Figura 36 - Ensaios de Estabilidade e Fotodegradação da ICG e mNGO@ICG (a) – Absorção do UV-VIS da ICG e DPBF; (b) - Degradação do DPBF na presença da ICG livre sob irradiação à 808 nm; (c) - Degradação do ICG sob irradiação à 808 nm na ausência do DPBF; (d) - Estabilidade fotoquímica da ICG@mNGO na ausência do DPBF. Fonte: Próprio autor.....75

Figura 37 - Atividade fotodinâmica e Estabilidade Fotônica do HSG mNGO@ICG Avaliada por Degradação do DPBF sob Irradiação NIR. (a) - Degradação da sonda DPBF sob excitação NIR na presença do mNGO@ICG; (b) – Efeito batocrômico após a conjugação do ICG ao mNGO; (c) Ausência da degradação da sonda DPBF no escuro na presença do mNGO@ICG; (d) Ausência da degradação da sonda DPBF na presença do mNGO. Fonte: Próprio autor.....78

Figura 38 - Ensaios de Fluorescência da ICG e mNGO@ICG. (a) – Espectro de fluorescência da ICG com excitações em 400, 710 e 778 nm, regiões com maiores intensidade de absorção da molécula; (b) – Espectro de fluorescência do mNGO@ICG com excitações em 280, 312, 790 e 808 nm, regiões com maiores intensidade de absorção do híbrido. Fonte: Próprio autor.....80

Figura 39: Viabilidade celular avaliada por MTT em dois tempos. (a) 0 h e (b) 24 h. A viabilidade do grupo controle (células não tratadas) é indicada como CC (controle positivo) e CM (controle negativo)83

Figura 40 - Curvas de Temperatura em Função do Tempo Usando: (a) mNGO; (b) ICG livre; (c) mNGO@ICG (d) Comparação das 3 concentração com possível melhor desempenho fototérmico do híbrido. Fonte: Próprio autor....84

LISTA DE ABREVIATÖES

AF – Ácido Fólico
ANSI - American National Standards Institute
IC – Conversão interna
ISC – Conversão intersistema
DCC - N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DPBF - 1,3-Diphenylisobenzofurano
FIR - Infravermelho distante
FT-IR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GO – Óxido de grafeno
GO-PS - Óxido de grafeno-fotossensibilizador
ICG – Indocianina verde
IR – Infravermelho
MIR - Infravermelho médio
mNGO – Óxido de grafeno funcionalizado com nanopartículas magnéticas
mNGO@ICG - Óxido de grafeno funcionalizado com nanopartículas magnéticas com Indocianina verde adsorvida
NGO – Óxido de grafeno funcionalizado sem nanopartículas magnéticas
NHS - N-hidroxisuccinimida
NIR – Infravermelho próximo
 $^3\text{O}_2$ – Oxigênio molecular (triplete)
 $^1\text{O}_2$ – Oxigênio singleto
PcCu – Ftalocianina de cobre
PDT – Terapia fotodinâmica
PS – Fotossensibilizador
PTT – Terapia fototérmica
PZ – Potencial Zeta
RB - Riboflavina
rGO – Óxido de grafeno reduzido
ROS – Espécies reativas de oxigênio
 S_0 – Estado singleto fundamental
 S_1 – Estado singleto excitado
 T_1 – Estado triplete
UV – Ultravioleta
UV-VIS – Ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	4
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3	REFERENCIAL TEÓRICO	5
3.1	MELANOMA	5
3.2	FOTOSENSIBILIZADORES (PSs).....	7
3.3	MECANISMOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT).....	9
3.4	TERAPIA FOTOTÉRMICA (PTT)	15
3.5	INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR).....	16
3.6	ÓXIDO DE GRAFENO (GO)	18
3.7	FOTOSENSIBILIZADORES – CROMÓFOROS.....	20
3.8	ANCORAGEM DE FOTOSENSIBILIZADORES AO ÓXIDO DE GRAFENO (GO-PS).....	25
4	MATERIAIS E METODOS	30
4.1	MATERIAIS.....	30
4.2	MÉTODOS.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	HÍBRIDOS HPG: CARACTERIZAÇÃO E DESEMPENHO FOTODINÂMICO	41
5.2	EVOLUÇÃO DA PLATAFORMA GO-PS PARA APLICAÇÕES EM PDT ATIVADA NO NIR.....	54
5.3	ESTUDO DA MUDANÇA ESTRUTURAL E SUPERFICIAL DO GO	55
5.4	ESTUDO DE ADSORÇÃO DO ICG NO mNGO (HSG)	59
5.5	HÍBRIDOS HSG: INTERPRETAÇÃO DAS CARACTERIZAÇÕES	60
5.6	HÍBRIDOS HPG: ESTUDOS DE DESEMPENHO FOTODINÂMICO.....	74
5.7	PROPOSTA DE MECANISMO FOTOFÍSICO E FOTOQUÍMICO DO SISTEMA mNGO@ICG	81
5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA <i>IN VITRO</i> DO COMPOSITO mNGO@ICG EM CÉLULAS DE MELANOMA	82
5.9	AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS FOTOTÉRMICOS EM DISPERSÃO AQUOSA	84
6	CONCLUSÃO	86
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença com alto potencial de risco de morte aos seres humanos e se tornará em breve uma das principais causas de morbidade e mortalidade por todo o mundo^{1,2}. Dentre as formas de câncer mais agressivas e letais pode-se destacar o melanoma que possui elevada capacidade de metástase em curto intervalo de tempo e resistência às terapias tradicionais^{3,4}. O melanoma se trata da deformação genética maligna dos melanócitos responsáveis pela síntese do pigmento melanina e sua incidência continua a aumentar globalmente. Apesar da raridade do tumor, menor que 4% em relação aos cânceres de pele, a mortalidade alcança 80% dos casos, representando um desafio para a saúde pública⁴⁻⁶.

Recentemente, tem-se observado um aumento significativo nos casos de melanoma maligno e as abordagens terapêuticas convencionais, como a quimioterapia e a excisão cirúrgica radical, têm se mostrado limitadas, com resultados clínicos subótimos e efeitos colaterais significativos^{1,4}. Dentre essas limitações, destaca-se a inespecificidade das drogas quimioterápicas, que afetam não apenas as células cancerígenas, mas também as células saudáveis, levando a efeitos adversos sistêmicos e, além disso, a remoção cirúrgica extensiva pode resultar em comprometimentos estéticos e funcionais⁴. Em contrapartida, esforços intensivos vêm sendo direcionados ao desenvolvimento de terapias alternativas menos invasivas e mais seletivas, visando minimizar os danos colaterais e melhorar a eficácia terapêutica no tratamento do melanoma maligno. Em vista disso, a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) emerge como uma abordagem terapêutica altamente promissora, atendendo aos critérios de seletividade e mínima invasividade^{1,4,7,8}.

A PDT utiliza a ativação de agentes fotossensibilizadores (PS, do inglês *photosensitizer*) específicos por meio de luz de um determinado comprimento de onda, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) como o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido ânions (O^{2-}), que induzem a morte seletiva das células tumorais, com danos mínimos aos tecidos saudáveis adjacentes⁹⁻¹⁴. Essa tecnologia, portanto, tem o potencial de superar as limitações das terapias convencionais, proporcionando uma alternativa eficaz no tratamento de melanomas malignos, com menor incidência de efeitos colaterais.

Diante desse cenário, diversos estudos concluíram que a PDT é extremamente eficiente no tratamento de vários tipos de cânceres em diversas localizações do corpo,

podendo sua aplicação ser tanto local como via sistêmica^{9,11,12,15}. Somando-se a isso, além dos cânceres, estudos apontam o uso da PDT no tratamento de várias doenças não oncológicas como a Leishmaniose cutânea¹⁶, doenças associadas a microrganismos patogênicos e resistentes a antimicrobianos convencionais¹⁷, diversos tratamentos da cavidade oral e odontológicas^{18,19}, tumores não malignos de pele e outras doenças dermatológicas²⁰. Os bons resultados e a possibilidade de diversas aplicações da PDT a tornou muito estudada em vários campos da ciência nos últimos anos.

Todavia, a aplicação da PDT no tratamento do melanoma enfrenta algumas limitações importantes. Entre essas, destaca-se a competição entre a melanina, o pigmento presente nas células de melanoma, e os PSs pela absorção de fótons na faixa espectral do ultravioleta (UV) e visível. Esse fenômeno reduz a eficácia da PDT, uma vez que a melanina absorve grande parte da energia luminosa que deveria ativar os PSs. Além disso, os mecanismos de defesa antioxidante das células tumorais, como a captura da energia do cromóforo fotoexcitado, dificultam a geração de ROS, essenciais para a destruição celular, o que limita ainda mais a eficácia do tratamento^{4,21}. Diante disso, como alternativas para superar essas barreiras, estudos recentes têm explorado o uso de materiais capazes de absorver luz na faixa do infravermelho próximo (NIR, do inglês *near infrared*), em comprimentos de onda superiores a 780 nm. Essa faixa de energia está fora da alta absorção da melanina, o que permite uma ativação mais eficiente dos PSs, e a luz NIR apresenta maior capacidade de penetração em tecidos profundos, oferecendo uma vantagem adicional para o tratamento de melanomas por PDT^{7,22}. Essas abordagens inovadoras ampliam o potencial da PDT, tornando-a uma ferramenta promissora para superar as limitações do tratamento de melanomas.

Atualmente, a nanotecnologia encontra-se em rápido desenvolvimento, com diversas aplicações emergentes no campo da medicina, abrangendo tanto diagnóstico quanto terapias^{7,21-24}. Entre os materiais micro e nanoestruturados de destaque está o óxido de grafeno (GO). Na sua forma oxidada, o grafeno apresenta alta solubilidade em água, uma grande área superficial, biocompatibilidade, atividade fotofísica e fototérmica e uma absorbância específica elevada na faixa do NIR^{25,26}. Além disso, o GO apresenta capacidade de transferir energia por fotoindução e de promover a transferência de cargas para moléculas adjacentes. Adicionalmente, pode atuar como matriz de suporte para PSs, os quais, quando conjugados ao GO, tendem a apresentar

maior estabilidade fotoquímica e fotofísica durante processos de geração de ROS, fundamentais para a destruição de células cancerígenas em aplicações de PDT^{7,25-27}.

Ademais, a estrutura do GO pode ser modificada por meio de estratégias como a dopagem heteroatômica e a incorporação de nanopartículas ou moléculas de ancoragem, permitindo o ajuste fino de suas propriedades eletrônicas, ópticas, magnéticas e de superfície²⁸. A dopagem com heteroátomos, como nitrogênio, enxofre ou boro, introduz defeitos controlados na rede carbonácea, alterando a densidade eletrônica e favorecendo interações com espécies bioativas^{28,29}. De forma complementar, a incorporação de nanopartículas ou a ancoragem de moléculas funcionais amplia a versatilidade do material, possibilitando aplicações multifuncionais, como direcionamento externo, resposta fototérmica aprimorada e integração sinérgica com PSs em sistemas avançados para PDT^{30,31}. Nesse contexto, a combinação entre PDT e o efeito fototérmico revela-se particularmente promissora, uma vez que parte da energia fotônica absorvida é dissipada na forma de calor por meio de processos de decaimento não radiativo. Esse fenômeno resulta em elevação localizada de temperatura, contribuindo para a indução de danos térmicos que potencializa a destruição de células cancerígenas por meio da terapia fototérmica (PTT, do inglês *photothermal therapy*)^{7,27,32,33}. Desse modo, cânceres superficiais, como o melanoma primário, podem ser potencialmente tratados por meio da PDT e PTT, utilizando irradiação na faixa do NIR em híbridos à base de GO associados a cromóforos orgânicos.

Embora diferentes plataformas à base de GO e PSs tenham sido investigadas para aplicações em PDT e PTT, ainda persistem lacunas relacionadas à obtenção de sistemas estáveis, ativáveis na região NIR e capazes de manter desempenho fotoquímico satisfatório frente às limitações impostas pelo melanoma. Em particular, a instabilidade fotofísica e fotoquímica de alguns PSs, a tendência à agregação em meio aquoso e a limitada compreensão dos efeitos da modificação estrutural do GO sobre os processos de transferência de energia, supressão de fluorescência e geração de ROS ainda restringem o avanço de plataformas híbridas mais eficientes. Além disso, são escassos os estudos que integram, em uma única plataforma, a modificação estrutural do GO, dopagem com nitrogênio, incorporação de fase magnética e ancoragem de PSs ou moléculas orgânicas fotossensíveis, com avaliação correlacionada entre propriedades estruturais, eletrônicas e fotodinâmicas voltadas especificamente ao tratamento do melanoma sob excitação NIR.

Portanto, este trabalho fundamenta-se na crescente demanda da ciência por desenvolver terapias mais eficazes, menos invasivas e com mínimos efeitos colaterais para o tratamento do melanoma, uma forma de câncer resistente às abordagens terapêuticas convencionais. Adicionalmente, busca-se avançar no desenvolvimento e na otimização de PSs híbridos promissores, que apresentem propriedades ideais para a PDT e sejam capazes de superar a resistência intrínseca do melanoma, explorando a luz na região do NIR, para alcançar resultados terapêuticos mais satisfatórios e inovadores.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é sintetizar e caracterizar PSs híbridos estruturados à base de GO, conjugados à cromóforos, que sejam capazes de produzir ROS por fotoindução de energia na faixa espectral do NIR. Além disso, busca-se avaliar o potencial de aplicação desses PSs híbridos em PDT e PTT por meio de testes *in vitro* em culturas de células de melanoma.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar o GO e promover sua modificação estrutural, incluindo estratégias de funcionalização e dopagem, bem como a ancoragem de cromóforos/fotossensibilizadores por meio de interações covalentes e não covalentes, visando a obtenção de sistemas híbridos estruturados e estáveis.
- b) Caracterizar estrutural, morfológica, química e fotofísicamente os sistemas híbridos GO–PS obtidos, empregando técnicas espectroscópicas e de caracterização adequadas, a fim de confirmar a funcionalização, as interações eletrônicas e o comportamento óptico dos materiais.
- c) Avaliar o desempenho fototérmico e fotoquímico dos sistemas híbridos sob irradiação na região do NIR, com ênfase na geração do $^1\text{O}_2$ e na eficiência de conversão fototérmica.
- d) Investigar o potencial de aplicação *in vitro* dos PSs híbridos em PDT e PTT, por meio de ensaios em culturas de células de melanoma, avaliando citotoxicidade, resposta à irradiação e efeitos terapêuticos associados.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 MELANOMA

O melanoma, um tipo agressivo de câncer de pele, foi descrito pela primeira vez como uma condição distinta no século XIX³⁴. Em 1806, o médico francês René Laënnec, reconhecido por suas contribuições à medicina moderna, incluindo a invenção do estetoscópio, relatou detalhadamente casos de melanoma e identificou a relação entre essas lesões pigmentadas da pele e sua tendência a metastatizar para outros órgãos, fornecendo uma base crucial para o entendimento subsequente da doença^{34,35}. Desde então, o melanoma tem sido objeto de extensas investigações científicas devido à sua alta letalidade quando diagnosticado tardiamente⁵.

O câncer melanoma representa cerca de 4% de todos os casos de câncer de pele diagnosticados anualmente, mas é responsável por mais de 75% das mortes devido à sua alta agressividade e potencial metastático^{5,6,34}. Aproximadamente, 232.100 casos de melanoma cutâneo são diagnosticados anualmente, com cerca de 55.500 mortes atribuídas a essa condição. Além disso, a taxa de incidência e mortalidade do melanoma cutâneo varia significativamente entre os países. Em 2012, a taxa de incidência ajustada por idade (segundo a população padrão mundial) do melanoma cutâneo foi de 0,2 por 100.000 pessoas-ano no sudeste asiático, e atingiu 7,7 por 100.000 pessoas-ano nas Américas. As taxas mais elevadas ocorreram na Nova Zelândia (35,8 por 100.000 pessoas-ano) e na Austrália (34,9 por 100.000 pessoas-ano). Na União Europeia, a incidência foi de 10,2 por 100.000 pessoas-ano, enquanto na América do Norte foi de 13,8 por 100.000 pessoas-ano. Desde a década de 1970, a incidência do melanoma cutâneo tem aumentado em populações predominantemente de pele clara³⁶.

A origem do tumor melanoma está diretamente relacionado ao comprometimento genético dos melanócitos, células produtoras de melanina localizadas na camada basal da epiderme^{2,5,6,21,34}. Em condições normais, os melanócitos regulam a produção de melanina em resposta à radiação UV, protegendo a pele contra danos ao DNA²¹. Contudo, a exposição excessiva à radiação UV, fatores genéticos e epigenéticos podem induzir mutações nos genes reguladores do ciclo celular, como o *BRAF* que codifica a proteína B-Raf, envolvida no crescimento celular, *NRAS* que codifica uma proteína envolvida na proliferação celular e o *CDKN2A* que é um gene que ajuda a proteger contra o câncer, como o melanoma e o câncer de

pâncreas^{2,5,6}. Estas mutações levam a uma proliferação descontrolada dos melanócitos, resultando em formação de tumores, como mostrado na Figura 1. Além disso, a capacidade invasiva do melanoma é atribuída à ativação de vias de sinalização como *MAPK* (proteína quinase ativada por mitógeno) que são um conjunto de proteínas que regulam vários processos celulares, como proliferação, diferenciação e morte, bem como a *PI3K-AKT* que regula processos como o crescimento, a proliferação, a migração e o metabolismo, promovendo o crescimento tumoral, resistência à apoptose e desencadeando metástases³⁷⁻³⁹.



Figura 1: Melanoma Maligno.
Fonte: Grupo Brasileiro de Melanoma (© 2021)⁴⁰

Nos últimos dez anos, o manejo do melanoma avançou significativamente devido ao desenvolvimento de terapias-alvo e imunoterapias. Entre os tratamentos mais relevantes estão:

- Inibidores dos genes BRAF e MAPK: Mutações no gene BRAF, presentes em aproximadamente 50% dos melanomas, foram alvo de drogas como Vemurafenibe e Dabrafenibe. Esses inibidores são frequentemente combinados com inibidores de MAPK, como Trametinibe, para superar resistência e prolongar a sobrevida dos pacientes^{41,42};
- Imunoterapias com inibidores de checkpoint imunológico: Medicamentos como Ipilimumabe (anti-CTLA-4), Nivolumabe e Pembrolizumabe (anti-PD-1)

que revolucionaram o tratamento do melanoma, estimulando a resposta imunológica contra as células tumorais^{43,44}. Estas terapias demonstraram aumentar significativamente a sobrevida dos pacientes, mesmo em casos de melanoma metastático;

- Terapias gênicas e vacinas terapêuticas: Abordagens como terapia com células T receptoras de antígeno quimérico (CAR-T)^{45,46} e vacinas personalizadas baseadas em neoantígenos estão em fase de investigação clínica, com resultados promissores na estimulação do sistema imunológico⁴⁷;
- Terapia de combinação: Estudos recentes mostraram que a combinação de imunoterapia com terapias-alvo oferece sinergismo terapêutico, maximizando os resultados clínicos^{48,49}.

Diante desse contexto, a PDT emerge como uma alternativa promissora para o tratamento do melanoma e estudos recentes destacam a sua eficácia em melanomas superficiais, devido à sua capacidade de preservar tecidos saudáveis circundantes^{4,8,50–52}. A PDT se baseia na administração de um PS seguido pela exposição à luz em comprimento de onda específico que induz a morte celular seletiva^{53,54}. Além disso, as combinações de PDT com agentes quimioterápicos ou imunoterápicos têm demonstrado aumentar a sensibilização das células tumorais⁵⁵.

Embora ainda seja necessário estudos adicionais para otimizar parâmetros como tipo de PS, dose de luz e estratégias para superar a resistência do melanoma, a PDT se destaca como uma abordagem inovadora, com grande potencial para redefinir o tratamento do melanoma em cenários clínicos futuros.

3.2 FOTOSSENSIBILIZADORES (PSs)

Um PS é uma substância capaz de absorver luz de uma determinada faixa do espectro eletromagnético e transferir a energia absorvida para moléculas próximas, gerando reações químicas. Essa transferência de energia pode levar à formação de ROS, como o $^1\text{O}_2$ ou radicais livres, conforme aprofundado mais adiante, que são altamente reativos e capazes de causar danos a células, moléculas ou materiais no ambiente em que estão presentes. Para serem eficazes, devem ter alta capacidade de absorção de luz, estabilidade química e física, eficiência na geração de ROS e baixa toxicidade na ausência de luz. Suas aplicações incluem diversos tratamentos

por PDT, fotocatálise em processos industriais, desinfecção de água e até na fabricação de materiais avançados^{9–14}.

A descoberta do primeiro PS ocorreu em 1900, quando o químico alemão Oscar Raab, trabalhando sob a supervisão de Hermann von Tappeiner, observou que um corante, a hematoporfirina, ao ser exposto à luz visível, provocava a morte de células microbianas. Esse foi um marco importante no entendimento do fenômeno da sensibilização por luz, que viria a ser descrito de maneira mais detalhada em 1904, quando von Tappeiner cunhou o termo "fotossensibilização". Essa descoberta abriu caminho para o desenvolvimento de aplicações científicas e médicas baseadas na interação entre a luz (energia eletromagnética), PSs e oxigênio, posteriormente chamada de PDT^{56–58}.

Uma das principais características estruturais que define um PS eficiente é a presença de um sistema π -conjugado extenso associado a sistemas aromáticos com ou sem heteroátomos integrados, como mostrado na Figura 2(a). Essa rede de ligações duplas alternadas e conjugadas em uma estrutura plana permite uma forte absorção de luz em regiões específicas do espectro eletromagnético, especialmente no UV, visível e no NIR. Essa absorção é essencial para que a molécula atinja estados eletrônicos excitados, fundamentais para sua funcionalidade. Além disso, um PS deve apresentar um alto coeficiente de absortividade molar, o que reflete sua capacidade de absorver luz de maneira eficiente em um comprimento de onda eletromagnética específico^{56–59}.

A estabilidade química e a fotoestabilidade são igualmente importantes, uma vez que o PS deve resistir à degradação durante os processos fotoquímicos e evitar o chamado fotobranqueamento. Para usos biológicos, ajustes na solubilidade em água, como a introdução de grupos polares, torna-se indispensável, permitindo maior biodisponibilidade. Além disso, uma separação energética adequada entre os estados excitados garante a eficiência na transferência de energia^{56,58,59}.

Cabe ressaltar, que esses compostos PSs também apresentam espectros UV-Vis característicos, diretamente relacionados ao seu sistema π -conjugado. Por exemplo, compostos porfirínicos possuem bandas intensas na região Soret ou banda B (~400 nm) e bandas Q (~500–700 nm), conforme apresentado na Figura 2(b), que são indicativas de sua estrutura eletrônica. Finalmente, o potencial redox da molécula deve ser cuidadosamente ajustado para promover reações específicas. Assim, o

sistema π -conjugado extenso é o coração químico-estrutural de um PS, determinando sua eficiência e viabilidade em diferentes aplicações⁵⁹.

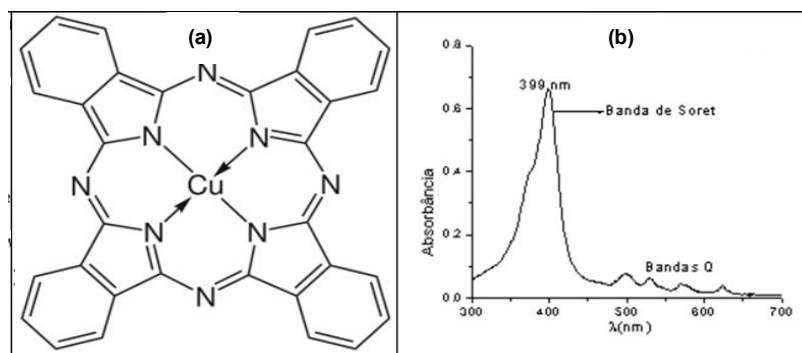


Figura 2: Principais Características de um PS Eficiente (a) – Estrutura química do PS ftalocianina; (b) - Espectro de absorvância de octaetilporfirina apresentando uma banda de grande intensidade (Banda de Soret) e quatro bandas menores (bandas Q).
Fonte: Adaptado de Ribeiro et al. (2005)⁵⁹

Diante disso, as propriedades estruturais dos PSs, como o sistema π -conjugado extenso e o alto coeficiente de extinção ou absortividade molar, são essenciais para a absorção eficiente de luz e geração de ROS. A estabilidade química e a possibilidade de ajuste na solubilidade garantem eficácia e seletividade para o uso em PDT sendo uma abordagem promissora e segura para combater câncer como o melanoma, além de outras doenças.

3.3 MECANISMOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)

A PDT, como se sabe, é uma técnica que combina luz, um PS e oxigênio molecular para induzir efeitos terapêuticos em tecidos específicos, sendo amplamente utilizada no tratamento de câncer, doenças infecciosas e algumas condições dermatológicas. No núcleo desse processo, a interação luz-matéria desempenha um papel fundamental, envolvendo mecanismos físicos e químicos que culminam na geração de ROS, responsáveis pelos efeitos terapêuticos⁵⁹.

3.3.1 Mecanismos Físicos da PDT

A PDT inicia-se com a absorção de luz por uma molécula fotossensibilizadora, que possui um sistema π -conjugado extenso, permitindo transições eletrônicas eficientes. Quando irradiada com luz de comprimento de onda apropriado, geralmente na região do visível ou NIR (780–980 nm)⁶⁰, a molécula em seu estado singlete fundamental (S_0) é excitada para um estado eletrônico de maior energia, o estado

singleto excitado (S_1)⁶¹, nessa transição não ocorre a inversão de *spin* eletrônico, ou seja, estados eletrônicos de mesma multiplicidade de *spins*, que é uma transição denominada permitida, conforme mostrado na Figura 3.

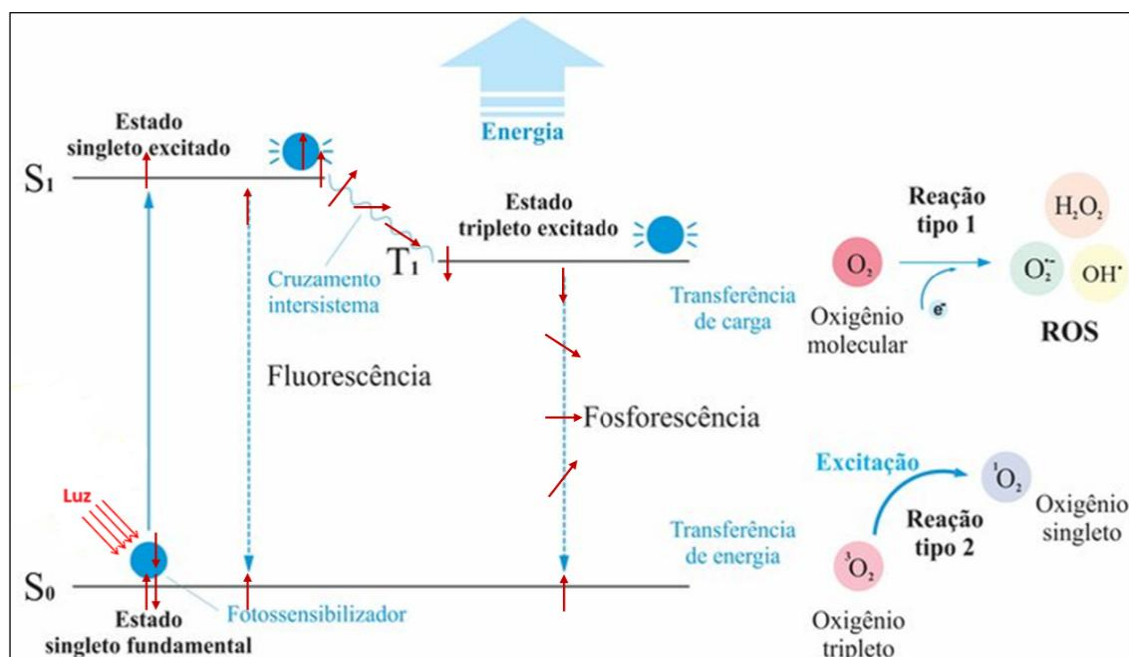


Figura 3: Resumo do Diagrama de Jablonski. **Fonte:** Modificado de Lovatto; Silva (2023)⁶¹

Posteriormente, a partir do estado excitado S_1 , o elétron excitado pode sofrer o decaimento radioativo de fluorescência ou realiza o cruzamento intersistema (ISC) para o estado tripleto (T_1), esse é um processo não radioativo e de vida mais longa. Vale ressaltar que nessa transição ocorre a inversão de *spin* (multiplicidade de *spin* diferente) que é uma transição denominada proibida (Figura 3)^{54,57–59,61}.

Na sequência, o elétron no estado excitado T_1 , ao invés de sofrer o decaimento radioativo de fosforescência (fenômeno de longa duração devido a reversão do *spin*), segue para dois mecanismos principais não radioativos: Mecanismo ou reação tipo I (transferência de elétron), no qual o PS em estado T_1 transfere elétrons diretamente para moléculas próximas, gerando ROS, como os radicais livres e peróxido^{53,54}. Essas espécies causam danos oxidativos às estruturas celulares próximas. Já no mecanismo ou reação tipo II (transferência de energia), o PS transfere energia diretamente ao oxigênio molecular, por natureza tripleto (3O_2), que é um estado paramagnético com dois elétrons desemparelhados, excitando-o para o estado singleto (1O_2), (Figura 3). Este último estado do oxigênio é altamente reativo e pode

oxidar lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, levando à disfunção celular e morte por necrose ou apoptose^{8,19,22,25,51,54,61}.

3.3.2 Mecanismos Químicos da PDT

Para compreender o mecanismo químico da PDT é necessário reconhecer que o agente PS é uma molécula complexa, e não um átomo isolado, sendo assim, justifica uma análise detalhada baseada em orbitais moleculares ao invés de orbitais atômicos. Diferentemente dos átomos, as moléculas possuem orbitais moleculares formados pela combinação de orbitais atômicos de seus constituintes, resultando em níveis de energia mais complexos e ajustáveis⁵⁸. Essa abordagem é essencial para entender como os PSs interagem com a luz, bem como os processos de absorção de energia e excitação eletrônica que depende diretamente da diferença energética entre o orbital molecular mais ocupado (HOMO, do inglês highest occupied molecular orbital) e o menos ocupado (LUMO, do inglês lowest unoccupied molecular orbital)^{58,59}, representados pela Figura 4. Além disso, transições eletrônicas específicas, como $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$, são características de sistemas moleculares e, as duas últimas desempenham papel fundamental na eficiência do PS, influenciando sua capacidade de gerar ROS e de realizar as reações químicas desejadas na PDT^{60–63}. Portanto, a análise por orbitais moleculares também é indispensável para compreender os mecanismos dessa terapia.

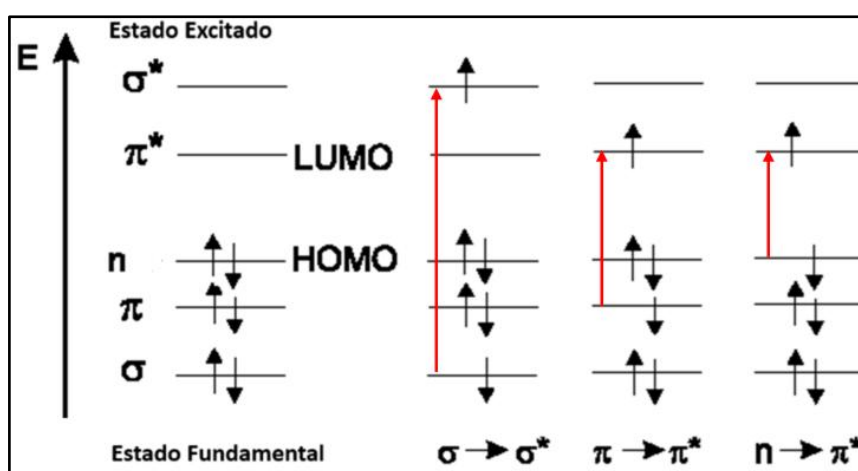


Figura 4: Transição Eletrônica por Orbital Molecular. π e σ – Orbitais moleculares ligantes; π^ e σ^* – Orbitais moleculares anti-ligantes; n – elétrons livres (não ligantes). Fonte: Modificado de Glogauer; Akcelrud (2004)⁶³*

Nesse sentido, os orbitais moleculares HOMO e LUMO do PS, determinam a energia necessária para a excitação eletrônica. Quando a luz incide sobre a superfície do PS, ela transfere essa energia para as moléculas desse composto e, se a energia da luminosa ($E=h\nu$) for equivalente à diferença de energia entre o orbital molecular HOMO e o LUMO, ocorre a absorção dessa energia pelo elétron que é promovido do HOMO para o LUMO, elevando a molécula para um estado de maior energia, o estado excitado^{62,64-67}. Essa transição eletrônica inicial é o ponto de partida para os processos químicos e físicos subsequentes na PDT, como já mencionado anteriormente⁶⁸⁻⁷¹.

Ainda na Figura 4, pode-se observar os diferentes tipos de transições eletrônicas que dependem da estrutura molecular do PS⁶⁵⁻⁶⁷. As transições $\pi \rightarrow \pi^*$, ocorrem em moléculas com sistemas π -conjugados extensos, comuns em PSs orgânicos que possuem sistemas aromáticos^{65,67}. Esses sistemas conjugados extensos reduzem a energia entre o HOMO e LUMO, pois a distância entre eles é menor, permitindo a absorção de luz em comprimentos de onda mais longos, ou seja, comprimentos de onda de menor energia, como no visível e NIR. As transições $n \rightarrow \pi^*$, com distância entre os estados ainda menor, envolvem elétrons não ligantes (pares isolados ou elétrons livres) de heteroátomos como oxigênio, nitrogênio ou enxofre, sendo menos intensas, mas ainda relevantes em determinados PSs^{66,67}. Já a transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$ são comuns em moléculas saturadas, como alcanos, e necessitam de energia relativamente alta como UV para excitação do elétron, pois a distância entre os estados é maior, além disso, nos PSs, os elétrons do orbital σ estão envolvidos nas ligações intramoleculares mais fortes e raramente desempenham um papel significativo em PDT⁶⁵⁻⁶⁷.

Da mesma forma que nos mecanismos físicos da PDT, os elétrons do PS no estado fundamental, localizados neste contexto nos orbitais ligantes (π) e não ligantes (n) do HOMO, são excitados pela radiação eletromagnética⁶⁸. Após a excitação, sofrem a transição eletrônica para os orbitais antiligantes (π^*), localizados no LUMO que, em seguida, passa pelo processo de ISC para o estado T1 que precede as reações químicas que promovem a geração de ROS, como relatado no diagrama de Jablonski (Figura 3). Como já mencionado, o mecanismo ou reação tipo I, interage diretamente com moléculas vizinhas transferindo elétrons, contudo, pela teoria dos orbitais moleculares, o LUMO do PS pode aceitar elétron de uma molécula doadora

próxima, formando radicais livres^{72,73} e o HOMO, paralelamente, pode ceder elétron para moléculas receptoras, iniciando reações de oxidação que também formam radicais livres^{74,75}. Já no mecanismo ou reação Tipo II, o estado T1 transfere energia diretamente ao $^3\text{O}_2$, promovendo-o ao estado $^1\text{O}_2$. Nesse contexto, a transferência ocorre devido à sobreposição eficiente dos orbitais moleculares do PS no estado T1 com os orbitais moleculares do oxigênio $^3\text{O}_2$ ^{76,77}.

A sobreposição dos orbitais moleculares entre o estado T1 do PS e os orbitais do oxigênio $^3\text{O}_2$ é essencial para essa transferência de energia, pois o PS nesse estado possui orbitais com densidade eletrônica que podem se acoplar aos orbitais antiligantes do oxigênio, resultando em uma transferência de energia eficiente^{76,77}. A compatibilidade entre os estados de energia das duas espécies, juntamente com a sobreposição espacial adequada dos orbitais, permite que a energia seja transferida sem que haja uma troca de elétrons formal (redox), mas de uma maneira virtual, tornando o processo mais eficiente e controlado na geração do $^1\text{O}_2$, tal mecanismo é conhecido por transferência de energia de Dexter^{78,79}.

No que concerne a transferência de energia de Dexter, a distância entre as moléculas (PS e $^3\text{O}_2$) deve ser pequena, geralmente em torno de 1 a 10 Å⁷⁹. Já em relação a compatibilidade de energia, a densidade de estados de energia dos orbitais do PS no estado T1 deve corresponder à energia necessária para a transição de $^3\text{O}_2$ para $^1\text{O}_2$ (aproximadamente 94 kJ/mol ou 0,98 eV)⁸⁰. Além disso, esse tipo de transferência de energia ocorre em sistemas com estados de spin semelhantes e alinhados, ou seja, o estado T1 do PS e o $^3\text{O}_2$, facilitando a transferência de energia que resulta em um produto com spins pareados $^1\text{O}_2$, processo permitido, pois não envolve inversão de spin no contexto do sistema global^{78,79}. Na Figura 5, é ilustrado o comportamento dos elétrons do oxigênio nos orbitais moleculares no estado fundamental $^3\text{O}_2$ e ao receberem energia por meio do mecanismo de transferência de Dexter, resultando em sua transição para o estado $^1\text{O}_2$ mais reativo.

Na PDT, a transferência de energia de Dexter é o principal mecanismo responsável pela geração de $^1\text{O}_2$ ⁷⁹. Porém, apesar das distinções entre os mecanismos de tipo I e tipo II, ambos são importantes na ação de danos seletivos às células-alvo. Nesse contexto, a escolha do PS é um fator crucial, pois ele deve ser capaz, quando excitado, de absorver eficientemente energia eletromagnética e desencadear as reações químicas e físicas necessárias para a produção de ROS.

Além disso, o PS deve apresentar alta afinidade pelos tecidos-alvo, assegurando eficiência, proximidade e seletividade no processo terapêutico.

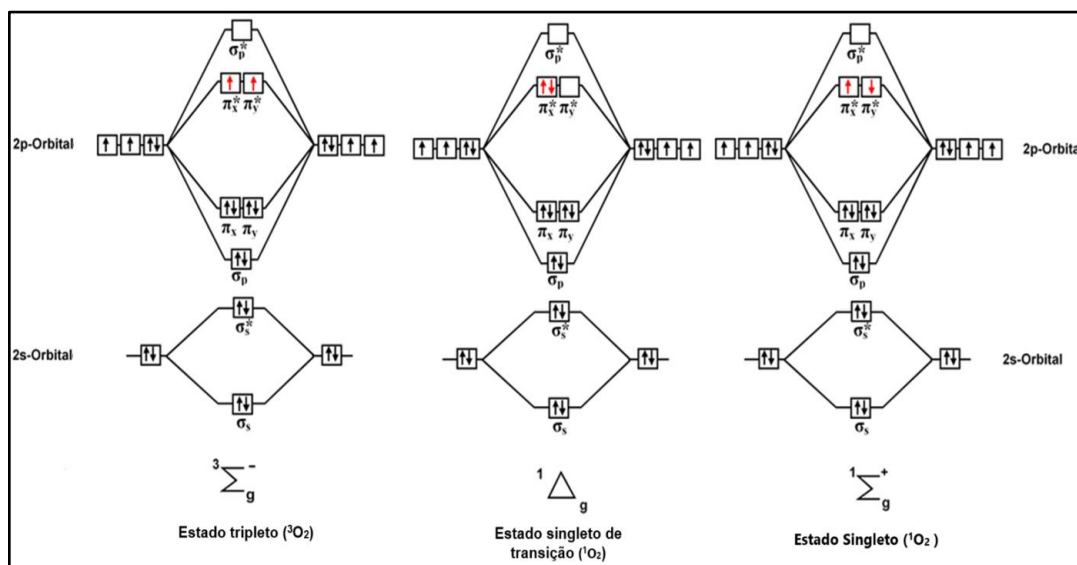


Figura 5 – Orbital Molecular e Transição Eletrônica do Oxigênio. Fonte: Adaptado de Gonçalves; Pinheiro (2010)⁸¹

Entretanto, a PDT enfrenta alguns desafios importantes para o tratamento do câncer, como a dependência de oxigênio molecular nos tecidos, que pode ser limitado em tumores hipóxicos⁸², e a restrição na profundidade de penetração da luz⁸³. Além disso, a presença de cromóforos biológicos, como a melanina, representa uma barreira significativa, especialmente no melanoma. A melanina, ao atuar como um filtro natural para a luz visível, absorve grande parte da radiação incidente, competindo com o PS e reduzindo sua eficácia terapêutica⁸⁴. Diante disso, para contornar essas limitações, a utilização de luz na região do NIR tem sido explorada, devido à sua maior capacidade de penetração nos tecidos e menor absorção pela melanina nessa faixa espectral⁸⁵. Somando-se a isso, abordagens complementares, como a PTT, surgem como alternativas promissoras para superar a barreira imposta pelas condições hipóxicas, pois esse mecanismo não depende da geração de ROS, mas sim da conversão de luz em calor que promove aquecimento local e, conseqüentemente, a vasodilatação, a qual aumenta a irrigação sanguínea e o suprimento de oxigênio molecular⁸⁶. Essa integração entre PDT e PTT amplia o arsenal terapêutico para o tratamento do melanoma e outros tumores, permitindo maior eficiência e flexibilidade no combate a essas patologias.

3.4 TERAPIA FOTOTÉRMICA (PTT)

A PTT é uma abordagem terapêutica que utiliza agentes fototérmicos para converter luz em calor, gerando um efeito térmico localizado capaz de destruir células-alvo, como as tumorais, ou tratar condições específicas. A técnica geralmente emprega luz no espectro do infravermelho próximo, que ativam agentes como nanopartículas de ouro, nanobastões, polímeros conjugados, projetados para absorver energia luminosa e transformá-la em calor^{87,88}.

O mecanismo da PTT baseia-se na absorção de energia luminosa, principalmente associada a transições eletrônicas nos agentes fototérmicos. Essas transições excitam elétrons para estados de energia mais elevados. Em seguida, o decaimento ocorre predominantemente por relaxação vibracional não radioativa, onde a energia absorvida é dissipada como calor em vez de ser reemitida como luz (fotoluminescência)⁸⁷⁻⁹⁰, conforme ilustrado na Figura 6.

A elevação localizada da temperatura promove alterações teciduais como aumento da irrigação sanguínea pela vasodilatação ou até mesmo morte celular seletiva, dependendo da intensidade e duração da aplicação⁸⁹. Essa capacidade de gerar calor a partir de processos fotofísicos faz da PTT uma ferramenta promissora em aplicações médicas como o tratamento de câncer, controle de infecções e regeneração tecidual, destacando-se pela seletividade e eficiência de sua ação^{87,88}.

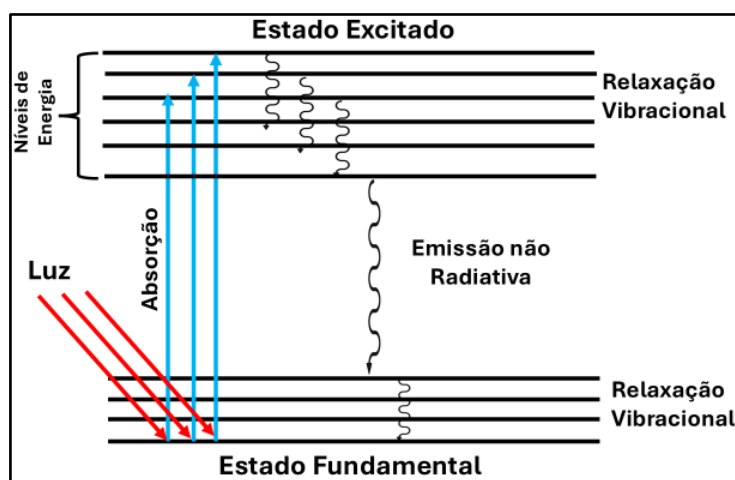


Figura 6 - Decaimento por Relaxação Vibracional Não Radioativa. Fonte: Próprio autor

Somando-se a isso, a utilização da PTT em sinergia com a PDT tem emergido como uma estratégia terapêutica promissora, especialmente em oncologia e

tratamentos antimicrobianos. A combinação dessas abordagens permite explorar os benefícios de ambos os mecanismos: a PDT induz efeitos citotóxicos precisos e seletivos, enquanto a PTT amplia a eficácia destrutiva através do aumento localizado da temperatura que pode melhorar a penetração de oxigênio no meio celular pela vasodilatação, aumentando desempenho dos PSs. Em particular, a integração da PDT e da PTT utilizando PS que absorvem luz no NIR oferece uma excelente abordagem para o tratamento de tumores profundos, hipóxicos ou ricos em melanina, como o melanoma. Essa combinação supera limitações individuais das terapias, permitindo ação dupla e complementar que maximiza a destruição celular seletiva e amplia o potencial terapêutico no combate a tumores⁸⁶.

3.5 INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

O infravermelho (IR) é uma radiação eletromagnética com comprimentos de onda entre 780 nm e 1.000 μm , sendo dividido em três bandas conforme a norma ISO 20473:2007⁹¹. A faixa do infravermelho próximo (NIR) vai de 780 nm a 3.000 nm, o infravermelho médio (MIR) de 3.000 nm a 50.000 nm, sendo a faixa entre 4.000 e 14.000 nm chamada de “raio de crescimento” por ser absorvida eficientemente por organismos vivos, promovendo seu crescimento. Por último, o infravermelho distante (FIR), ou “radiação biogenética”, cobre comprimentos de onda entre 50,0 μm e 1.000 μm ⁶⁰.

Na PDT, o NIR é eficaz devido à sua capacidade de penetrar profundamente nos tecidos quando comparado a radiação eletromagnética visível, conforme ilustrado na Figura 7. A luz NIR pode ativar o agente PS em camadas mais profundas da pele tornando o NIR ideal para PDT, permitindo tratamentos menos invasivos e mais eficazes^{1,26,32}. A faixa do NIR permitida para fins terapêuticos está entre 780 nm e 980 nm sob baixa potência (no máximo 350 mW/cm²) por tempo de 10 - 1.000 segundos, de acordo com a ANSI (American National Standards Institute)⁹², e é amplamente utilizada devido à sua baixa absorção pela água e hemoglobina, características que são cruciais para a eficiência do tratamento de doenças⁷.

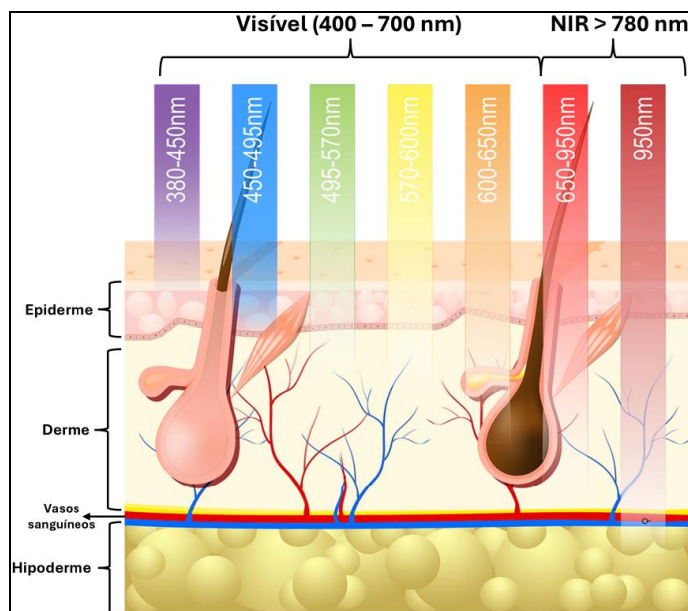


Figura 7 – Penetração em Função do Comprimento de Onda. Fonte: Adaptado de Portilho (2023)⁹³

O melanoma frequentemente apresenta resistência a terapias baseadas em luz visível, devido a mecanismos como a robusta defesa antioxidante, alterações mitocondriais que reduzem a apoptose, reparação eficiente de danos oxidativos, plasticidade tumoral e adaptações metabólicas, como o efeito Warburg^{94–96}. Nessa perspectiva, a PDT com PSs ativados no NIR se destaca, pois a luz NIR oferece maior penetração tecidual alcançando melanomas localizados em regiões profundas, além de minimizar a interferência da melanina, que absorve menos nesse espectro, permitindo maior eficácia^{1,97,98}. Além disso, como já dito, PSs ativados no NIR podem gerar ROS e reduzir as condições de hipoxia pelo mecanismo PTT. Portanto, a combinação da PDT e NIR podem potencializar ainda mais os resultados, destacando o NIR como uma estratégia eficiente para superar as limitações da PDT tradicional^{55,99}.

Diante desse cenário, fica evidente que PSs capazes de absorver luz na região do NIR, combinada com propriedades fotofísicas que permitam a geração de ROS e ainda permitir a elevação localizada da temperatura, oferecem grande potencial no tratamento de câncer^{100–102}, principalmente, o melanoma. E dentre os materiais promissores que podem contribuir com todos esses mecanismos, destacam-se os híbridos compostos por molécula fotossensibilizante conjugada (ancoradas) ao GO (GO-PS), conforme exemplificado na Figura 8.

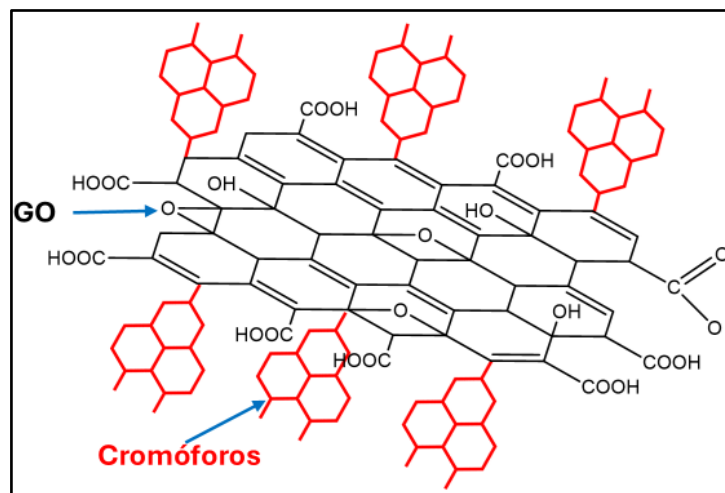


Figura 8 – Exemplificação do Acoplamento GO-PS. Cromóforo: Molécula fotossensibilizante em luz visível. Fonte: Próprio autor

Portanto, o GO com suas propriedades excepcionais de absorvidade em NIR, condutividade de energia e estabilidade estrutural, torna-se uma plataforma ideal para ancorar cromóforos fotossensibilizantes, tornando essa abordagem eficaz e inovadora no tratamento de melanoma.

3.6 ÓXIDO DE GRAFENO (GO)

O GO tem como precursor, o grafeno, uma forma bidimensional de carbono com espessura de um átomo, isolado pela primeira vez em 2004 por Geim e Novoselov, um marco significativo no campo da ciência dos materiais. Suas propriedades excepcionais, incluindo alta condutividade elétrica, mecânica e térmica, o tornam um material promissor para uma vasta gama de aplicações, como em dispositivos eletrônicos, sensores, baterias e supercapacitores¹⁰³. Desde então, a pesquisa sobre grafeno e seus derivados têm se expandido significativamente, com várias abordagens sendo desenvolvidas para sua produção em larga escala.

A produção de grafeno puro, embora extremamente desejável devido às suas propriedades ideais, é um desafio técnico, especialmente quando se trata de obter material com alta qualidade e em grandes quantidades. Por esta razão, os derivados de grafeno, como o GO e o óxido de grafeno reduzido (rGO), têm sido amplamente estudados e utilizados. O GO, particularmente, é produzido através da oxidação do grafite, processo que resulta na inserção de grupos funcionais oxigenados nas camadas de grafeno, como hidroxilas ($-OH$), epóxidos ($-O-$) e carboxilas ($-COOH$).

Os grupos oxigenados do GO proporcionam solubilidade, reatividade e interação com outras substâncias, tornando-o um material versátil. Sua capacidade de absorver energia eletromagnética deve-se à estrutura de grafeno funcionalizada com epóxidos, hidroxilas e carboxilas, que influenciam suas propriedades eletrônicas e químicas, favorecendo a interação com ondas eletromagnéticas^{104,105}.

O método clássico para a oxidação do grafite é o processo de Hummers, que utiliza permanganato de potássio (KMnO_4) como agente oxidante em meio com ácido sulfúrico (H_2SO_4). Esse processo permite a introdução eficiente de grupos oxigenados nas camadas de grafeno, transformando o grafite em GO¹⁰⁶, conforme mostrado na Figura 9. No entanto, a oxidação não é um processo simples, e uma compreensão detalhada das reações químicas envolvidas é essencial para melhorar a eficiência do processo e a qualidade do material final.

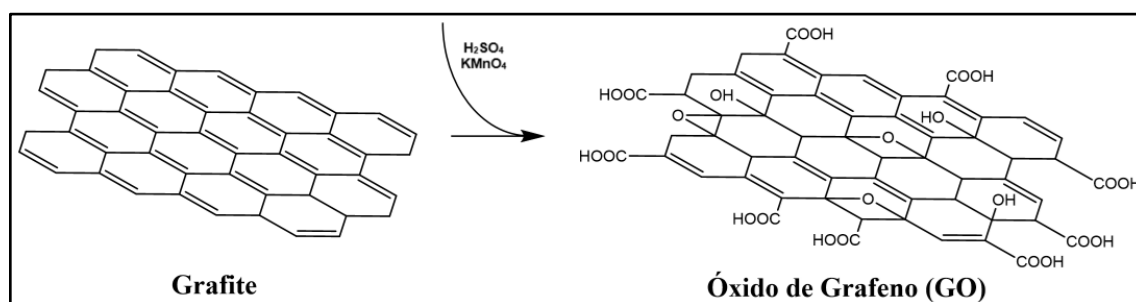


Figura 9 – Síntese do GO por Oxidação do Grafite. **Fonte:** Próprio autor

No espectro NIR, a absorção do óxido de grafeno (GO) é predominantemente atribuída a transições eletrônicas específicas, como $\pi \rightarrow \pi^*$, relacionadas às regiões conjugadas da estrutura residual do grafeno, e $n \rightarrow \pi^*$, associadas aos grupos oxigenados^{65,67}. Essas características conferem ao GO uma resposta eficiente nesta faixa espectral. Além disso, o material apresenta a capacidade de converter a energia absorvida em calor, resultado de excitações vibracionais e interações atômicas em sua estrutura, o que o torna particularmente promissor em aplicações fototérmicas¹⁰⁷. Essas propriedades reforçam seu potencial em diversas áreas tecnológicas e biomédicas^{107–109}.

Outra vantagem significativa do GO é sua flexibilidade química, que permite modificações em sua superfície para otimizar suas propriedades de absorção e interação com outros materiais. Essa característica possibilita sua incorporação em compósitos poliméricos ou híbridos, ampliando sua eficiência em diversas aplicações.

A combinação de propriedades excepcionais, baixo custo relativo e escalabilidade na produção posiciona o GO como uma escolha estratégica para o desenvolvimento de tecnologias que demandam materiais com alta eficiência de absorção na região do NIR¹¹⁰.

Diante disso, o GO pode atuar como uma matriz versátil para ancorar moléculas fotossensibilizantes, seja por interação química (ligações covalentes) ou física (interações π - π e/ou eletrostáticas), resultando em híbridos que potencializam a eficiência da PDT. Adicionalmente, a funcionalização do GO com PSs não apenas amplia a absorção de luz na região do NIR, mas também possibilita uma abordagem combinada de PDT e PTT, aumentando a eficácia terapêutica^{109,111–113}.

3.7 FOTOSSENSIBILIZADORES – CROMÓFOROS

As possibilidades de funcionalização do GO com moléculas orgânicas sensibilizadoras são diversas, como por exemplo os cromóforos ácido fólico (AF), riboflavina (RB), ftalocianina de cobre (PcCu) e a Indocianina verde (ICG). Esses materiais são compostos orgânicos com propriedades químicas e estruturais específicas, selecionados por sua compatibilidade com o GO e por suas funções fotossensibilizadoras.

3.7.1 Ácido fólico (AF)

O AF, também conhecido como vitamina B9, é um composto essencial ao organismo humano, desempenhando papel crucial na síntese de DNA, RNA e proteínas. Ele é particularmente importante em processos de crescimento celular e na formação de glóbulos vermelhos, além de ser fundamental para gestantes, devido ao seu papel na prevenção de defeitos do tubo neural em fetos¹¹⁴.

Quimicamente, o AF é composto por três partes principais: um anel pteridina, uma cadeia de ácido para-aminobenzoico e um grupo de ácido glutâmico. Ele apresenta fórmula molecular $C_{19}H_{19}N_7O_6$ e massa molar de 441,40 g/mol. Fisicamente, é um sólido amarelo, como mostrado na Figura 10, moderadamente solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos, sendo mais estável em meio neutro ou levemente ácido^{115–117}.

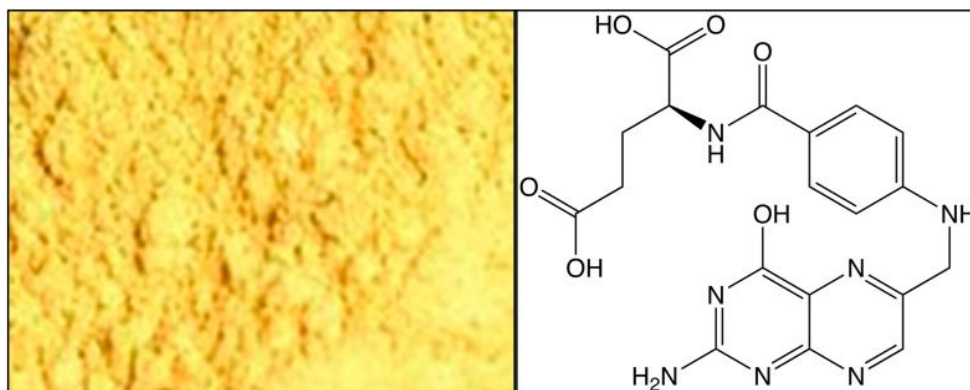


Figura 10 – Estrutura do Ácido Fólico. **Fonte:** Próprio autor

O AF possui espectro de absorção com picos característicos em torno de 280 - 380 nm, atribuídos ao anel pteridina. Essa capacidade de absorção de radiação UV está diretamente relacionada à sua estrutura aromática e é explorada em estudos biofísicos e bioquímicos¹¹⁸.

A conjugação do AF com materiais grafênicos, como o GO, é de grande interesse em áreas como PDT, pois o GO com suas propriedades únicas como alta área superficial, biocompatibilidade e capacidade de conjugação com biomoléculas, atua como transportador e amplificador de respostas fotodinâmicas. Quando acoplado ao AF pode ser direcionado seletivamente para células tumorais que expressam receptores de folato aumentando a eficiência terapêutica^{7,112}.

3.7.2 Riboflavina (RB)

A RB, também conhecida como vitamina B2, é uma vitamina hidrossolúvel essencial ao metabolismo humano. Ela desempenha papel central como precursora de coenzimas importantes, como o mononucleotídeo de flavina e o dinucleotídeo de flavina e adenina, que são cruciais para processos enzimáticos relacionados à produção de energia, como a respiração celular e a oxidação de nutrientes^{119,120}.

Quimicamente, a RB apresenta a fórmula molecular $C_{17}H_{20}N_4O_6$ e uma massa molar de 376,37 g/mol. Sua estrutura é composta por um núcleo isoaloxazina ligado a uma cadeia de ribitol. Fisicamente, é um sólido cristalino de coloração amarela, como mostrado na Figura 11, moderadamente solúvel em água, mas com maior solubilidade em meio alcalino^{119,120}. A RB é sensível à luz, degradando-se facilmente sob exposição prolongada, o que a torna fotolábil. As propriedades ópticas da riboflavina são picos de absorção característicos no espectro UV-Vis vão de 272 nm

a 447 nm, aproximadamente¹²¹. Esses picos estão associados ao núcleo isoaloxazina, que possui elevada capacidade de absorção de luz que, eventualmente, atua na produção de ROS^{122,123}.

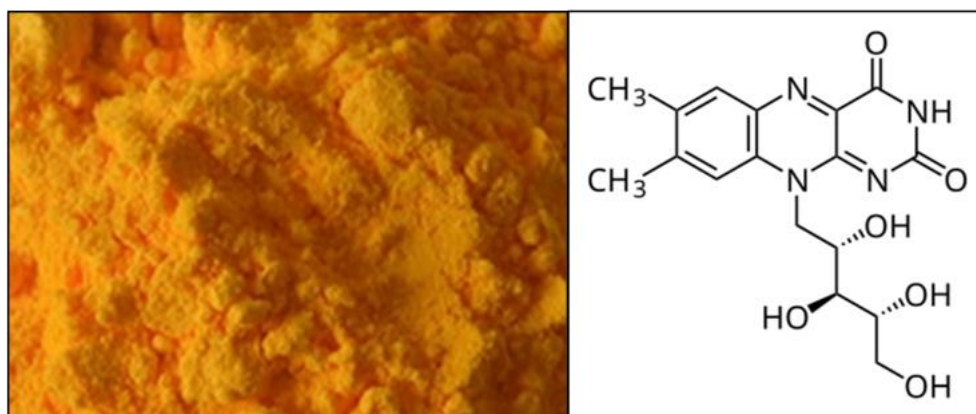


Figura 11 - Estrutura da Riboflavina. Fonte: Próprio autor

A conjugação da RB com materiais grafênicos, como o GO, tem despertado grande interesse em áreas como a PDT, pois o GO, com suas propriedades únicas, permitindo que a RB seja transportada e aplicada de forma mais eficiente melhorando a estabilidade e amplificando seus efeitos fotoquímicos^{109,112,124}. Assim, a RB, com sua capacidade de absorção de luz e geração de ROS, aliada às propriedades do GO, emerge como uma ferramenta promissora em terapias avançadas e outras aplicações na interface entre nanotecnologia e biomedicina.

3.7.3 Ftalocianina de Cobre (PcCu)

A CuPc é um composto orgânico metálico pertencente à classe das ftalocianinas, caracterizado por um núcleo aromático macrocíclico formado por anéis isoindólicos conjugados e coordenados a um íon de cobre (Cu) central. Este material é amplamente reconhecido por suas propriedades ópticas, eletrônicas e químicas únicas, tornando-se relevante em diversas aplicações tecnológicas e biomédicas^{125,126}.

Quimicamente, a PcCu apresenta a fórmula molecular $C_{32}H_{16}CuN_8$, massa molar igual a 576,08 g/mol e possui elevada estabilidade térmica e química, sendo resistente a altas temperaturas e à ação de ácidos e bases. Fisicamente, é um sólido cristalino de cor azul, como mostrado na Figura 12, com baixa solubilidade em água

e solubilidade variável em solventes orgânicos, dependendo das substituições funcionais em sua estrutura^{125,126}.



Figura 12 – Estrutura do Ácido Fólico. Fonte: Próprio autor

Em termos de propriedades ópticas, a CuPc é notável por sua intensa absorção na região do espectro visível, particularmente no intervalo de 600 a 700 nm, conhecida como banda Q. Este comportamento é atribuído à extensa conjugação π em sua estrutura macrocíclica, que também resulta em uma forte absorção na região do UV, na chamada banda de Soret. Essa capacidade de absorver luz visível a torna ideal como PS em aplicações de PDT^{126–128}.

A conjugação da PcCu com materiais grafênicos, como o GO, oferece novas possibilidades de aplicação. O GO, com sua elevada área superficial, biocompatibilidade e propriedades de transporte de carga, melhora a dispersibilidade e a biodisponibilidade da PcCu aumentando a eficácia terapêutica.

3.7.4 Indocianina Verde (ICG)

A ICG é um corante orgânico do tipo polimetino tricabocianina, amplamente utilizado em aplicações biomédicas, diagnósticas e terapêuticas, com destaque para imageamento por fluorescência no NIR. Trata-se de um composto aprovado para uso clínico, com propriedades ópticas singulares e elevada afinidade por proteínas plasmáticas, especialmente a albumina.

A ICG apresenta fórmula molecular $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$, massa molar aproximada de $775,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Estruturalmente, consiste em um sistema polimetínico conjugado com dois anéis heterocíclicos benzindólicos ligados por uma cadeia carbocianina,

contendo grupos sulfônicos responsáveis por sua solubilidade em meio aquoso e caráter aniônico^{129,130}, como mostrado na Figura 13.

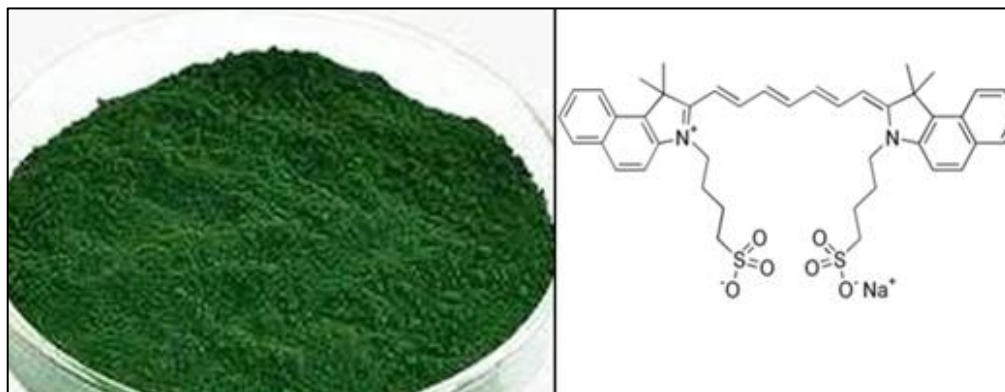


Figura 13 – Estrutura da Indocianina Verde. Fonte: Próprio autor

Do ponto de vista químico, a extensa conjugação π ao longo da cadeia polimetínica é responsável pela intensa absorção na região do NIR, enquanto a presença de heteroátomos (N e S) contribui para a estabilização eletrônica do estado excitado. A molécula apresenta carga negativa em pH fisiológico e forma complexos não covalentes com proteínas, comportamento descrito como pseudofluorogênico, uma vez que sua fluorescência é significativamente intensificada após ligação proteica.^{129,130}

Fisicamente, a ICG é um sólido verde-escuro, solúvel em água na concentração aproximada de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, porém apresenta baixa solubilidade direta em solução salina. As soluções aquosas de ICG apresentam pH levemente ácido ($\sim 6,0$) e estabilidade limitada, com degradação significativa após cerca de 8 horas, o que exige preparo imediato antes do uso experimental¹³¹. A instabilidade em solução está associada à agregação molecular, oxidação e fotodegradação, fatores críticos em aplicações terapêuticas e que justificam o encapsulamento ou ancoragem da ICG em matrizes estruturadas, como GO, nanopartículas magnéticas ou polímeros biocompatíveis, a fim de melhorar a sua estabilidade¹³¹.

Do ponto de vista fotofísico, a ICG apresenta um máximo de absorção (λ_{max}) em torno de 775 nm em meio aquoso, posicionando-se de forma ideal dentro da janela terapêutica do NIR (700–900 nm), região caracterizada por maior penetração tecidual e menor absorção por cromóforos endógenos. A molécula apresenta elevado coeficiente de absorção molar, com valores reportados em múltiplas regiões do UV-

Vis, reflexo da extensa conjugação eletrônica. Na região do visível-NIR, essa elevada absorvidade favorece processos de conversão eficiente da energia luminosa em estados excitados $^1\text{O}_2$ e $^3\text{O}_2$ ^{129,130}.

Esses processos são centrais para sua aplicação em PDT. No entanto, a fotoinstabilidade intrínseca, degradação progressiva sob irradiação contínua e a agregação das partículas moleculares limitam o uso da ICG em sua forma isolada. Tais limitações tem motivado o desenvolvimento de sistemas estruturados de suporte, capazes de aumentar sua estabilidade, modular a liberação de energia e ampliar sua eficiência terapêutica ^{132–134}.

Devido às suas propriedades químicas e fotofísicas, a ICG pode ser empregada como cromóforo funcional em compósitos, onde interações π - π , eletrostáticas e de coordenação permitem sua imobilização em superfícies como do GO e GO modificado. Essas estratégias resultam em aumento da estabilidade, maior rendimento fotodinâmico e melhor controle espacial da terapia, alinhando-se aos objetivos de plataformas multifuncionais para aplicações oncológicas ^{135,136}.

3.8 ANCORAGEM DE FOTONSENSIBILIZADORES AO ÓXIDO DE GRAFENO (GO-PS)

O GO é amplamente reconhecido como uma matriz versátil para a ancoragem de moléculas devido à sua estrutura funcionalizada e alta área superficial. Ele possibilita a formação de híbridos estáveis por meio de diferentes tipos de interações, que podem ser químicas ou físicas, dependendo da natureza do molécula de ancoragem e da aplicação desejada ¹³⁷.

3.8.1 Rota de Ancoragem GO-PS por Interações Químicas

Por meio de interações químicas, o GO permite covalentemente a funcionalização dessa plataforma por moléculas orgânicas, especialmente aquelas contendo grupos aminos, como AF. O acoplamento covalente com aminas é particularmente eficaz e amplamente utilizado devido à reatividade dos grupos carboxílicos presentes no GO, que podem ser quimicamente ativados para formar ligações estáveis, como amidas. Esse processo é comumente conduzido utilizando agentes de acoplamento, como DCC (N,N'-Diciclohexilcarbodiimida) e NHS (N-hidroxisuccinimida) ^{138,139}.

O procedimento típico começa com a ativação dos grupos carboxílicos do GO disperso em um solvente adequado para assegurar que os grupos carboxílicos estejam disponíveis para reagir. A adição de DCC ao sistema resulta na formação de um intermediário reativo, um éster de o-acilisoureira, que facilita a subsequente reação com o grupo amino, conforme mostrado na Figura 14. No entanto, como os ésteres de o-acilisoureira podem ser instáveis e levar a subprodutos indesejáveis, o uso de NHS é incorporado ao processo para melhorar a eficiência^{138,139}.

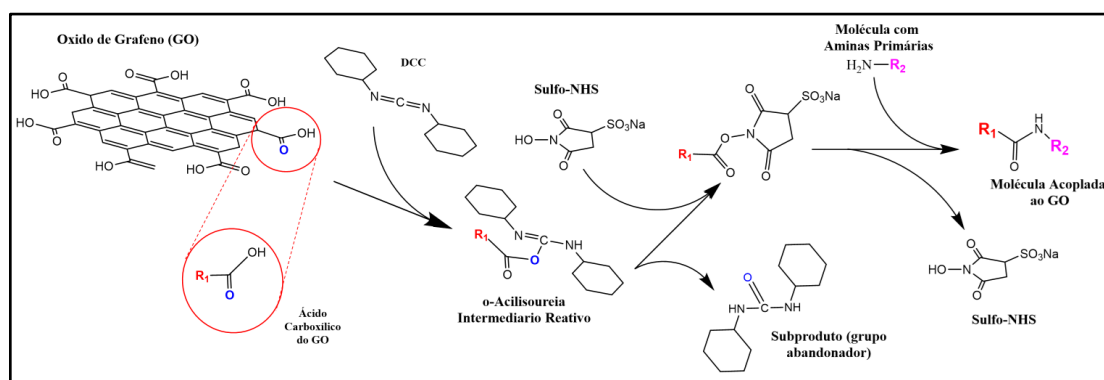


Figura 14 – Reação de Amidação via DCC e NHS. Fonte: Próprio autor

O NHS reage com o intermediário ativado pelo DCC, formando um éster succinimídico (Sulfo-NHS), que é mais estável e altamente reativo com aminas nucleofílicas. Então, quando a molécula orgânica contendo o grupo amino é adicionada à mistura reacional, ataca o carbono eletrofílico do Sulfo-NHS, substituindo o grupo succinimida e formando uma ligação amida entre a molécula orgânica e o GO. Esse acoplamento covalente é robusto e confere alta estabilidade ao híbrido, sendo particularmente útil em aplicações biomédicas, onde a ligação precisa resistir a condições fisiológicas^{138,139}. Após a reação, o produto funcionalizado é lavado para remover reagentes residuais e subprodutos, resultando em um híbrido altamente funcionalizado.

Outro tipo de acoplamento que pode ser realizado utilizando a rota DCC é a esterificação, na qual se forma uma ligação covalente entre o grupo carboxílico do GO e o grupo hidroxila (álcoois primários ou secundários) de uma molécula cromófora, como RB¹⁴⁰. Esse processo também envolve a ativação do grupo carboxílico do GO pela DCC, criando um intermediário reativo, o éster de o-acilisoureira, que será capaz de reagir com o grupo hidroxila, resultando na formação de uma ligação éster, ilustrado

na Figura 15. Embora a rota de esterificação compartilhe etapas iniciais semelhantes às do processo de amidação (Figura 14), como a ativação do grupo carboxílico e a formação do intermediário ativado, as duas reações diferem nos nucleófilos envolvidos, hidroxilas no caso da esterificação e aminas no caso da amidação. Porém, as ligações formadas por ésteres são menos estáveis do que das amidas em condições aquosas. Contudo, a funcionalização por esterificação expande as possibilidades de aplicação do GO, permitindo a ancoragem de moléculas fotossensibilizantes e a modulação de suas propriedades ópticas e fotofísicas, o que é promissor para tecnologias avançadas e aplicações biomédicas.

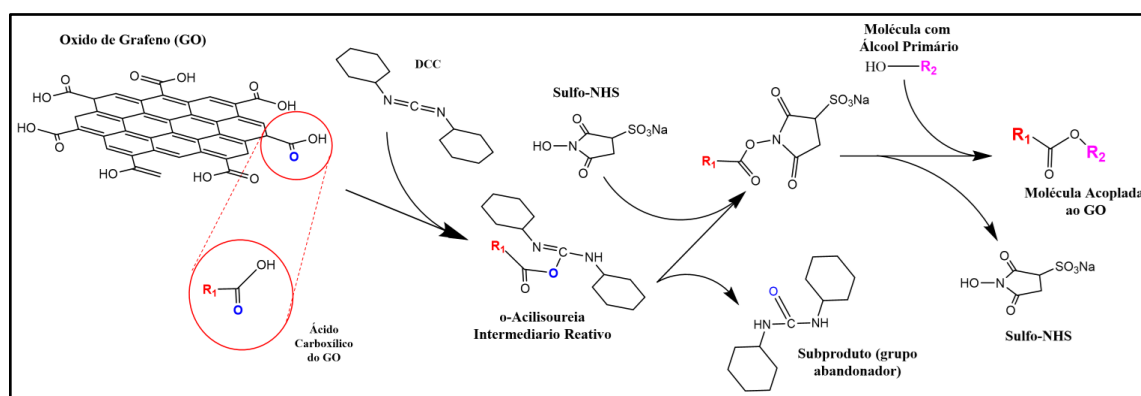


Figura 15 – Reação de Esterificação via DCC e NHS. Fonte: Próprio autor

Esse método de funcionalização covalente pode ser utilizado para acoplar PSs, biomoléculas ou outros agentes terapêuticos ao GO, proporcionando maior estabilidade e funcionalidade ao material, além de permitir uma ampla gama de aplicações, desde PDT até sensores e dispositivos eletrônicos.

3.8.2 Rota de Ancoragem GO-PS por Adsorção

Adsorção é um processo físico-químico no qual moléculas ou átomos de uma substância (adsorvato) aderem à superfície de um material sólido ou líquido (adsorvente) devido a interações intermoleculares. Esse fenômeno ocorre na interface entre as fases, sem que haja uma incorporação ao interior do material adsorvente, diferenciando-se da absorção. A adsorção pode ser classificada em dois principais mecanismos: Físico (Fisissorção) que se baseia em forças de Van der Waals, que são relativamente fracas e não covalente. Químico (Quimissorção) que envolve a formação de ligações químicas mais fortes e específicas entre o adsorvato e a

superfície do adsorvente. É geralmente irreversível, pois a quebra dessas interações requer maior energia. Além disso, o processo de adsorção é influenciado por fatores como a área superficial, a natureza química do adsorvente e do adsorvato, e as condições ambientais¹⁴¹.

O GO com sua elevada área superficial e a abundância de grupos funcionais oxigenados, proporcionam interações eficazes com uma variedade de moléculas, tornando o GO uma plataforma ideal para processos de adsorção. Dentre as interações predominantes, destacam-se as forças $\pi-\pi$, nas quais os núcleos aromáticos planos e conjugados dos PSs interagem com as regiões grafíticas do GO, resultando em empilhamentos estáveis^{142,143}, como ilustrado na Figura 16. Além disso, as interações eletrostáticas desempenham um papel crucial, já que os grupos funcionais ionizáveis do GO podem interagir com espécies dipolares ou carregadas positivamente, especialmente em condições específicas de pH^{144–147}.

Adicionalmente, interações como pontes de hidrogênio também podem ocorrer, envolvendo os grupos hidroxila e carboxila do GO e os átomos de nitrogênio e oxigênio presentes nos PSs. A natureza dessas interações é fortemente influenciada por variáveis experimentais, como o tipo de solvente, o pH e a temperatura. Essas condições podem favorecer tanto interações físicas, como $\pi-\pi$ e eletrostáticas, quanto uma adsorção mais robusta, que envolve a formação de ligações químicas específicas. Assim, a funcionalização de cromóforos no GO combina fisissorção e quimissorção, originando híbridos que potencializam as propriedades de ambos os materiais^{138–140,148}.

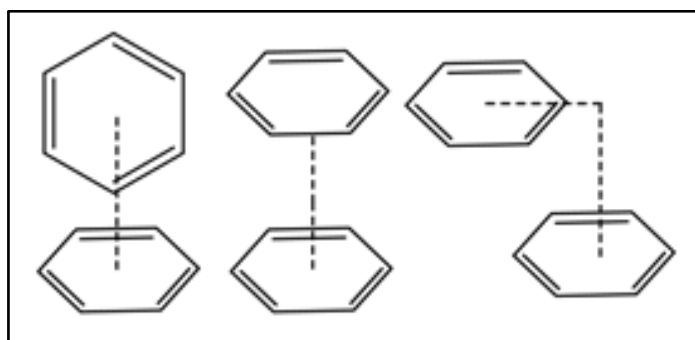


Figura 16 – Empilhamentos $\pi-\pi$ de Núcleos Aromáticos Planos e Conjugados. Fonte: Próprio autor

Esse tipo de interação pode resultar em um material funcional com aplicações promissoras, como a PDT, pois o GO melhora a sua dispersibilidade em solventes aquosos, aumentando sua estabilidade e eficiência, ampliando ainda mais seu potencial em sistemas biotecnológicos e ambientais.

3.8.3 Modificação Estrutural e Superficial do GO para Otimização de Ancoragem

A modificação química do GO, seja por dopagem heteroatômica (como nitrogênio) ou pela incorporação de nanopartículas magnéticas, tem se mostrado fundamental para potencializar suas propriedades terapêuticas e funcionais. A introdução de grupos nitrogenados promove alterações na densidade eletrônica, amplifica a resposta fototérmica e facilita interações com biomoléculas^{26,149}. Já a funcionalização com fases magnéticas, com destaque para óxidos de ferro superparamagnéticos, permite o uso em estratégias de direcionamento externo, terapia por hipertermia, remoção magnética e bioimagem^{150–153}. Quando essas modificações são combinadas em uma mesma estrutura, obtém-se um material grafênico multifuncional capaz de atuar de forma sinérgica em ambientes biológicos. Essa ampla aplicabilidade decorre da possibilidade de controlar a composição química, a morfologia e as propriedades de superfície do material por meio de rotas sintéticas cuidadosamente projetadas^{150,152–154}.

Apesar dos avanços, muitos métodos de síntese ainda enfrentam limitações importantes, como tempos reacionais prolongados, uso de etapas múltiplas, dificuldade de controle de tamanho e morfologia das nanopartículas, além de baixa reprodutibilidade^{9,155–158}. Nesse cenário, torna-se essencial o desenvolvimento de rotas otimizadas que integrem múltiplas funcionalidades ao GO em processos mais eficientes, reprodutíveis e ambientalmente favoráveis^{159,160}. A escolha adequada dos precursores, a relação estequiométrica entre espécies metálicas e dopantes, a natureza do solvente, o controle térmico preciso e a forma de ativação energética (como aquecimento convencional versus micro-ondas) são variáveis determinantes no desempenho final do material obtido^{161–163}.

A proposta apresentada neste estudo insere-se nesse esforço de inovação incremental e funcional, ao buscar uma plataforma sintética otimizada para a obtenção de um compósito grafênico multifuncionais com elevada aplicabilidade biomédica. Para isso, foram incorporadas estratégias que envolvem o controle preciso das condições reacionais, incluindo a seleção de precursores, proporções entre os

componentes ativos, e o uso de fontes de aquecimento assistido por micro-ondas em uma única etapa de síntese (*one pot*). Essa abordagem visa não apenas reduzir significativamente o tempo de síntese, mas também melhorar a dispersão das nanopartículas, a eficiência da dopagem heteroatômica e a reprodutibilidade do material obtido. Como resultado, busca-se consolidar um material com características magnéticas, fototérmicas e fotoquímicas integradas, adequado para aplicações terapêuticas e com potencial extensão para outras áreas tecnológicas.

Assim, a plataforma grafênica proposta configura-se como um sistema versátil e funcionalizável, capaz de incorporar eficientemente moléculas fotossensibilizadoras para aplicações em PDT. A modificação estrutural da plataforma grafênica favorecem a transferência de carga e/ou energia, a estabilidade fotoquímica e a supressão da agregação molecular, ampliando a geração de ROS sob irradiação NIR tornando-se uma plataforma promissora para aplicações biomédicas avançadas e, principalmente, no tratamento do melanoma.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 MATERIAIS

Os reagentes utilizados foram: ácido fólico (AF), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ftalocianina de cobre (PcCu), grafite (Graf) em pó, indocianina verde (ICG), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N-hidroxissuccinimida (NHS), óxido de grafeno em pó (comercial), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), permanganato de potássio (KMnO_4), poli(etilenoglicol) PEG-6000, riboflavina (RB), ureia e 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), todos da marca Sigma-Aldrich e de pureza analítica (PA).

Adicionalmente, foram utilizados acetato de sódio anidro, cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloreto ferroso tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol anidro e ureia, todos da marca Dinâmica e de pureza analítica (PA).

Para os procedimentos de purificação, foram utilizados etanol absoluto e metanol (Merck), além de água ultrapura (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$).

4.2 MÉTODOS

Inicialmente, foi desenvolvido um híbrido de primeira geração (HPG) baseado na ancoragem de PSs (AF, RB E PcCu) sobre GO, com o objetivo de explorar suas propriedades ópticas e potencial aplicação em PDT sob irradiação no NIR. No entanto, análises preliminares indicaram que o HPG apresentou limitações na geração do $^1\text{O}_2$, possivelmente associadas a processos de recombinação eletrônica e/ou supressão do estado excitado induzida pela interação com a matriz grafênica. Diante dessas limitações, uma nova estratégia sintética foi proposta, resultando no desenvolvimento de um híbrido de segunda geração (HSG), no qual foram promovidas modificações estruturais e químicas na plataforma de GO e a substituição da molécula de ancoragem pela ICG, visando otimizar a transferência de energia, modular os estados eletrônicos e favorecer a formação de $^1\text{O}_2$ sob excitação NIR. Essa abordagem permitiu superar as limitações do sistema inicial.

4.2.1 Síntese dos Híbridos de Primeira Geração (HPG)

O HPG foi sintetizado utilizando GO comercial como material de base, explorando suas propriedades estruturais e a presença de grupos funcionais oxigenados que favorecem a ancoragem de moléculas.

4.2.1.1 Ancoragem Molecular HPG (AF, RB E PcCu)

Os procedimentos de ancoragem das moléculas AF, RB e PcCu ao GO usando a rota DCC-NHS (descritas na seção 3.8.1) foram realizadas individualmente.

4.2.1.2 Preparação do GO Comercial

Pesou-se 0,100 g de GO e dispersou-se em 10 mL de DMSO sob agitação contínua para garantir uma dispersão homogênea. Esta proporção foi mantida em todas as sínteses subsequentes, assegurando o cumprimento das condições estequiométricas. Em todas as etapas, utilizou-se o banho ultrassônico (25 kHz) para elevar o grau de dispersão do GO no meio reacional antes das sínteses de ancoragem.

4.2.1.3 Preparação das Moléculas de Ancoragem HPG

Para cada síntese individualizada pesou-se e dissolveu-se 1 mmol de AF (0,441 g), RB (0,376 g) e PcCu (0,514 g) em 5 mL de DMSO. Após as preparações, garantiu-

se que todos os reagentes estavam completamente dissolvidos, visando assegurar uma reação eficiente e homogênea.

4.2.1.4 Reação de Ancoragem HPG

Inicialmente, pesou-se 1 mmol de DCC (0,206 g) e de NHS (0,115 g). Ambos foram dispersos ao meio contendo GO e DMSO, mantido sob agitação (300 rpm) em temperatura ambiente e atmosfera de nitrogênio (N_2) por 2 horas para ativação dos grupos oxigenados. Após esse período, a molécula de ancoragem (AF ou RB ou PcCu) foi introduzida ao sistema reacional, que permaneceu sob as mesmas condições por mais 24 horas. Após a reação, o produto da síntese foi submetido a centrifugação (10.000 rpm – 10 minutos, por várias vezes) para a remoção do excesso do reagente de ancoragem, além dos subprodutos formados. A purificação foi realizada utilizando solventes apropriados de acordo com a solubilidade, garantindo a obtenção de um produto final puro. Em seguida, o material foi encaminhado à estufa com circulação de ar, em temperatura de 60°C por 24 horas.

Portanto, as sínteses supracitadas foram conduzidas exclusivamente por meio da ativação dos grupos oxigenados do GO via DCC–NHS, caracterizando a ancoragem dos HPG. Nessa etapa, não foram promovidas alterações estruturais ou superficiais adicionais no GO, as quais foram realizadas posteriormente e passaram a ser denominadas ancoragens dos HSG.

4.2.2 Síntese dos Híbridos de Segunda Geração (HSG)

Na síntese dos HSG foi utilizado o GO obtido pelo método de Hummers modificado¹⁶⁴. De forma resumida, o grafite (graf) foi disperso em meio ácido concentrado (H_2SO_4), seguido da adição controlada de um agente oxidante ($KMnO_4$) sob agitação e controle de temperatura, promovendo a intercalação e oxidação das camadas sobrepostas. Após o término da reação, a mistura foi submetida a uma solução de H_2O_2 (30% v/v) sob agitação até cessar a liberação de gases e, posteriormente, a etapas sucessivas de diluição e lavagem até a neutralização do pH, visando à remoção de subprodutos e íons residuais¹⁶⁴. O material oxidado foi então separado, purificado e seco, resultando na obtenção do GO.

4.2.2.1 *Modificação Estrutural do GO Via Rota Hidrotermal Assistida por Microondas em uma Única Etapa*

Inicialmente, 0,188 g de GO foi disperso em 50 mL de etilenoglicol sob agitação magnética por 20 minutos em temperatura ambiente. A suspensão foi submetida a sonicação indireta em banho ultrassônico (25 kHz) por 2 horas, com agitação manual a cada 30 minutos e temperatura controlada abaixo de 35°C, até a obtenção de uma dispersão homogênea de coloração castanho-escuro. À suspensão de GO foram adicionados, sob agitação magnética por 30 minutos, 3,33 g de ureia, 2,25 g de acetato de sódio anidro e 0,83 g de poli(etilenoglicol) PEG-6000. Para a incorporação do ferro foram adicionados 0,506 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,186 g de cloreto ferroso tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), mantendo a proporção molar 2:1 ($\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$). As misturas reacionais foram transferidas para tubos de Teflon de 50 mL e submetidas ao sistema de micro-ondas ETHOS EASY (Milestone) a 180°C por 30 minutos. O produto sólido obtido (mNGO) foi recuperado via campo magnético externo (Imã) e lavado sucessivamente com água destilada e etanol na proporção 50:50 (v/v), sendo posteriormente seco em estufa com circulação de ar a 60 °C por 12 horas e armazenado em frasco âmbar até a caracterização e ancoragem da molécula ICG.

Simultaneamente, foi conduzida uma síntese em outro tubo de Teflon sob condições idênticas, porém na ausência dos sais de ferro, com o objetivo de avaliar as modificações estruturais induzidas exclusivamente pelos compostos nitrogenados na estrutura grafítica. Por sua vez, esse material foi purificado por centrifugação a 10.000 rpm por 15 min, sendo o processo repetido por cinco ciclos sucessivos, utilizando também uma mistura de água e etanol e, posteriormente, seco na estufa.

4.2.2.2 *Ancoragem Molecular HSG (ICG)*

A ancoragem HSG foi realizada utilizando o mNGO como material base. A etapa foi conduzida em sistema batelada, à temperatura ambiente, sob agitação mecânica constante de 200 rpm. O meio reacional consistiu em 50 mL de água ultrapura, em pH próximo de 6,8, contendo 2,0 mg de mNGO (0,04 mg/mL) e 0,5 mg de ICG (0,01 mg/mL), estabelecendo uma razão mássica ICG:mNGO de 1:4¹⁶⁵. O sistema foi mantido sob agitação por 2 horas, (Figura 17) período suficiente para promover a interação eficiente da ICG com a superfície do mNGO, favorecida por interações não covalentes, como empilhamento π - π , forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio, resultando na formação do híbrido mNGO@ICG.



Figura 17: Sistema de Agitação Mecânica para Adsorção e Obtenção do Híbrido mNGO@ICG. Fonte: Próprio autor

Ao final do processo, o material funcionalizado foi recuperado por separação magnética, mediante a aplicação de um ímã externo, e submetido a cinco ciclos sucessivos de lavagem com água ultrapura, com o objetivo de remover a fração de ICG não ancorada. O sólido obtido foi então destinado às etapas posteriores de caracterização e aplicação.

4.2.3 Caracterizações dos HPG e HSG

As caracterizações foram realizadas com o objetivo de avaliar propriedades estruturais, morfológicas, químicas e fotofísicas, tanto antes quanto após os processos de síntese e funcionalização.

Inicialmente, as propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos materiais foram investigadas por meio de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), Espectroscopia UV-Vis e Espectroscopia de emissão de fluorescência, permitindo a identificação de grupos funcionais, a confirmação das interações entre o GO e os PSs, bem como a avaliação do comportamento óptico e eletrônico dos sistemas híbridos. Adicionalmente, a morfologia superficial e a organização estrutural dos materiais foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), possibilitando a observação da topografia e de possíveis alterações morfológicas decorrentes das funcionalizações. A estrutura cristalina e o grau de

ordenamento dos materiais foram avaliados por Difração de Raios X (DRX), fornecendo informações sobre mudanças na cristalinidade do GO após a funcionalização. Já, a Espectroscopia Raman foi empregada para investigar modificações estruturais na rede carbonácea, incluindo a análise do grau de defeitos, desordem estrutural e possíveis alterações na hibridização eletrônica, por meio da avaliação das bandas características D, G e 2D. Por fim, a determinação do Potencial Zeta (PZ) foi realizada com o objetivo de avaliar a estabilidade coloidal e a carga superficial do material em meio aquoso. Esse parâmetro fornece informações importantes sobre as interações eletrostáticas entre partículas, permitindo inferir a tendência à agregação ou dispersão do sistema. Além disso, a análise do PZ contribui para a compreensão das modificações químicas na superfície do material, especialmente após os processos de funcionalização, sendo também relevante para prever o comportamento do material em aplicações biomédicas, nas quais a interação com sistemas biológicos depende diretamente das propriedades superficiais.

4.2.3.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

A caracterização por FT-IR foi realizada utilizando um espectrômetro (FTIR-ATR VERTEX 70 – BRUKER, com resolução de 4 cm^{-1}), equipado com acessório apropriado para a análise do material. A amostra, preparada na forma de pó, foi homogeneizada com KBr em proporção adequada e prensada em uma pastilha transparente para garantir a transmissão da radiação infravermelha. O espectro foi obtido na faixa de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$, com resolução espectral definida, garantindo a identificação detalhada das vibrações características das ligações químicas presentes. Os picos observados no espectro foram correlacionados a grupos funcionais específicos do material, permitindo confirmar sua composição e interações químicas conforme esperado.

4.2.3.2 Espectroscopia UV-Vis

A caracterização por Espectroscopia UV-Vis foi realizada utilizando um espectrofotômetro (AGILENT TECHNOLOGIES (CARY 2848)). A solução da amostra foi preparada nas concentrações $1,0 \cdot 10^{-2}$ a $1,0 \cdot 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ em DMSO, garantindo a completa dissolução e homogeneidade. A análise foi conduzida na faixa de comprimento de onda entre 200 e 1100 nm, utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. O espectro de absorção foi registrado e os picos de absorção

característicos foram analisados, permitindo a identificação de transições eletrônicas específicas. Os resultados foram utilizados para confirmar a presença de estruturas químicas esperadas, bem como para avaliar possíveis interações eletrônicas no material.

4.2.3.3 *Espectroscopia de Emissão de Fluorescência*

A caracterização por Espectroscopia de Emissão de Fluorescência foi realizada de acordo com os procedimentos descritos na literatura, utilizando um espectrofluorímetro (VARIAN, CARY ECLIPSE) equipado com fonte de excitação adequada. As amostras foram preparadas em DMSO, em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, garantindo sua solubilidade e estabilidade durante a análise. A emissão foi registrada após excitação em um comprimento de onda específico previamente determinado, de acordo com os espectros de absorção de cada material. O espectro de emissão foi obtido varrendo a faixa espectral relevante para o material, com parâmetros de excitação e emissão otimizados para maximizar a intensidade do sinal e minimizar interferências. Os resultados foram analisados para identificar os máximos de emissão característicos, permitindo a avaliação de propriedades ópticas do material e possíveis interações intermoleculares.

4.2.3.4 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

As amostras foram previamente secas em estufa a temperatura controlada, a fim de remover umidade residual. Posteriormente, pequenas quantidades do material em pó foram depositadas sobre suportes metálicos (stubs) utilizando fita condutiva de carbono, garantindo adequada fixação e estabilidade durante as análises. Para minimizar efeitos de carregamento eletrostático, as amostras foram metalizadas com uma fina camada condutora de ouro (Au), por meio de sputtering, sob corrente de 20 mA durante 60 s. As análises foram conduzidas em um microscópio eletrônico de varredura Zeiss EVO 50, equipado com fonte de elétrons por filamento de tungstênio, operando em alto vácuo. As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração na faixa de 5–15 kV, com detector de elétrons secundários (SE). Foram empregadas diferentes ampliações, permitindo a avaliação tanto da morfologia global quanto de características superficiais em escala micrométrica. As micrografias obtidas possibilitaram a análise da distribuição das folhas de GO, da presença de aglomerações e de alterações morfológicas associadas à funcionalização com

nanopartículas de Fe_3O_4 , fornecendo informações complementares às técnicas espectroscópicas e estruturais utilizadas neste estudo.

4.2.3.5 Difratometria de Raios X (DRX)

As análises foram conduzidas em um difratômetro de raios X da marca Rigaku, modelo MiniFlex 600, operando com radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ nm}$), sob condições de 40 kV e 15 mA. Os difratogramas foram obtidos no intervalo de $2\theta = 5\text{--}100^\circ$, com passo angular de $0,04^\circ$ e 10 graus/min. As amostras na forma de pó foram analisadas sem preparo adicional, sendo depositadas diretamente no porta-amostras do equipamento. A partir dos difratogramas obtidos, foi possível avaliar alterações na posição, intensidade e largura dos picos característicos do Graf e GO, bem como identificar mudanças no espaçamento interplanar e no grau de cristalinidade associadas à incorporação das nanopartículas magnéticas. Essas informações permitiram correlacionar as modificações estruturais observadas com os resultados obtidos pelas demais técnicas.

4.2.3.6 Espectroscopia Raman

As análises foram conduzidas em um espectrômetro Raman portátil B&W Tek i-Raman Plus 532 nm, acoplado a um microscópio BAC151 Raman microscope, utilizando fonte de excitação laser de 532 nm, com potência ajustada de modo a evitar aquecimento local e danos térmicos ao material. Os espectros foram adquiridos no intervalo espectral de $800\text{--}3200 \text{ cm}^{-1}$, com resolução espectral de aproximadamente $3\text{--}5 \text{ cm}^{-1}$ e tempo de aquisição de 10 s por acumulação, com 3 acumulações por ponto. As amostras em pó foram previamente depositadas sobre substratos de silício, sem necessidade de preparo adicional, garantindo a preservação das características estruturais do material. A análise dos espectros Raman concentrou-se nas bandas características D ($\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$), G ($\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$) e 2D ($\sim 2700 \text{ cm}^{-1}$), permitindo a avaliação do grau de defeitos estruturais por meio da razão de intensidades $I(\text{D})/I(\text{G})$, bem como a análise da organização da rede sp^2 e de alterações estruturais associadas à funcionalização GO. Os resultados obtidos foram correlacionados com as demais técnicas de caracterização estrutural e espectroscópica empregadas.

4.2.3.7 Caracterização da Carga Superficial por Potencial Zeta

O PZ das dispersões do composto mNGO foi determinado por meio da técnica de espalhamento de luz eletroforético (ELS, Electrophoretic Light Scattering), utilizando um equipamento Zetasizer (Malvern Panalytical). As amostras foram previamente dispersas em meio aquoso nas diluições 1:100 e 1:1000 e submetidas à sonicação para garantir adequada homogeneização. As medições foram realizadas em triplicata, utilizando cubetas apropriadas para análise eletroforética, sob temperatura controlada de 25°C. O pH da dispersão foi ajustado para 6,8, visando simular condições próximas ao ambiente fisiológico. O PZ foi calculado a partir da mobilidade eletroforética das partículas, empregando a aproximação de Smoluchowski. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão das medições independentes.

O conjunto dessas técnicas permitiu uma caracterização abrangente dos híbridos, correlacionando suas propriedades físico-químicas e estruturais com o desempenho esperado em aplicações fotodinâmicas e fototérmicas.

4.2.4 Ensaios com a Sonda 1,3-Difenilisobenzofurano (DPBF) em HPG e HSG

A avaliação da capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ pelos sistemas híbridos sintetizados foi realizada por meio de ensaios funcionais baseados na degradação da sonda química DPBF, amplamente empregada como indicador indireto da formação de $^1\text{O}_2$. O DPBF reage de forma seletiva com o $^1\text{O}_2$, resultando na diminuição progressiva de sua absorbância característica, a qual pode ser monitorada por espectroscopia UV-Vis.¹⁶⁶

Os ensaios foram conduzidos integralmente em ambiente escuro, de modo a evitar degradação fotoinduzida da sonda e interferências decorrentes da exposição à luz ambiente. As soluções de DPBF foram preparadas na concentração de 50 μM , utilizando etanol como solvente, em volume total de 100 mL, assegurando completa solubilização da sonda. As amostras contendo DPBF e os respectivos sistemas híbridos HPG e HSG à base de GO comercial e mNGO, respectivamente, com massas de 1mg.mL^{-1} , foram previamente homogeneizadas, garantindo adequada dispersão dos materiais no meio reacional.

A irradiação das amostras foi realizada utilizando um laser com comprimento de onda central de 808 nm contínuo, em potência de 200 mW.cm^{-2} e os estudos foram realizados com a variação do tempo entre 0 – 150 s, operado pelo equipamento

LASERPULSE da marca Ibramed (modelo LA04_V04_AN), mostrado na Figura 18, selecionado por sua aplicabilidade em terapias fotônicas na região do NIR. A irradiação foi realizada diretamente na cubeta utilizada para as análises de UV-Vis, minimizando perdas experimentais associadas à transferência de amostras e assegurando maior reprodutibilidade das medições espectroscópicas.



Figura 18 – Equipamento Utilizado para Irradiação NIR. Fonte: Próprio autor

O procedimento de irradiação foi conduzido de forma intermitente, com ciclos de exposição de 30 segundos. Após cada intervalo de irradiação, a absorbância da solução foi imediatamente registrada por espectroscopia UV-Vis, monitorando-se especificamente a variação da banda característica do DPBF na região entre 410 e 420 nm, correspondente à sua transição eletrônica sensível à presença de $^1\text{O}_2$. A diminuição da intensidade dessa banda foi utilizada como parâmetro para avaliar a degradação da sonda e, conseqüentemente, a possível geração de $^1\text{O}_2$ induzida pela irradiação NIR na presença dos HPG e HSG.

Durante todo o ensaio, as condições experimentais, incluindo concentração da sonda, volume da amostra, solvente, cubeta, distância da fonte de irradiação e tempo total de exposição, foram mantidas constantes, permitindo a comparação direta entre os diferentes sistemas híbridos avaliados. Ensaios controle, contendo apenas a

solução de DPBF em etanol, além de outras variações, discutidas mais adiante, foram submetidos às mesmas condições de irradiação para verificar a estabilidade da sonda.

A análise dos espectros UV-Vis obtidos permitiu avaliar a presença ou ausência de degradação detectável do DPBF sob as condições experimentais adotadas, fornecendo subsídios para a interpretação do desempenho fotodinâmico dos materiais sintetizados quando ativados na região NIR.

4.2.5 Ensaio Fototérmico em Dispersão Aquosa

A resposta fototérmica dos sistemas foi avaliada em meio aquoso sob irradiação no NIR. Foram preparadas amostras contendo água ultrapura (Milli-Q) (branco), dispersões de mNGO nas concentrações de 0,01; 0,25; 0,50; 1,00 e 2,50 mg/mL, além de soluções de ICG livre e dispersões do híbrido mNGO@ICG, sob condições equivalentes.

Alíquotas de 250 μ L de cada amostra foram transferidas para recipientes idênticos (Cubeta de quartzo), mantendo-se constantes o volume e a geometria do sistema. A irradiação foi realizada com laser de 808 nm a 200 mW/cm² por 300 s, com temperatura inicial correspondente à temperatura ambiente.

O monitoramento térmico foi conduzido por meio de termopar portátil (marca Extech Instruments, Extech 410 Multimeter digital da série EX400), registrando-se a temperatura ao longo do tempo de exposição. Os dados obtidos foram utilizados para construção das curvas de aquecimento (Temperatura vs. tempo) e determinação da variação de temperatura (ΔT). A comparação entre os sistemas (branco, mNGO, ICG e mNGO@ICG) permitiu avaliar a contribuição individual dos componentes e o efeito HSG na conversão fototérmica.

4.2.6 Avaliação *In Vitro* da Atividade Fotobiológica em Células de Melanoma

A atividade fotobiológica do sistema mNGO@ICG foi avaliada por meio de ensaios *in vitro* utilizando a linhagem de melanoma humano A375, com o objetivo de investigar a viabilidade celular sob condições de exposição ao material na presença e ausência de irradiação no NIR. Estes experimentos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Pedro Aoki, do Departamento de Biotecnologia da FCL/UNESP de Assis.

As células foram cultivadas em condições padrão (37°C, atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, 10% de soro com 1% de antimicótico e antibiótico) e semeadas

em placas de 96 poços, sendo incubadas por 24 h para adesão celular. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio contendo o sistema mNGO@ICG. As amostras foram preparadas por meio de diluições seriadas, nas concentrações de 250, 125, 62, 31, 15, 7 e 3 µg/mL, sendo então adicionadas às culturas celulares. O tempo total de exposição das células ao material foi de 2 h.

Para o grupo irradiado, o protocolo consistiu em 1 h de incubação inicial com o material, seguida de 1 h de irradiação na região do infravermelho próximo ($\lambda = 808$ nm), utilizando densidade de potência de 200 mW/cm², totalizando 2 h de exposição. Para o grupo não irradiado (escuro), as células foram mantidas em incubação por 2 h nas mesmas condições, porém sem exposição à luz NIR.

Após o tratamento, o meio contendo o material foi removido e substituído por meio de cultura fresco. A viabilidade celular foi então avaliada pelo ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) em dois tempos distintos: imediatamente após o tratamento (0 h) e após 24 h de incubação adicional. Para o ensaio de MTT, a solução do reagente foi adicionada aos poços e as células incubadas até a formação dos cristais de formazan. Em seguida, o meio foi removido e os cristais solubilizados com solvente apropriado, sendo a absorbância medida em leitor de microplacas no comprimento de onda de 570 nm.

A viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle (células não tratadas), sendo calculada a partir da razão entre as absorbâncias obtidas. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism e apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 HÍBRIDOS HPG: CARACTERIZAÇÃO E DESEMPENHO FOTODINÂMICO

Nesta seção são apresentados os resultados e discussões referentes às sínteses realizadas para a ancoragem das moléculas AF, RB e PcCu ao GO comercial (HPG) bem como às caracterizações dos materiais obtidos.

5.1.1 Sínteses dos HPG por Interações Químicas

A síntese dos HPG por ancoragem na plataforma de GO com as moléculas de AF, RB e PcCu foi conduzida por etapas controladas, conforme descrito no item 4.2. A ativação dos grupos carboxílicos do GO com DCC e NHS, conforme mostrado na

Figura 19, permitiu a formação de intermediários reativos, favorecendo a ligação covalente entre o GO e as moléculas funcionalizantes. Os grupos funcionais envolvidos na interação com o GO são aqueles capazes de estabelecer ligações covalentes e/ou interações específicas com a sua superfície. Nesse contexto, os grupos epóxido, hidroxila e carboxila presentes no GO favorecem a interação com diferentes compostos por meio de mecanismos químicos e/ou físicos bem definidos^{137,167}.

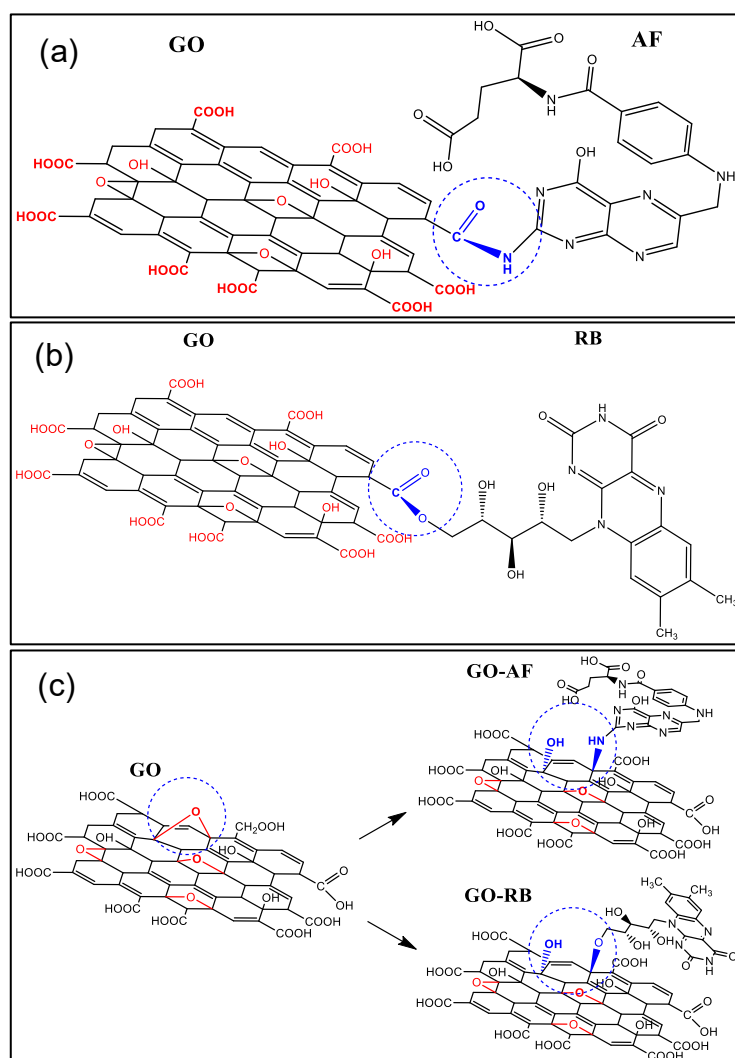


Figura 19 – Representação das Estruturas das Possíveis. Interações Químicas entre GO com AF e RB (GO-AF). Reação de amidação e esterificação entre GO AF e RB. Fonte: Próprio autor

Para o AF, a presença de grupos amino indica a ocorrência de reação de amidação com os grupos carboxílicos do GO, mediada por DCC e NHS via ataque nucleofílico^{138,168}, resultando na formação do híbrido GO-AF (Figura 19a).

No caso da RB, os resultados sugerem a formação do híbrido GO-RB por reação de esterificação entre os grupos carboxílicos ativados do GO e os grupos hidroxila (álcoois primários e secundários) da molécula (Figura 19b). Embora as ligações éster sejam menos estáveis à hidrólise quando comparadas às ligações amida^{138,148}, elas possibilitam a funcionalização eficiente.

Além das reações envolvendo grupos carboxílicos, os grupos epóxido do GO também podem participar da funcionalização. Esses grupos podem reagir com nucleófilos presentes no AF e na RB, como amino e hidroxila, respectivamente, por mecanismos de substituição nucleofílica, promovendo a abertura do anel epóxido e a formação de ligações covalentes estáveis¹⁶⁸ (Figura 19c). Esse processo é favorecido pela elevada eletronegatividade do oxigênio, que induz polarização eletrônica e torna os carbonos do anel mais eletrofílicos. Adicionalmente, a elevada tensão angular do anel epóxido contribui para sua reatividade, facilitando sua abertura durante o ataque nucleofílico¹⁶⁹. De forma complementar, as hidroxilas superficiais do GO (grupos fenólicos) também podem atuar na ancoragem, interagindo com grupos funcionais presentes no AF e na RB¹³⁸.

Em suma, grupos amino tendem a formar ligações amida com o GO, enquanto grupos hidroxila favorecem a formação de ligações éster. Essas interações ampliam as possibilidades de funcionalização, contribuindo para a estabilidade química dos híbridos e melhor integração entre o GO e as moléculas bioativas, sem comprometer as propriedades dos componentes.

5.1.2 Sínteses dos HPG por Interações Físicas

Os grupos oxigenados do GO, aliados às regiões conjugadas e grupos funcionais das moléculas de ancoragem, também permitem a ocorrência de interações não covalentes, como forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, caracterizando processos de fisissorção^{145,170}. A elevada área superficial do GO potencializa essas interações, favorecendo sua atuação como adsorvente para AF, RB e, especialmente, PcCu^{146,147}.

Destaca-se ainda o empilhamento π - π como mecanismo dominante na estabilização desses sistemas, promovendo interações eficazes entre o GO e as moléculas ancoradas^{142,143}, como exemplificado na interação GO-PcCu mostrado na Figura 20.

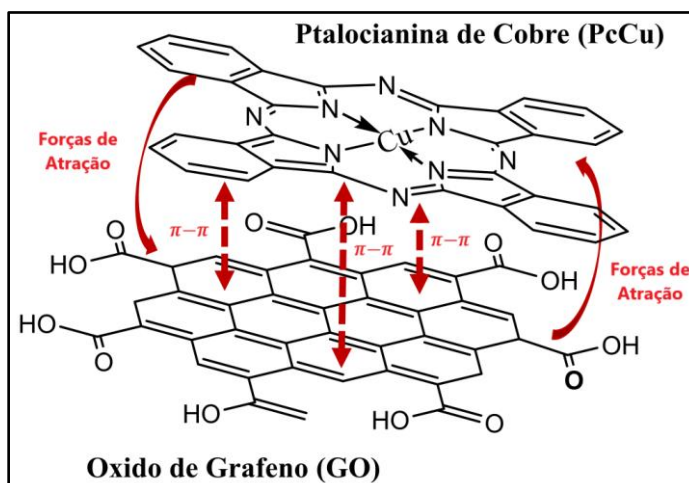


Figura 20 – Interação GO-PcCu Via Adsorção.
Fonte: Próprio autor.

A ancoragem dessas moléculas resulta na formação de sistemas estruturados com elevado potencial para aplicações biomédicas, uma vez que tais interações asseguram estabilidade química e preservam propriedades ópticas. Além disso, mantêm a reatividade e a especificidade molecular, fatores essenciais para aumentar a seletividade e a eficácia terapêutica.

5.1.3 Caracterizações Estruturais dos HPG

Para verificar a possibilidade da ancoragem dos compostos ao GO, foram empregadas técnicas de caracterização que permitem analisar a estrutura, a composição e propriedade óptica de cada material. A seguir, cada técnica será abordada individualmente, apresentando seus resultados e respectivas discussões.

5.1.3.1 Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia FT-IR foi empregada para identificar grupos funcionais no material e confirmar a possível interação entre os compostos com o GO. Os espectros permitiram observar picos característicos de AF, RB e PcCu, além de alterações nas bandas do GO, sugerindo a formação de novas ligações e funcionalizações.

5.1.3.1.1 Espectroscopia de Infravermelho GO, AF e GO-AF

O espectro FT-IR do GO apresentou concordância com a literatura^{171–173}, apresenta bandas características de grupos oxigenados, atribuídas às vibrações de O–H, C=O, C–O–C e C–O, confirmando a presença de funções hidroxila, carboxila, epóxi e alcóxi na superfície oxidada, conforme mostrado na Figura 21.

O pico em 1716 cm^{-1} confirmou grupos C=O de ácidos carboxílicos, enquanto o sinal em 1623 cm^{-1} sugeriu a preservação parcial de domínios aromáticos (C=C). Bandas em 1228 e 1040 cm^{-1} foram associadas a grupos epóxido e C–O, confirmando a elevada funcionalização do material, sem perda completa da estrutura do GO.

O espectro do AF refletiu sua complexidade estrutural, com contribuições de grupos amina, amida, carboxila e anéis aromáticos^{174–176}. As bandas entre 3647 – 2165 cm^{-1} corresponderam a estiramentos O–H, N–H e C–H, enquanto sinais em $\sim 1684\text{ cm}^{-1}$ indicaram C=O de amidas. Vibrações em 1600 , 1480 e 1220 – 1188 cm^{-1} confirmaram a presença de sistemas aromáticos e ligações C–N/C–O, fortemente influenciadas por interações intermoleculares.

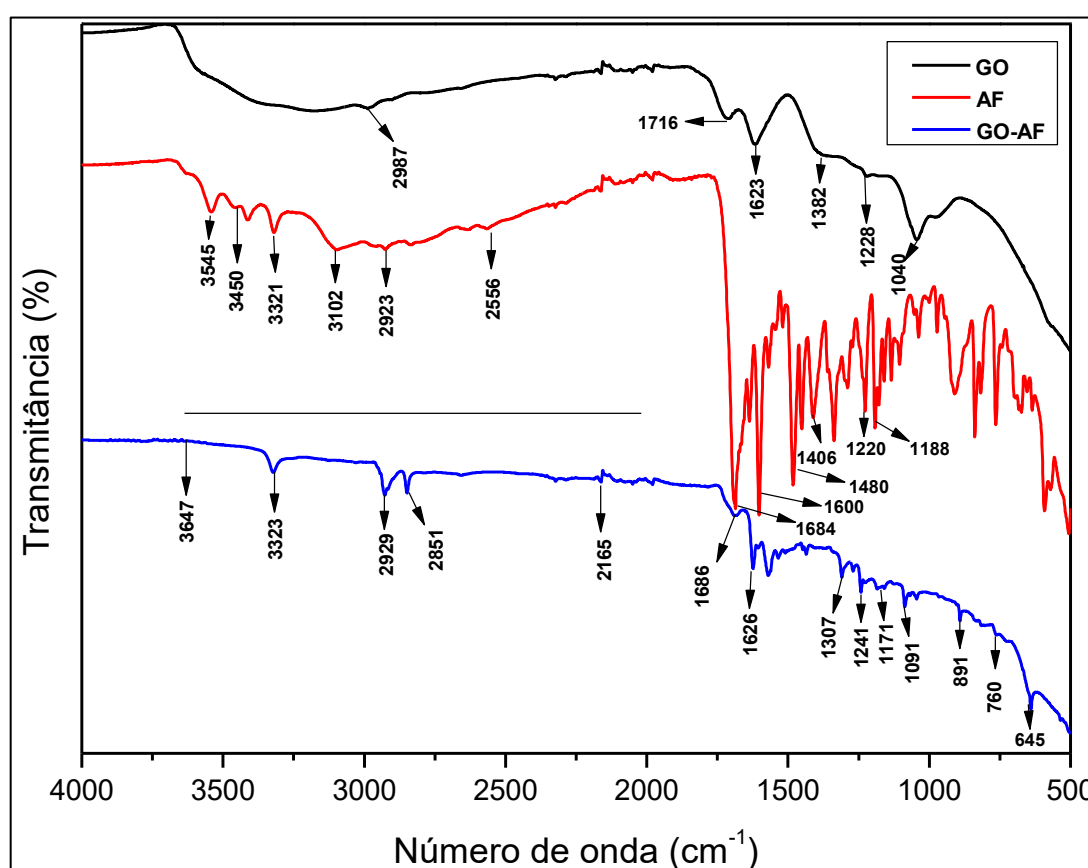


Figura 21 - Espectroscopia FT-IR das Amostras de GO, AF e GO-AF. **Fonte:** Próprio autor

Para o híbrido GO-AF, observou-se atenuação/desaparecimento da banda larga associada a O–H e N–H livres, sugerindo o consumo parcial desses grupos durante a funcionalização. Esse comportamento, associado ao deslocamento da banda de carbonila em torno de 1686 cm^{-1} , é compatível com a formação de ligações covalentes do tipo amida entre grupos carboxílicos do GO e grupos amina do ácido fólico, conforme esperado para reações mediadas por DCC/NHS. Além disso, as

alterações nas regiões de $1307\text{--}1241\text{ cm}^{-1}$, atribuídas a vibrações C–O/C–N, e a redução de sinais entre $1171\text{--}1091\text{ cm}^{-1}$ indicam modificação dos grupos oxigenados do GO e incorporação de grupos nitrogenados do AF, mantendo-se vibrações aromáticas características da estrutura folato^{177,178}.

5.1.3.1.2 Espectroscopia de Infravermelho GO, RB e GO-RB

O espectro de FT-IR do GO foi previamente discutido. Para a RB (Figura 22), observou-se um perfil espectral compatível com a literatura^{179,180}, evidenciando sua complexidade estrutural. As bandas em 3494 e 3317 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento O–H, indicando a presença de hidroxilas livres. O pico em 3204 cm^{-1} confirmou grupos N–H, enquanto as bandas em 3105 e 2935 cm^{-1} indicaram ligações C–H aromáticas e alifáticas.

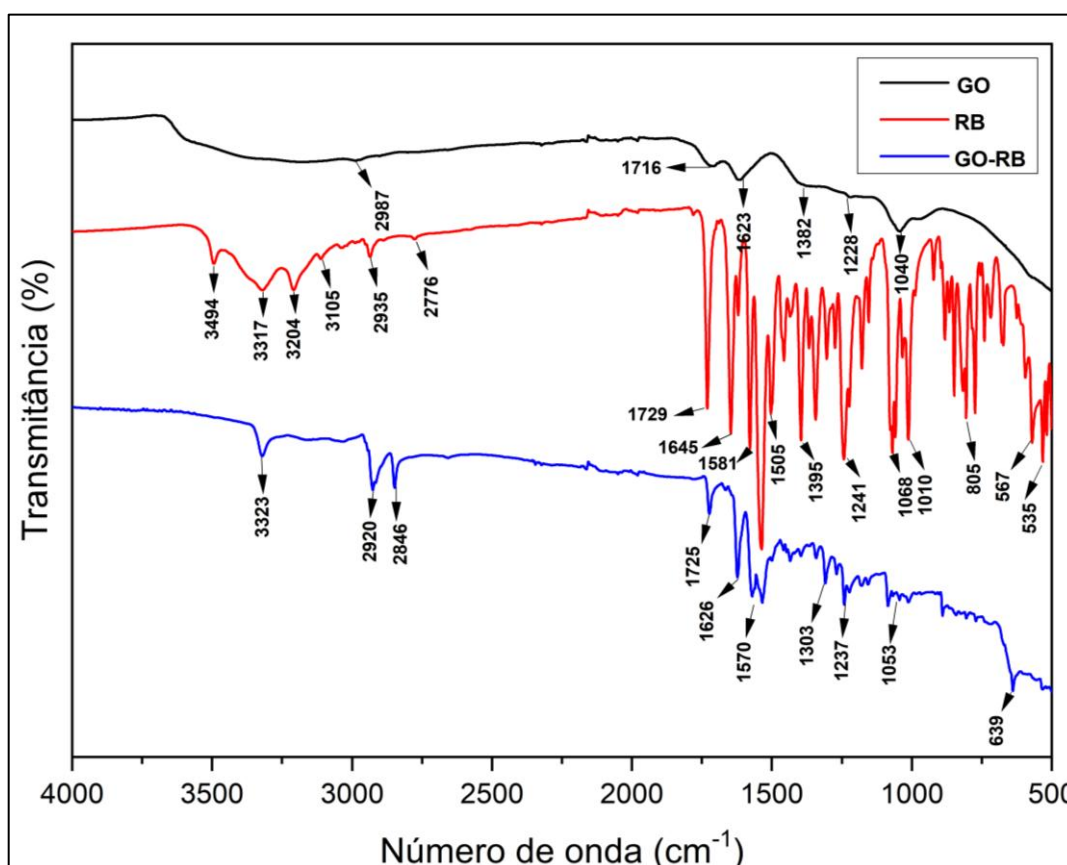


Figura 22 - Espectroscopia FT-IR das Amostras de GO, RB e GO-RB.
Fonte: Próprio autor

Na região de menores números de onda, o pico em 1729 cm^{-1} foi associado ao estiramento C=O da RB, enquanto as bandas em 1645 cm^{-1} e na faixa de $1581\text{--}1505\text{ cm}^{-1}$ foram atribuídas a vibrações envolvendo C=O/C=N/N–H e C=C aromático do

anel isoaloxazina, indicando a preservação do sistema π -conjugado da riboflavina no híbrido GO–RF¹⁸¹. Bandas adicionais em 1395 e 1241 cm^{-1} , associadas a C–N/C–O e deformações N–H, bem como sinais entre 1068–1010 cm^{-1} , indicam a contribuição de grupos oxigenados e nitrogenados da riboflavina e do GO¹⁸². As bandas na região de 850–535 cm^{-1} podem ser atribuídas a deformações fora do plano de estruturas aromáticas/heterocíclicas, reforçando a presença do núcleo isoaloxazina no material híbrido^{183,184}.

Para o conjugado GO–RB, observaram-se alterações espectrais indicativas de interação entre as espécies. A redução da banda O–H (3200–3600 cm^{-1}) sugeriu consumo parcial de hidroxilas durante a funcionalização. O deslocamento da banda C=O (1700–1750 cm^{-1}) para maiores frequências indicou participação desses grupos em novas ligações, possivelmente éster ou amida. A diminuição da intensidade na região de 1050–1250 cm^{-1} evidenciou o envolvimento de ligações C–O no processo de ancoragem¹⁸⁴.

De forma geral, as alterações no espectro de FT-IR sugeriram que o conjugado GO–RB foi formado por interações químicas entre os grupos funcionais de ambas as moléculas ou até mesmo por fisissorção. As mudanças observadas nas bandas correspondentes às hidroxilas, carbonilas, ligações C–O e deformações aromáticas foram consistentes com a formação de um material híbrido funcionalizado. Esse comportamento destaca o potencial do conjugado GO–RB em aplicações biomédicas e tecnológicas, aproveitando a reatividade química da RB e a estrutura altamente oxigenada do GO.

5.1.3.1.3 Espectroscopia de Infravermelho GO, PcCu e GO-PcCu

No presente estudo, conforme demonstrado na Figura 23, foram analisados o GO, a PcCu e o conjugado GO–PcCu, com o objetivo de verificar a ocorrência de conjugação e compreender as interações entre os materiais. A combinação do GO, caracterizado por elevada área superficial e abundância de grupos oxigenados, com a PcCu, uma macromolécula aromática contendo Cu central, favorece a formação de híbridos por interações não covalentes, como empilhamento π – π e ligações de hidrogênio que corroboram com os estudos publicados^{125–127,170}

O espectro da amostra PcCu mostrou bandas características da sua estrutura macrocíclica complexada com o átomo de Cu¹⁸⁵, com sinais em ~1610 e 1500 cm^{-1}

atribuídos ao estiramento C=N e C=C aromáticos. A banda em 1330 cm^{-1} foi associada ao estiramento C–N, enquanto as bandas em 1165 e 1090 cm^{-1} corresponderam a vibrações do anel heterocíclico. A presença de banda em $\sim 750\text{ cm}^{-1}$, relacionada a deformações fora do plano, confirmou a estabilidade estrutural da molécula, com o Cu atuando como centro estabilizador.

No espectro do conjugado GO-PcCu, observaram-se alterações em relação aos materiais isolados, sugerindo interação por adsorção física. A redução da banda em $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ indicou o envolvimento de grupos hidroxila do GO em ligações de hidrogênio. O deslocamento e a diminuição da intensidade da banda em $\sim 1720\text{ cm}^{-1}$ sugeriram interação entre grupos carbonílicos do GO e nitrogênios da PcCu. Alterações nas bandas em 1270 e 1060 cm^{-1} indicaram a participação de grupos epóxidos e C–O no processo de ancoragem. Ainda assim, as bandas características da PcCu permaneceram visíveis, evidenciando a preservação de sua estrutura macrocíclica.

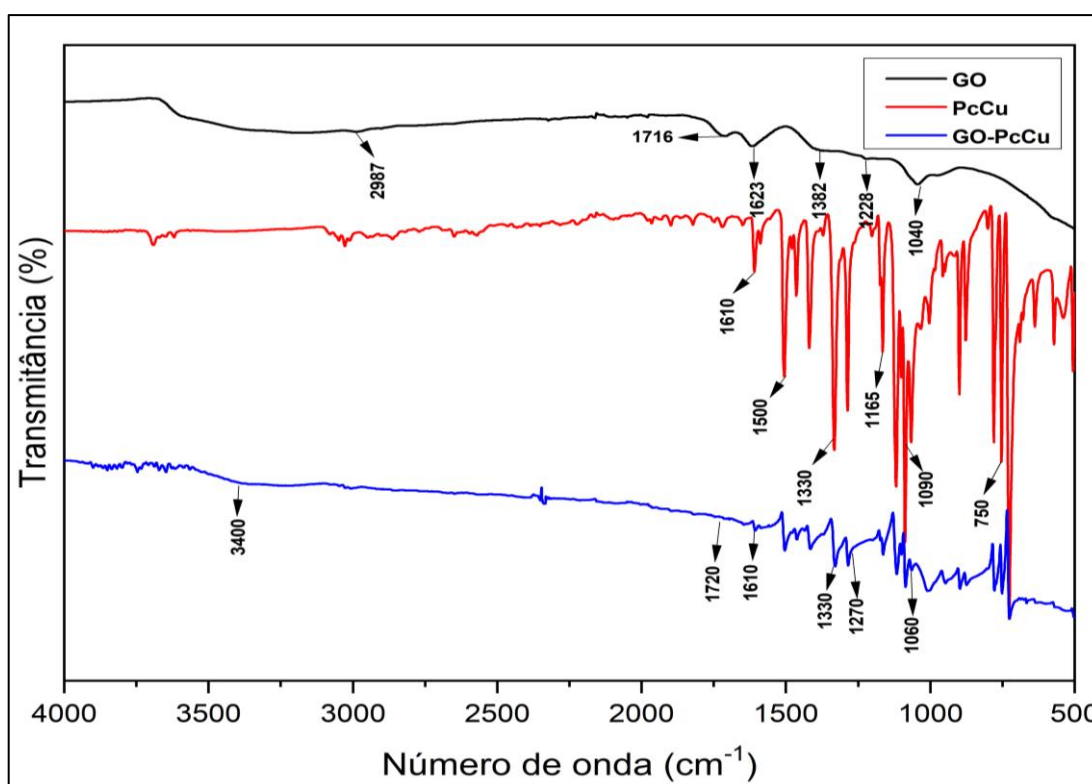


Figura 23 - Espectroscopia FT-IR das Amostras de GO, PcCu e GO-PcCu.
Fonte: Próprio autor

De modo geral, os resultados sugerem que a conjugação ocorre predominantemente por fisissorção, mediada por interações π - π e ligações de hidrogênio, sem formação de ligações covalentes. A preservação estrutural da PcCu,

aliada às interações com o GO, contribui para a estabilidade do sistema híbrido e potencializa propriedades como absorção de luz e comportamento eletrônico.

5.1.3.2 Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Fluorescência

A caracterização por espectroscopia UV-Vis e emissão de fluorescência foi uma ferramenta fundamental para investigar as propriedades ópticas e eletrônicas de moléculas isoladas, como GO, AF, RB e PcCu, bem como suas interações quando ancoradas ao GO por possíveis ligações covalentes ou não covalentes (GO-AF, GO-RB e GO-PcCu). No estado isolado, essas moléculas exibiram padrões específicos de absorção e emissão que refletem suas estruturas eletrônicas e conjugações, enquanto suas associações com o GO resultaram em mudanças espectrais e emissivas que sugerem interações químicas e físicas^{87,138,140,144–148}, bem como interação $\pi-\pi$ ^{142,143}, além de possíveis transferência de carga^{186–189} ou modulação de estados excitados que podem facilitar transferências de energia^{190,191}.

5.1.3.2.1 UV-Vis e Emissão de Fluorescência do GO, AF e GO-AF

O espectro UV-Vis do GO (Figura 24a) apresentou um pico em 289 nm, atribuído às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ de sistemas aromáticos conjugados¹⁹², indicando a preservação parcial da estrutura do grafeno após a oxidação. Observou-se também uma banda ampla e decrescente até ~1000 nm, associada às transições $n \rightarrow \pi^*$ de grupos oxigenados, como carbonilas, epóxidos e hidroxilas¹⁹³. Esse comportamento reflete a heterogeneidade estrutural do GO e o grau de oxidação, que influencia diretamente suas propriedades ópticas.

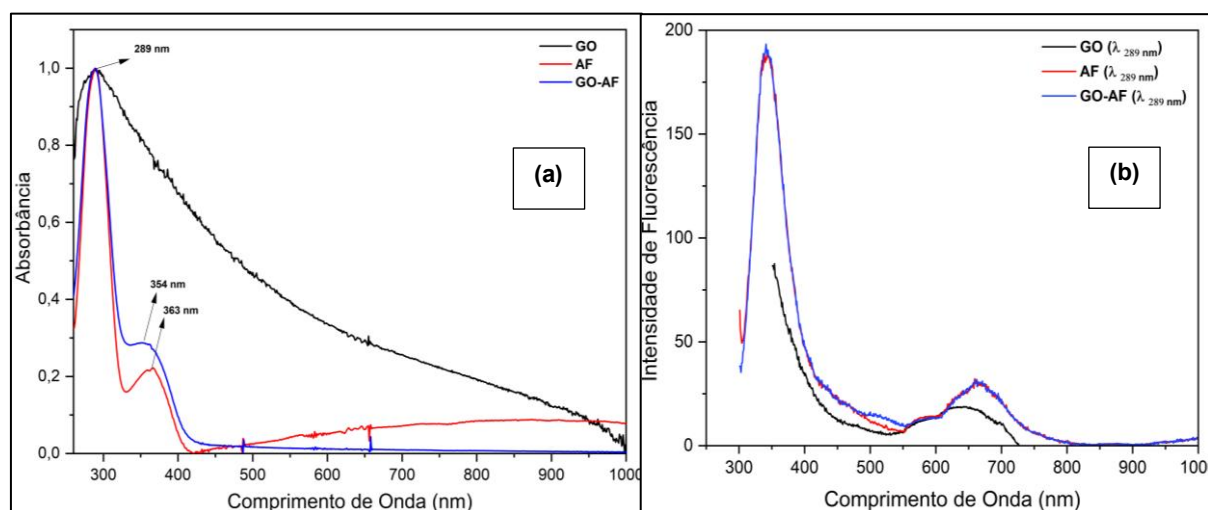


Figura 24 - Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Fluorescência do GO, AF e GO-AF.

Fonte: Próprio autor

A emissão fluorescente do GO (Figura 24b) apresentou pico em ~580 nm, relacionado à recombinação de portadores de carga em domínios π -conjugados interrompidos por grupos oxigenados¹⁹⁴. Esse perfil evidencia a distribuição de estados eletrônicos e a dependência da fluorescência com a estrutura química do material.

Para o AF, o espectro UV-Vis (Figura 24a) apresentou dois picos principais em 289 e 363 nm, atribuídos às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do núcleo aromático e $n \rightarrow \pi^*$ de grupos contendo heteroátomos, respectivamente¹⁹⁵. A banda decrescente até ~415 nm indica redução das transições no visível, enquanto o aumento gradual até 1000 nm sugere efeitos de agregação ou interações intermoleculares.

Na emissão fluorescente (Figura 24b), sob excitação em 289 nm, o AF apresentou múltiplos picos em 340, 579 e 665 nm. Esses resultados refletem diferentes estados excitados, envolvendo transições $\pi^* \rightarrow \pi$, influência de grupos polares e possíveis processos de agregação, evidenciando a complexidade eletrônica da molécula.

Para o sistema GO-AF, o espectro UV-Vis (Figura 24a) manteve o pico em 289 nm e apresentou uma banda em 354 nm, indicando a preservação das transições características do AF após a ancoragem. As pequenas variações observadas sugerem interação com o GO, sem perda significativa da estrutura eletrônica do composto.

Na emissão fluorescente (Figura 24b), a excitação em 289 nm resultou em múltiplos picos, com destaque para 576 nm, associado à contribuição combinada de GO e AF. Os sinais em 342 e 667 indicam a coexistência de diferentes caminhos de relaxamento eletrônico, possivelmente influenciados por interações intermoleculares e pelo ambiente criado pela ancoragem.

5.1.3.2.2 UV-Vis e Emissão de Fluorescência do GO, RB e GO-RB

Os resultados observados no espectro de absorção UV-Vis e emissão de fluorescência do GO, foram mostrados na Figura 24(a e b), no item 5.1.3.2.1. Logo, nesta seção, o espectro UV-Vis da RB (Figura 25a) apresentou três picos principais em 272, 345 e 447 nm¹⁹⁶, associados às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ do sistema conjugado do anel isoaloxazínico. O pico mais intenso em 272 nm está relacionado às transições $\pi \rightarrow \pi^*$, enquanto o sinal em 447 nm, na região visível, está associado às transições $n \rightarrow \pi^*$, indicando a participação de heteroátomos. O comportamento

espectral confirma a elevada conjugação da molécula e sua capacidade de absorver na região UV-visível, característica relevante para aplicações fotossensíveis.

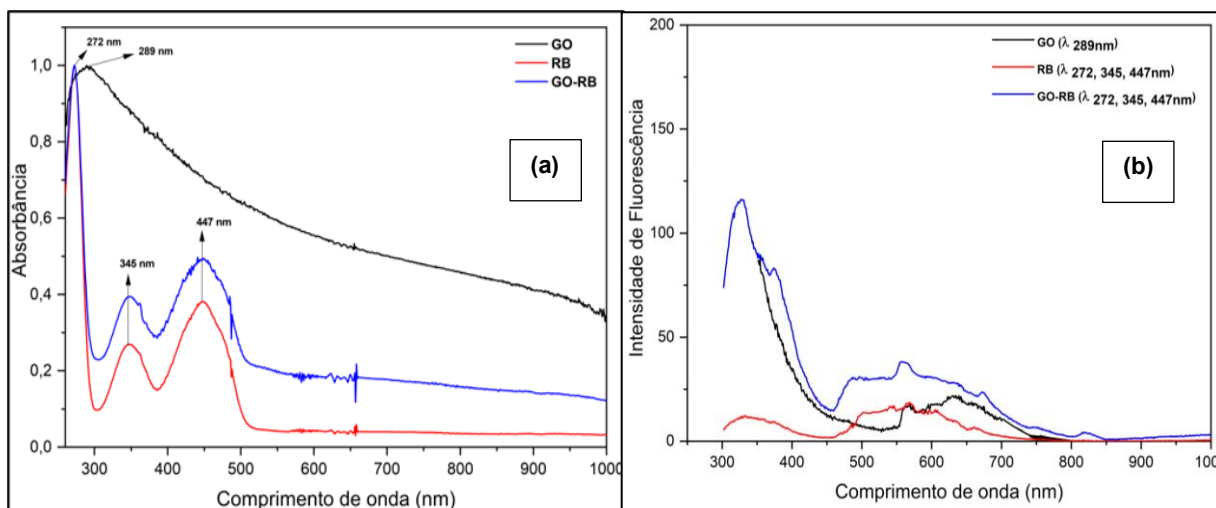


Figura 25 - Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Fluorescência do GO, RB e GO-RB. Fonte: Próprio autor

A emissão fluorescente da RB (Figura 25b), sob excitações em 272, 345 e 447 nm, apresentou banda em torno de 513 nm^{196,197} que se estende até ~660 nm. Esse comportamento indica a presença de um estado emissor dominante, resultado de processos eficientes de conversão interna entre estados excitados. A largura da banda reflete contribuições vibracionais e influência do meio, evidenciando a sensibilidade da RB a interações intermoleculares e ao ambiente.

Para o híbrido GO-RB, o espectro UV-Vis (Figura 25a) manteve o pico em 272 nm, enquanto os sinais em 345 e 447 nm apresentaram aumento de intensidade, sugerindo interação eletrônica entre GO e RB. Esse efeito pode estar associado a empilhamento π - π e possíveis processos de transferência de carga, que aumentam a densidade de estados eletrônicos acessíveis. A presença da banda contínua do GO até ~1000 nm indica a manutenção de suas propriedades ópticas no sistema híbrido.

Na emissão fluorescente (Figura 25b), o GO-RB apresentou dois picos em 513 até 660 nm^{198,199}. O deslocamento e a variação de intensidade sugerem modulação da fluorescência da RB pela presença do GO, possivelmente por transferência de energia ou alterações nos caminhos de relaxamento eletrônico, bem como as características eletrônicas da RB associadas as do GO. A banda larga reforça a complexidade do sistema, indicando múltiplos processos de emissão e interação entre os componentes.

Portanto, a emissão de fluorescência do híbrido GO-RB fornece evidências de que a interação entre o GO e a RB altera as propriedades fotofísicas. A extensão da banda de emissão e os picos distintos indicam uma complexidade na dinâmica do sistema que pode ser explorada para otimizar o desempenho fotodinâmico do híbrido.

5.1.3.2.3 UV-Vis e Emissão de Fluorescência do GO, PcCu e GO- PcCu

Os espectros do GO foram discutidos anteriormente. Para a PcCu (Figura 26a), o UV-Vis apresentou um perfil típico de sistemas altamente conjugados, com banda B (ou banda de Soret) em ~350 nm, atribuída a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ de alta energia^{200,201}. Entre 350–500 nm, observou-se uma região de baixa absorção, característica de ftalocianinas metálicas. Na região visível, destacaram-se dois picos em 635 e 721 nm (banda Q), associados a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ de menor energia, moduladas pelo Cu central^{200–202}. O pico em 721 nm, mais intenso, evidencia a extensão da conjugação eletrônica, enquanto o pico em 635 nm reflete a influência do metal na quebra de degenerescência eletrônica.

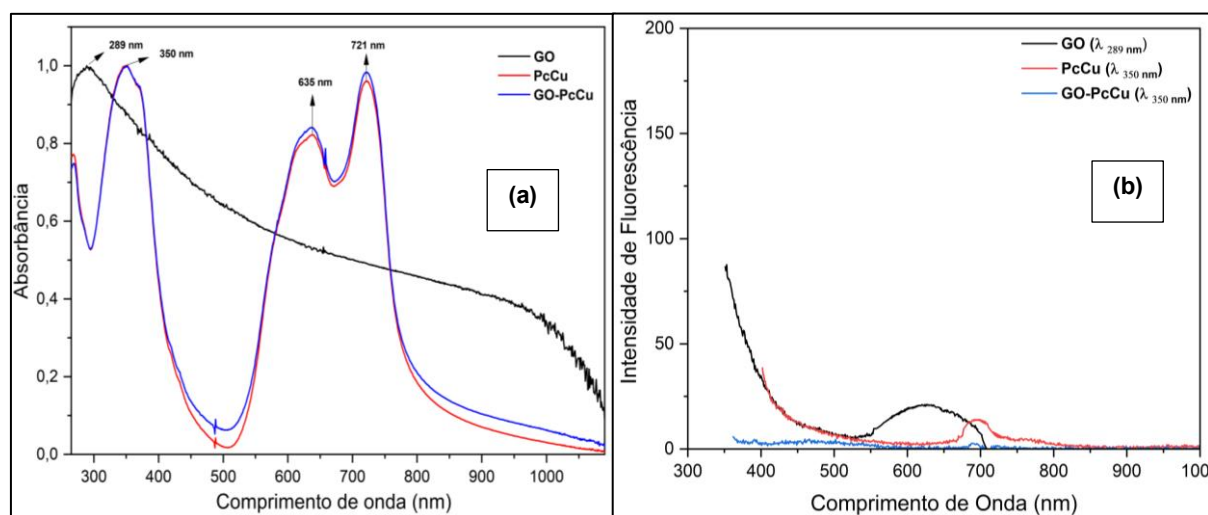


Figura 26 - Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Fluorescência do GO, PcCu e GO-PcCu. **Fonte:** Próprio autor

Na emissão de fluorescência (Figura 26b), a PcCu apresentou um pico principal em torno de 700 nm. Sugerindo estar relacionado à transição singleto fundamental ou estados excitados de menor energia, favorecidos pela interação spin-órbita do cobre^{200,202}.

Para o híbrido GO-PcCu, o espectro UV-Vis (Figura 26a) manteve as bandas características da PcCu, com leve aumento de intensidade, indicando interação sem alteração significativa das transições eletrônicas. Esse comportamento sugere que o

GO atua como suporte, promovendo dispersão e possível sinergia eletrônica, sem comprometer a estrutura da ftalocianina.

Na fluorescência (Figura 26b), o GO-PcCu apresentou picos de menor intensidade na mesma regiões (700 nm). Esse efeito indica que o GO favorece a eficiência emissiva, possivelmente por facilitar transferência de carga e melhor organização das moléculas de PcCu, além disso, o híbrido preserva a resposta espectral da PcCu, enquanto potencializa sua emissão, evidenciando um sistema com propriedades fotofísicas aprimoradas e relevante para aplicações fotoativas.

5.1.4 Características Fotoeletrônicas dos HPG para Aplicações em PDT sob Irradiação NIR

Os resultados apresentados nesta etapa demonstraram que a estratégia de ancoragem de cromóforos orgânicos ao GO, por rotas químicas e físicas, foi bem-sucedida do ponto de vista estrutural.

Entretanto, apesar do sucesso na síntese e caracterização estrutural dos híbridos GO-AF, GO-RB e GO-PcCu, os ensaios preliminares de avaliação funcional, baseados na degradação da sonda química DPBF, não indicaram a geração detectável de $^1\text{O}_2$ sob as condições de irradiação empregadas.

Estes resultados sugerem que, embora haja interação eletrônica entre o GO e os cromóforos ancorados, os híbridos não atenderam ao critério funcional necessário para a PDT ativada na região do NIR.

A ausência de degradação significativa da sonda DPBF não invalida os resultados obtidos, mas aponta para limitações intrínsecas da combinação entre o GO e os cromóforos utilizados nesta etapa do estudo. Do ponto de vista fotofísico, uma possível explicação está relacionada ao fenômeno de supressão de fluorescência promovido pelo GO, amplamente descrito na literatura para sistemas híbridos envolvendo materiais carbonáceos. A proximidade entre o cromóforo e a superfície do GO pode favorecer processos de transferência de carga ou relaxação não radiativa, reduzindo a população do estado tripleto excitado (T_1), etapa essencial para a geração eficiente de $^1\text{O}_2$ por meio do mecanismo de transferência de energia tipo II^{53,57,61}.

Adicionalmente, a faixa espectral de absorção dos cromóforos avaliados nesta etapa constitui um fator limitante importante. A RB e o AF apresentam absorção predominante nas regiões do ultravioleta e do visível, enquanto a PcCu, embora

possua banda Q intensa no visível, apresenta absorção limitada ou indireta na região do NIR.

Considerando que a proposta central deste trabalho é o desenvolvimento de PSs ativáveis em NIR para contornar a interferência da melanina e aumentar a profundidade de penetração da luz, a eficiência desses cromóforos sob irradiação NIR torna-se restrita. Outro aspecto relevante refere-se à agregação molecular, especialmente no caso da PcCu adsorvida fisicamente à superfície do GO. A agregação de ftalocianinas é conhecida por reduzir significativamente o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$, devido ao acoplamento dos éxcitons entre moléculas adjacentes. A adsorção em uma matriz bidimensional como o GO pode intensificar esse efeito, contribuindo para a redução da atividade fotodinâmica observada.

Dessa forma, os resultados obtidos nesta etapa do trabalho permitiram estabelecer critérios para o aprimoramento da plataforma fotodinâmica proposta. Entre os principais critérios destacam-se: (i) a necessidade de cromóforos com absorção intensa e direta na região do NIR; (ii) a preservação dos estados excitados de vida longa, especialmente o estado tripleto, minimizando processos de supressão não radiativa; (iii) o controle da arquitetura de ancoragem para reduzir efeitos de agregação; e (iv) a compatibilidade entre a rota de funcionalização e as propriedades fotofísicas do PS.

Portanto, embora os híbridos GO–AF, GO–RB e GO–PcCu inicialmente propostos não tenham sido efetivos na geração de $^1\text{O}_2$ para aplicação em PDT, os resultados forneceram subsídios para a redefinição da estratégia experimental e para a evolução do sistema PS ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

5.2 EVOLUÇÃO DA PLATAFORMA GO–PS PARA APLICAÇÕES EM PDT ATIVADA NO NIR

A continuidade deste trabalho passou a demandar uma reformulação da estratégia experimental, contemplando tanto a modificação estrutural do GO quanto a seleção de uma espécie química com absorção intrínseca na região do NIR. Dessa forma, a etapa subsequente deste trabalho dedicou-se ao desenvolvimento de um material híbrido (HSG), baseada em GO estruturalmente modificado (mNGO) e funcionalizado com ICG, visando superar as limitações identificadas e avançar na obtenção de sistemas PSs adequados para aplicações em PDT e PTT no tratamento do melanoma.

5.3 ESTUDO DA MUDANÇA ESTRUTURAL E SUPERFICIAL DO GO

Nesta nova etapa, a modificação estrutural e superficial do GO foi explorada como estratégia central para a obtenção de um material multifuncional, envolvendo processos de incorporação de grupos amino e nanopartículas magnéticas, que permitiria a funcionalização e/ou ancoragem de moléculas orgânicas, conforme exemplificado pela Figura 27. Essas transformações promovem alterações significativas na densidade de defeitos, na distribuição dos grupos funcionais e na organização da rede carbonácea, refletindo-se em mudanças nas propriedades eletrônicas, ópticas, magnéticas e interfaciais do material.

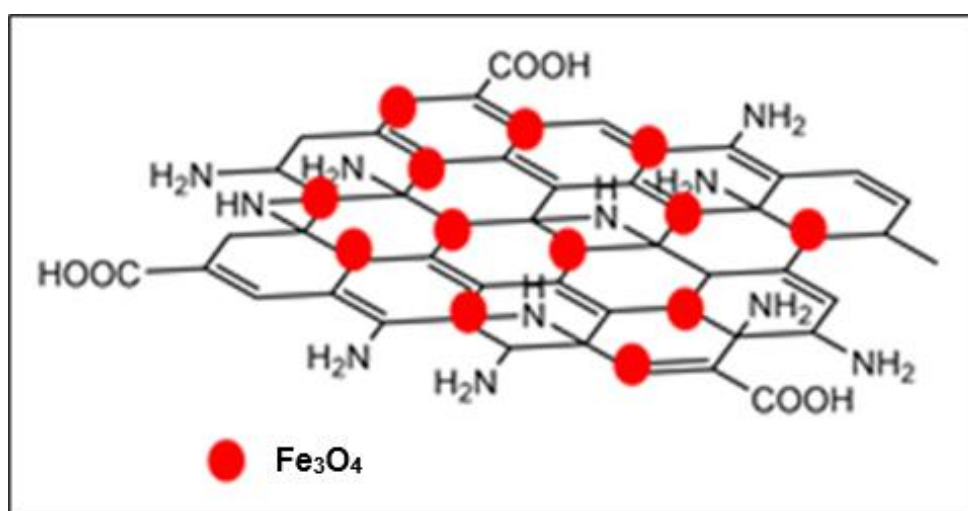


Figura 27 - Plataforma Estruturada de GO Modificada. **Fonte:** Próprio autor

A introdução de nitrogênio, por exemplo, introduz defeitos controlados na rede do grafeno e modifica a densidade eletrônica local, favorecendo interações com espécies bioativas e potencializando a transferência de carga e energia. De forma complementar, a incorporação de nanopartículas magnéticas, especialmente óxidos de ferro superparamagnéticos, contribui para a formação de heteroestruturas com propriedades magnéticas e amplia a funcionalidade do sistema, possibilitando aplicações em direcionamento externo, bioimagem e terapias combinadas. Adicionalmente, a ancoragem de PS, como a ICG, permitiria integrar propriedades fotofísicas e fotoquímicas ao HSG, potencializando a geração de $^1\text{O}_2$ e a resposta fototérmica.

Nesse contexto, a compreensão dos mecanismos envolvidos na mudança estrutural e superficial do GO é fundamental para o controle da rota sintética e para a interpretação das propriedades observadas nos compósitos obtidos. Assim, nos tópicos subsequentes são discutidos o papel dos reagentes na formação dos sistemas híbridos e os efeitos da síntese hidrotermal assistida por micro-ondas para modificação estrutural e funcional do GO.

5.3.1 Papel dos Reagentes na Formação do mNGO

O desenvolvimento de materiais magnéticos funcionalizados com nitrogênio baseados em GO demanda o emprego de reagentes que promovam a modificação superficial, dopagem heteroatômica e incorporação de fases magnéticas. Nesse contexto, o etilenoglicol, a ureia, o acetato de sódio, o PEG-6000 e os sais de ferro são reagentes fundamentais para controlar a morfologia, a funcionalização química e as propriedades magnéticas dos nanomateriais formados.

O etilenoglicol atua como um solvente de alto ponto de ebulição que viabiliza o ambiente hidrotermal necessário para a reação, ao mesmo tempo que exerce papel como agente redutor suave. Sua ação promove a redução parcial do GO, facilitando a ancoragem de nanopartículas e melhorando a dispersão do material durante o aquecimento por micro-ondas²⁰³. Além disso, sua polaridade e viscosidade favorecem a estabilização coloidal do sistema, essencial para evitar a aglomeração das nanopartículas em formação²⁰⁴.

A ureia é amplamente utilizada como principal fonte de nitrogênio na dopagem da estrutura grafênica. Durante o tratamento térmico, sua decomposição libera espécies nitrogenadas como amônia e isocianato, que reagem com os grupos oxigenados do GO, resultando na introdução de grupos amina e amida na superfície do compósito²⁰⁵. Esse processo não apenas aumenta a condutividade elétrica e a reatividade superficial do material, como também contribui para a formação de defeitos eletrônicos controlados que favorecem a interação com espécies moleculares e catalíticas²⁰⁶.

O acetato de sódio desempenha um papel crucial no controle do pH da solução, ajustando-o para valores levemente alcalinos que favorecem a coprecipitação controlada dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , possibilitando a formação de nanopartículas de magnetita, fase responsável pela propriedade superparamagnética do compósito²⁰⁷. Esse controle de pH é fundamental para evitar a formação de fases menos desejáveis,

como a hematita (Fe_2O_3), comum em condições mais ácidas. No presente estudo, a medição do pH no final da etapa de preparação revelou um valor de 9,1, confirmando o ambiente alcalino necessário para o crescimento direcionado das fases magnéticas (Fe_3O_4) e a eficácia do tampão proporcionado pelo acetato de sódio.

Já o PEG-6000 é empregado como agente estabilizante estérico. Ele se adsorve na superfície das nanopartículas em crescimento e previne sua aglomeração por meio de barreiras estéricas, promovendo melhor dispersão e aumento da área superficial do material final²⁰⁸. Essa estabilização é essencial para preservar a funcionalidade do compósito em aplicações em biomedicina e catálise.

A escolha dos sais de ferro também é determinante. A utilização combinada de Fe^{3+} e Fe^{2+} , geralmente na razão molar de 2:1, favorece a formação de magnetita com propriedades superparamagnéticas adequadas para aplicações como hipertermia magnética e direcionamento externo²⁰⁹.

Finalmente, o uso de aquecimento assistido por micro-ondas a 180°C por 30 minutos proporciona uma rápida e homogênea transferência de energia ao sistema, promovendo de forma simultânea a redução parcial do GO, a dopagem com nitrogênio e a formação das nanopartículas magnéticas, reduzindo significativamente o tempo de reação e aumentando a reprodutibilidade do processo^{210,211}.

5.3.2 Síntese Hidrotermal Assistida por Micro-ondas

A síntese propriamente dita foi conduzida por meio de um processo hidrotermal assistido por micro-ondas, técnica que se destaca pela sua elevada eficiência energética, controle de parâmetros reacionais e capacidade de promover reações rápidas e uniformes em escala nanométrica.

A aplicação de micro-ondas induz um aquecimento dielétrico direto sobre os constituintes polares da mistura reacional, promovendo a transferência de energia de maneira volumétrica e homogênea, o que resulta em um aumento significativo da taxa de nucleação e em um crescimento controlado das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 sobre a superfície funcionalizada do GO^{203,206}. Simultaneamente, o ambiente térmico gerado favorece a redução parcial das folhas de GO, contribuindo para a restauração parcial da conjugação π da rede grafênica e melhorando sua condutividade elétrica.

A presença de ureia como precursor nitrogenado desempenhou papel essencial nesse contexto, uma vez que sua decomposição térmica sob aquecimento

assistido por micro-ondas sugeriu a efetiva funcionalização do GO com átomos de nitrogênio que será evidenciada indiretamente mais adiante nos estudos de espectroscopia Raman e PZ. Essa incorporação ocorre preferencialmente em sítios defeituosos e nas bordas das folhas grafênicas, promovendo modificações nas propriedades eletrônicas e aumentando a afinidade do material com espécies moleculares e radicais livres²⁰⁵.

A Figura 28 ilustra os parâmetros empregados durante o processo de síntese do mNGO e NGO como temperatura, tempo de reação, pressão interna e potência de micro-ondas, os quais foram otimizados para assegurar nucleação e crescimento controlado das nanopartículas, no caso do mNGO, além de garantir sua distribuição homogênea sobre a matriz lamelar do GO, minimizando a aglomeração e favorecendo interações interfaciais fortes entre as fases orgânica e inorgânica.

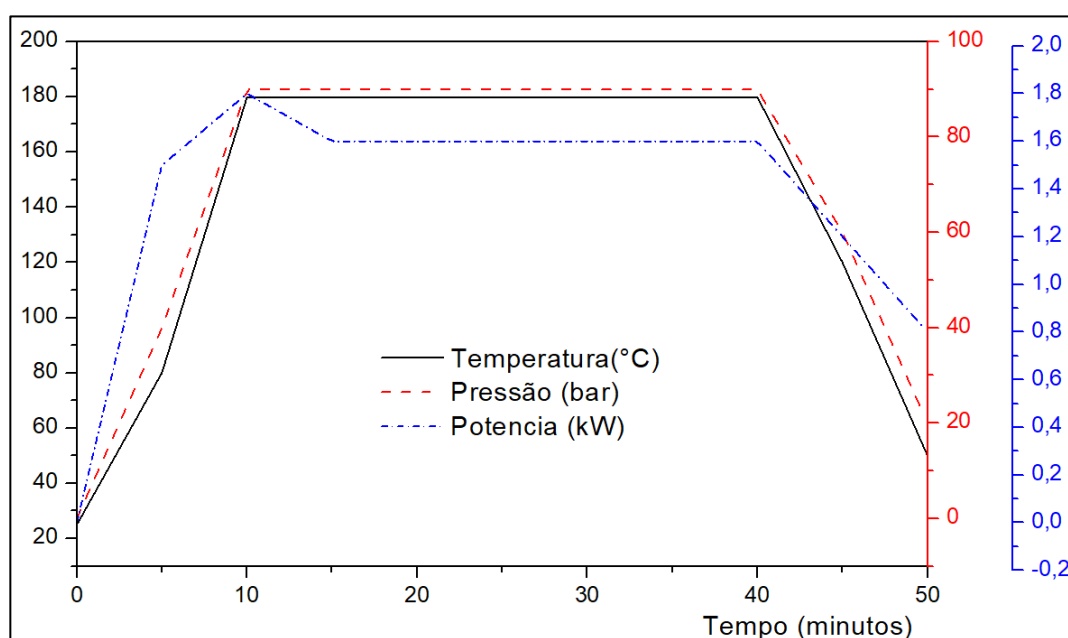


Figura 28 - Parâmetros de Síntese em Única Etapa do mNGO e NGO.
Fonte: Próprio autor

Em comparação aos métodos hidrotérmicos convencionais, esta abordagem via micro-ondas mostrou-se significativamente mais eficiente, reduzindo o tempo total de síntese de horas para minutos, com consequente economia de energia e melhoria da qualidade morfológica e cristalina do compósito obtido²¹¹. O compósito final apresentou arquitetura lamelar preservada, recoberta uniformemente por nanopartículas de Fe_3O_4 intimamente ancoradas, confirmando uma integração estruturada e coesa entre as fases. Essa morfologia será evidenciada por meio de

análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), as quais serão abordadas em seção específica adiante, permitindo a visualização direta da distribuição, do tamanho médio e da interface entre as nanopartículas e a matriz grafênica, além de fornecer subsídios para a correlação entre estrutura e propriedades funcionais do compósito.

A introdução de espécies nitrogenadas contribuiu para o aumento da densidade de defeitos estruturais, e para a resposta fotoativa sob irradiação na faixa do NIR, tornando o mNGO altamente atrativo para aplicações biomédicas multifuncionais, como PDT e PTT e sistemas ativáveis por luz^{209,210}.

Portanto, conclui-se que a rota hidrotermal assistida por micro-ondas empregada neste estudo permite a obtenção de um material com propriedades físico-químicas superiores às observadas em GO puro, integrando, em uma única plataforma, magnetismo, fotoatividade e potencial biocompatibilidade, aspectos fundamentais para tecnologias aplicadas à saúde e ao meio ambiente.

5.4 ESTUDO DE ADSORÇÃO DO ICG NO mNGO (HSG)

A ancoragem via adsorção do ICG sobre o mNGO resultou na formação do híbrido mNGO@ICG, evidenciando elevada afinidade entre o fotossensibilizador e a superfície do compósito. Esse comportamento está diretamente relacionado à natureza estrutural do mNGO, que combina domínios grafíticos (sp^2), grupos funcionais oxigenados e espécies nitrogenadas introduzidas durante a síntese. A dopagem com nitrogênio promove a presença de grupos amínicos e/ou nitrogenados protonáveis que, em pH próximo ao fisiológico ($\approx 6,8$), contribuem para a modulação da carga superficial do material, conforme sugerido pelos valores positivos nos estudos de caracterização pelo PZ, mais adiante. Essa característica favorece a interação eletrostática com a ICG, que apresenta caráter aniônico em meio aquoso, intensificando sua adsorção. Paralelamente, o empilhamento π - π entre os anéis aromáticos da ICG e as regiões conjugadas do grafeno, bem como interações do tipo ligação de hidrogênio, atuam de forma sinérgica no processo de ancoragem. A presença de nanopartículas magnéticas contribui adicionalmente para a heterogeneidade química da superfície, ampliando os sítios ativos e favorecendo múltiplos modos de interação. A eficiência da separação magnética e a estabilidade do material após sucessivos ciclos de lavagem indicam uma ancoragem robusta, com baixa tendência à dessorção, enquanto a elevada razão mássica mNGO:ICG favorece

a dispersão homogênea do corante, reduzindo processos de agregação que seria uma característica dessa molécula.

Adicionalmente, é importante destacar que a ICG livre apresenta reconhecida instabilidade fotofísica e fotoquímica, sendo suscetível à degradação e perda de eficiência sob irradiação, especialmente na região do infravermelho próximo. No entanto, quando ancorada ao mNGO, observa-se uma melhora significativa na estabilidade dessas propriedades, conforme evidenciado pelos resultados de UV-Vis e pelos ensaios sob irradiação em 808 nm, que serão apresentados. Essa estabilização pode ser atribuída à interação com a matriz do mNGO, que atua como suporte protetor, reduzindo processos de fotodegradação e favorecendo a manutenção das propriedades ópticas da ICG. Em conjunto, esses resultados sugerem que a modificação estrutural do GO não apenas favorece a adsorção eficiente do fotossensibilizador, mas também contribui para a sua estabilização fotofísica, constituindo uma plataforma mais robusta e promissora para aplicações em PDT sob excitação NIR.

5.5 HÍBRIDOS HSG: INTERPRETAÇÃO DAS CARACTERIZAÇÕES

O HSG foi amplamente caracterizado por diferentes técnicas, a fim de elucidar suas propriedades estruturais, químicas, ópticas e funcionais. As análises por MEV evidenciaram a morfologia do material e a presença de nanopartículas magnéticas distribuídas sobre a matriz grafênica, enquanto os espectros de FT-IR e Raman confirmaram a presença de grupos funcionais, defeitos estruturais e modificações associadas à dopagem e funcionalização. A espectroscopia UV-Vis demonstrou a manutenção e estabilização das bandas características do fotossensibilizador após a ancoragem, característica da interação eficiente com o mNGO. Além disso, os ensaios com a sonda DPBF indicaram a capacidade do sistema em gerar $^1\text{O}_2$ sob irradiação NIR a 808 nm, evidenciando o aprimoramento fotodinâmico em relação aos sistemas iniciais. Adicionalmente, os estudos de fluorescência revelaram alterações nos processos de recombinação eletrônica e nos estados excitados, enquanto as medições de PZ confirmaram a modulação da carga superficial e a estabilidade coloidal moderada do sistema. Em conjunto, esses resultados demonstram que o HSG apresenta propriedades estruturais e fotofuncionais otimizadas, sugerindo uma plataforma eficiente para aplicações da PDT em melanoma.

5.5.1 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura do Graf, GO e mNGO

As micrografias obtidas por MEV (Figura 29) evidenciam a evolução morfológica das amostras ao longo das etapas de modificação do GO e incorporação das fases magnéticas (mNGO).

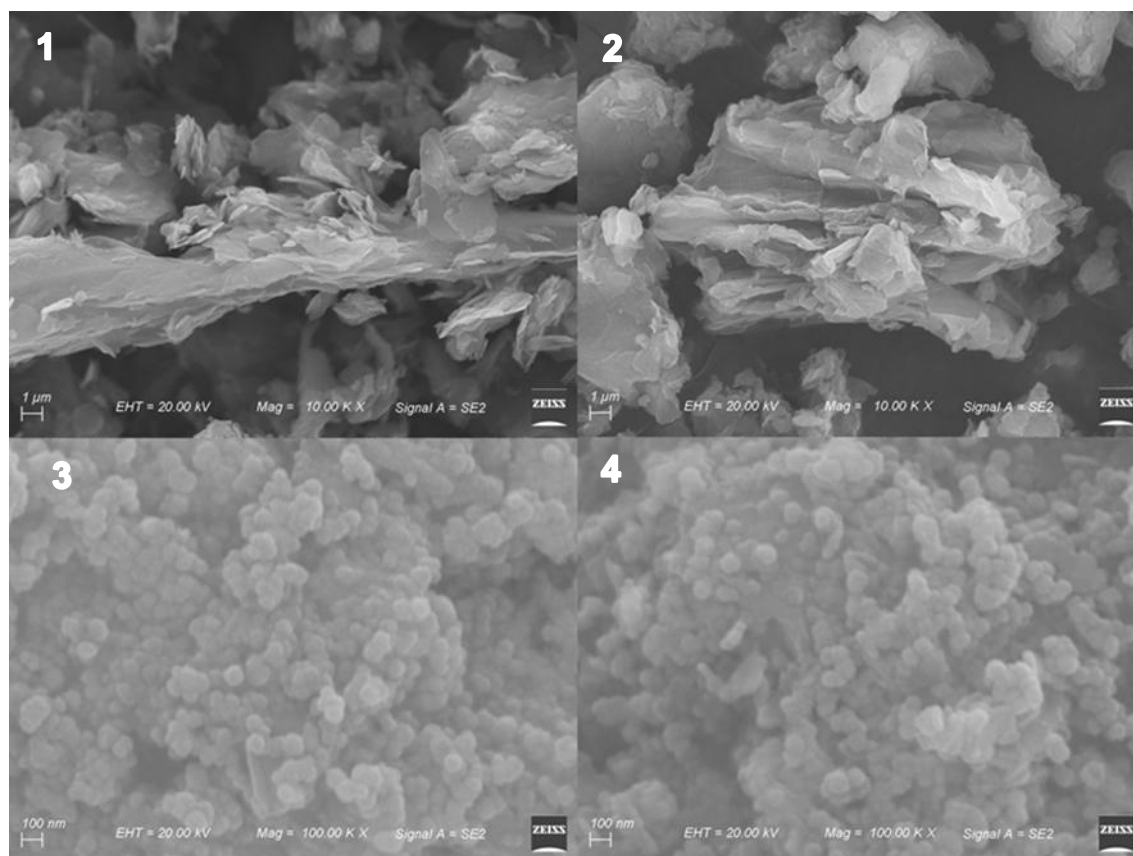
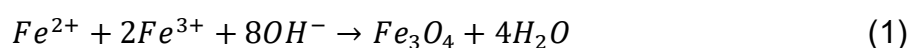


Figura 29 - Microscopia Eletrônica de Varredura do Grafite, GO e mNGO. 1: Grafite; 2: Óxido de Grafeno; 3 e 4: GO Funcionalizado com sais de Fe (mNGO). Fonte: Próprio autor

Após o processo de oxidação via método de Hummers modificado, mostrado na Figura 29-2, observa-se uma alteração significativa da morfologia, evidenciada pela formação de folhas delaminadas e deformadas, com aumento do espaçamento interlamelar e da rugosidade superficial. Essa transformação é atribuída à introdução de grupos funcionais oxigenados (hidroxila, epóxido e carboxila) entre as camadas grafiticas, promovendo repulsão eletrostática e maior interação com moléculas polares. O resultado é a obtenção de um GO altamente hidrofílico e estruturalmente expandido, ideal para servir de plataforma reativa para ancoragem de espécies, químicas, metálicas e dopantes heteroatômicos¹⁶⁴.

As amostras modificadas magneticamente, observadas nas Figuras 29-3 e 29-4, apresentam morfologias distintas aos precursores utilizados na síntese hidrotermal assistida por micro-ondas. Observa-se uma distribuição homogênea de nanopartículas esféricas de dimensões entre 20 e 80 nm aderidas à superfície do GO. Essa morfologia uniforme e finamente dispersa é indicativa de formação de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), cuja geração depende da presença simultânea de íons ferrosos e férricos em solução, conforme a reação de co-precipitação^{163,212}, ilustrada pela equação 1:



A predominância de partículas com morfologia arredondada ou quase esférica pode ser atribuída à tendência termodinâmica de minimização da energia superficial. Em sistemas coloidais, a geometria esférica apresenta a menor razão entre área e volume, o que contribui para a redução da energia livre total associada à interface sólido-líquido. Durante a etapa de crescimento das nanopartículas, a nucleação ocorre de forma isotrópica, favorecendo a expansão equânime dos núcleos em todas as direções cristalográficas. Esse comportamento é intensificado pelas condições homogêneas de aquecimento proporcionadas pela irradiação por micro-ondas, a qual assegura uma transferência de energia rápida e uniforme, evitando a formação de gradientes térmicos e permitindo um crescimento simultâneo, controlado e uniforme das nanopartículas magnéticas^{163,212}.

A Figura 30 ilustra qualitativamente a resposta magnética do compósito frente à aplicação de um campo magnético estático, evidenciando a incorporação bem-sucedida das nanopartículas de magnetita na matriz de GO.

As micrografias obtidas corroboram a eficácia da funcionalização magnética do óxido de grafeno, evidenciando ainda a influência direta da razão molar entre íons Fe^{3+} e Fe^{2+} na formação, morfologia e distribuição das nanopartículas de magnetita.

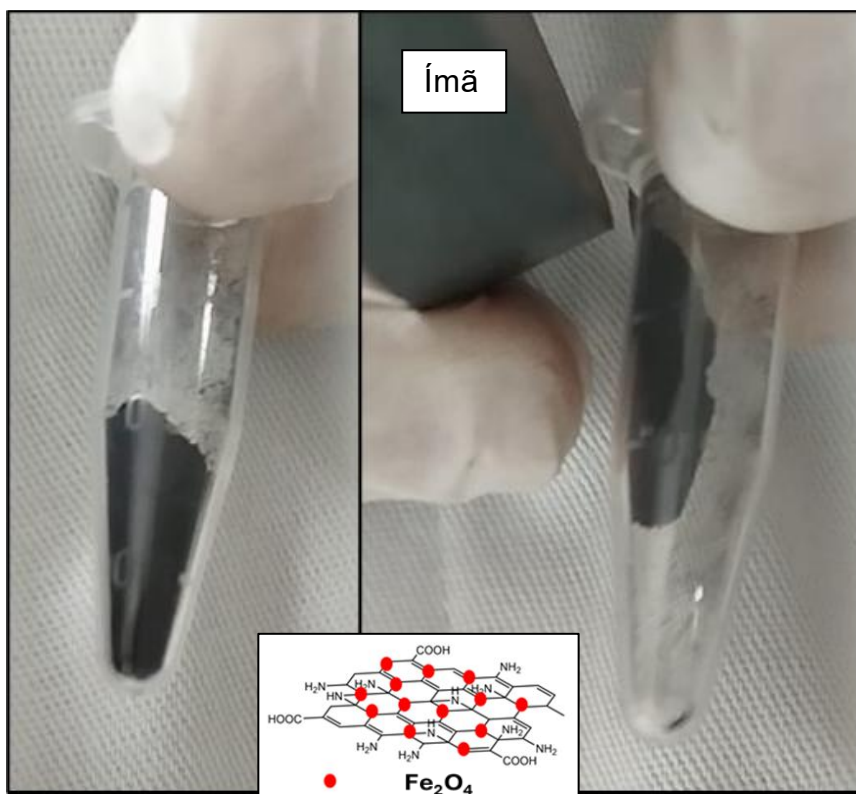
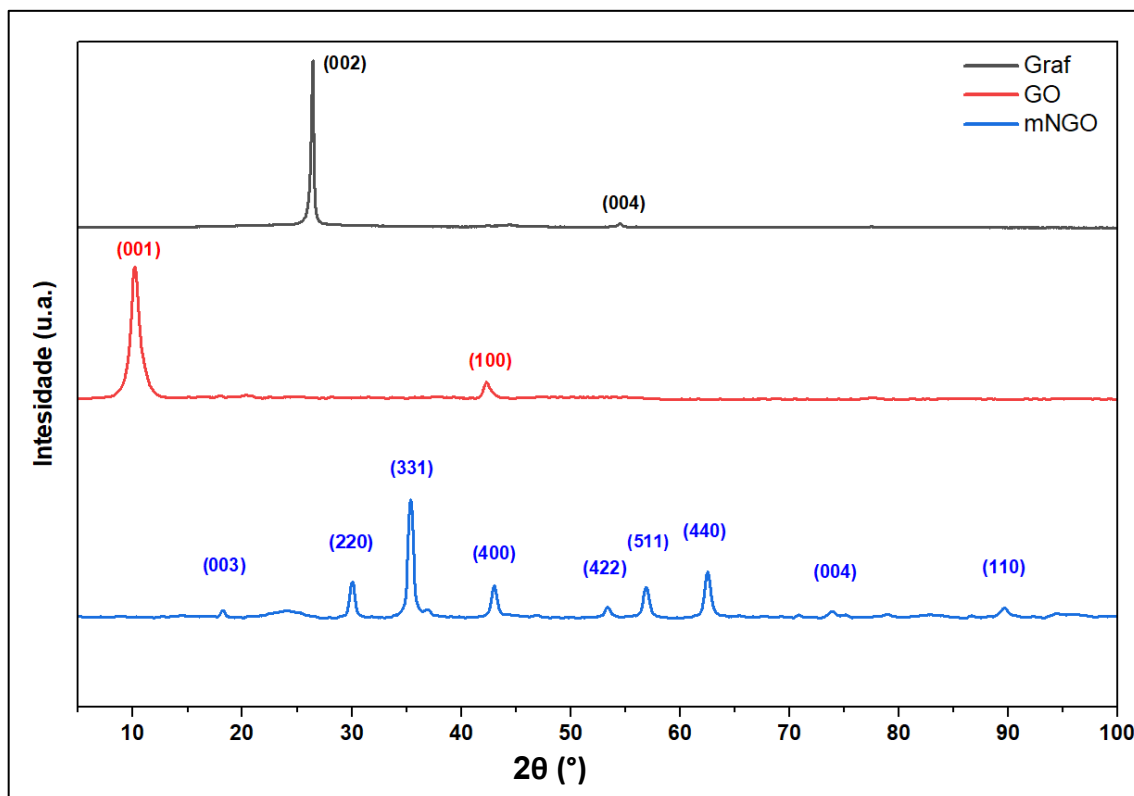


Figura 30 - Demonstração da Resposta Magnética do Compósito mNGO na Presença de um Campo Magnético Externo (ímã). Fonte: Próprio autor

A metodologia hidrotermal assistida por micro-ondas demonstrou elevada eficiência, promovendo nucleação rápida e homogênea, além de um controle morfológico superior ao observado em rotas hidrotérmicas convencionais. Essa característica é particularmente relevante para aplicações biomédicas, nas quais a uniformidade estrutural e a dimensão nanométrica das partículas exercem papel crucial na resposta magnética, na estabilidade coloidal e na eficiência de mecanismos terapêuticos.

5.5.2 Caracterização por Difractometria de Raios X do Graf, GO e mNGO

A Figura 31 apresentada exibe os difratogramas de raios X obtidos para o Graf, GO sintetizado pelo método de Hummers modificado e o compósito magnético mNGO preparados por rota hidrotermal assistida por micro-ondas, sendo que em ambos os casos houve adição de ureia como fonte de nitrogênio para promover a dopagem do material²¹³.



**Figura 31 - Difratomogramas de Raios X do Graf, GO e mNGO. Graf: Grafite; GO: Oxido de Grafeno; mNGO: GO Funcionalizado (rota hidrotermal assistida).
Fonte: Próprio autor**

O difratograma do graf (traço preto) revela um pico intenso e estreito em $2\theta \approx 26,4^\circ$, correspondente ao plano (002), além de um segundo pico em torno de 54° , referente ao plano (004). Estes picos são característicos da estrutura hexagonal altamente ordenada do grafite, refletindo seu elevado grau de cristalinidade e empilhamento regular das camadas de grafeno²¹⁴.

A amostra do GO (traço vermelho) observa-se a extinção do pico em $2\theta \approx 26,4^\circ$ e o surgimento de um novo pico intenso em aproximadamente $10-11^\circ$, atribuído ao plano (001). Esse deslocamento sugere o aumento do espaçamento interlamelar ($d_{001} \approx 0,8$ nm), decorrente da introdução de grupos oxigenados e moléculas de água entre as camadas de grafeno²¹⁵. Tal modificação estrutural confirma a oxidação e esfoliação parcial do grafite durante o processo de síntese via método de Hummers modificado. Adicionalmente, um pico secundário de baixa intensidade próximo a 42° é atribuído ao plano (100), típico de estruturas lamelares desordenadas do GO.

O difratograma do composto magnético mNGO evidencia a conversão completa da estrutura lamelar do GO em sistemas contendo fases cristalinas de óxidos de ferro com estrutura tipo espinela. São identificados picos em $2\theta \approx 30,2^\circ$

(220), 35,5° (311), 43,1° (400), 53,5° (422), 57° (511) e 62,6° (440), os quais correspondem à magnetita (Fe_3O_4), conforme o padrão JCPDS 19-0629²¹⁶. A ausência do pico (001) do GO original sugere que, durante a síntese hidrotermal, houve redução parcial do óxido de grafeno, com consequente formação de rGO, propiciando a ancoragem eficaz das nanopartículas magnéticas. A presença de íons Fe^{2+} no meio reacional favoreceu a formação da fase mista $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ característica da magnetita, resultando em picos mais intensos e definidos, evidenciando cristalinidade aprimorada e maior tamanho de cristalito²¹⁵.

Dessa forma, os resultados obtidos por difração de raios X demonstram com clareza a transformação estrutural do grafite em GO a partir do método de Hummers modificado, bem como a formação eficiente do mNGO após o tratamento hidrotermal assistido por micro-ondas. A presença predominante de picos característicos da magnetita (Fe_3O_4), juntamente com a ausência do pico (001) do GO, confirma a redução parcial do material e a incorporação eficaz das nanopartículas magnéticas sobre a matriz carbonácea. A ureia, empregada como agente redutor e dopante, contribuiu para a introdução de defeitos estruturais e possível introdução de grupos de nitrogênio, sem a geração de novas fases cristalinas detectáveis por DRX^{213,217}. Assim, os dados difratométricos comprovam o sucesso das rotas sintéticas propostas, resultando em materiais com estrutura cristalina bem definida, estabilidade e potencial promissor para aplicações biomédicas multimodais, especialmente em abordagens terapêuticas baseadas em fototérmica e fotodinâmica.

5.5.3 Caracterização por Espectroscopia Raman do Graf, GO, NGO e mNGO

A espectroscopia Raman é uma técnica amplamente empregada na caracterização estrutural de materiais carbonosos, permitindo avaliar o grau de desordem, a presença de defeitos e o tipo de hibridização do carbono. A Figura 32 apresenta os espectros Raman obtidos para as amostras de graf, GO, e o material funcionalizado, NGO e mNGO.

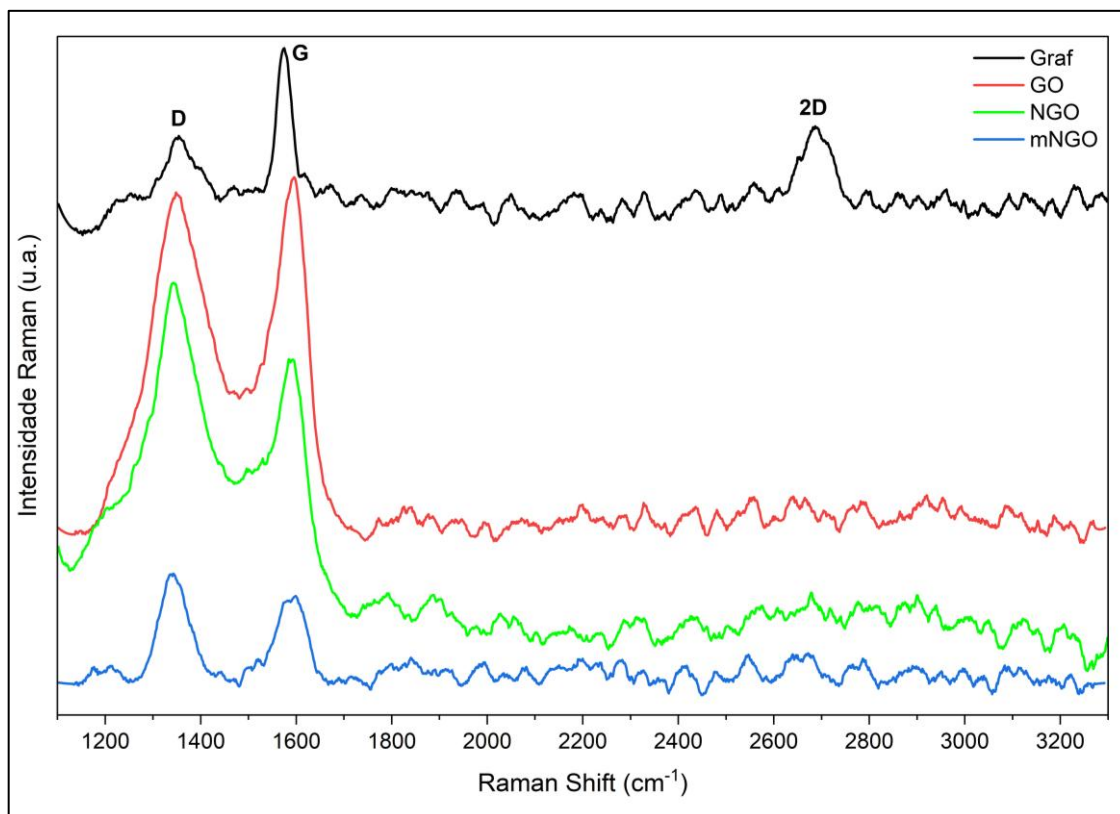


Figura 32 - Espectroscopia Raman do Graf, GO, NGO e mNGO. Graf: Grafite; GO: Óxido de Grafeno; NGO: Funcionalização do óxido de grafeno sem os sais de Fe (rota hidrotermal assistida); mNGO: Funcionalização do óxido de grafeno com os sais de Fe (rota hidrotermal assistida). **Fonte:** Próprio autor

Os espectros exibem as bandas características dos materiais à base de carbono: a banda D, centrada em torno de 1350 cm^{-1} , associada ao modo de fônon A_{1g} ativado pela presença de defeitos estruturais; a banda G, em aproximadamente 1580 cm^{-1} , correspondente à vibração E_{2g} dos átomos de carbono sp^2 ; e a banda 2D, próxima de 2690 cm^{-1} , atribuída à segunda ordem do modo D, sensível ao número de camadas e ao empilhamento das folhas gráficas²¹⁸⁻²²⁰.

O espectro do graf apresenta um pico G com intensidade Raman acentuada (235,55) e um pico D pouco pronunciado (138,92), resultando em uma razão $I(D)/I(G) = 0,59$. Essa relação indica alta cristalinidade e baixo grau de desordem, característica de materiais gráfiticos bem ordenados, nos quais os domínios sp^2 são extensos e a presença de defeitos é mínima. O pico 2D, observado em aproximadamente 2690 cm^{-1} (134,43), apresenta-se bem definido e simétrico, evidenciando o empilhamento do tipo AB e confirmando a natureza gráfitica do material²¹⁹.

O GO, por outro lado, apresentou intensificação da banda D (346,79) e ligeira redução do pico G (325,45), com $I(D)/I(G) = 1,07$. Esse aumento da razão é

consequência da introdução de grupos oxigenados, como hidroxilas, epóxidos, carbonilas e carboxilas, que interrompem a conjugação da rede sp^2 e promovem a formação de sítios sp^3 . Esse comportamento é típico do processo de oxidação do grafite, conforme relatado por Stankovich *et al.* (2007), e indica uma estrutura mais defeituosa e heterogênea²¹⁸. A diminuição da intensidade e o alargamento do pico 2D confirmam a redução da ordem eletrônica e o aumento do desordenamento estrutural.

A amostra NGO, obtida por tratamento hidrotermal do GO na presença de ureia e na ausência de sais de ferro, apresentou $I(D)/I(G) = 1,18$, indicando aumento adicional da desordem estrutural em relação ao GO. Esse comportamento sugere que o tratamento hidrotermal promove modificações adicionais na rede carbônica, associadas tanto à redução parcial do GO quanto à incorporação de espécies nitrogenadas provenientes da decomposição térmica da ureia²²¹. A literatura descreve que a ureia pode atuar simultaneamente como agente redutor e fonte de nitrogênio, favorecendo a formação de diferentes configurações nitrogenadas na rede de carbono, como nitrogênio piridínico, pirrólico e grafítico, que introduzem defeitos estruturais adicionais e modificam a estrutura eletrônica do material^{162,221–224}.

Na amostra de mNGO, os espectros apresentaram intensidades Raman $I(D)$ $I(D) = 191,68 / I(G) = 144,74$, resultando em $I(D)/I(G) = 1,32$. O aumento da razão $I(D)/I(G)$ em relação ao GO reflete a introdução de novos defeitos estruturais decorrentes da funcionalização química. Durante o tratamento hidrotermal, a ureia se decompõe em amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2), gerando espécies nucleofílicas que reagem com os grupos oxigenados do GO, originando grupos amino ($-NH_2$) e amida ($-CONH-$)^{221,225,226}.

De acordo com o modelo proposto por Ferrari e Robertson (2000)²²⁷, valores de $I(D)/I(G)$ superiores a 1 indicam a presença de domínios sp^2 nanocristalinos, com tamanho médio inferior a 5 nm, o que corresponde ao regime de desordem intermediária. Isso sugere que as amostras funcionalizadas mantêm parte da estrutura grafítica, mas apresentam elevada densidade de defeitos, coerente com a presença de grupos contendo nitrogênio e ferro^{219,227}.

Portanto, a funcionalização do GO em meio hidrotermal com ureia e sais de ferro promoveu a formação de um composto híbrido (mNGO), no qual coexistem regiões grafíticas parcialmente preservadas e áreas funcionalizadas com grupos oxigenados e nitrogenados coordenados a íons de ferro.

Os resultados evidenciam a transição gradual de uma estrutura gráfica ordenada (grafite) para um sistema altamente funcionalizado e defeituoso (mNGO). A evolução da razão $I(D)/I(G)$ de 0,59 para 1,32 confirma o aumento progressivo da desordem, conforme descrito por Ferrari e Robertson (2000), representando a transição do regime cristalino para o nanocristalino desordenado.

5.5.4 Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho do Graf, GO e mNGO

Os espectros de FT-IR apresentados na Figura 33, evidenciam de forma clara a evolução estrutural do graf, GO e do mNGO.

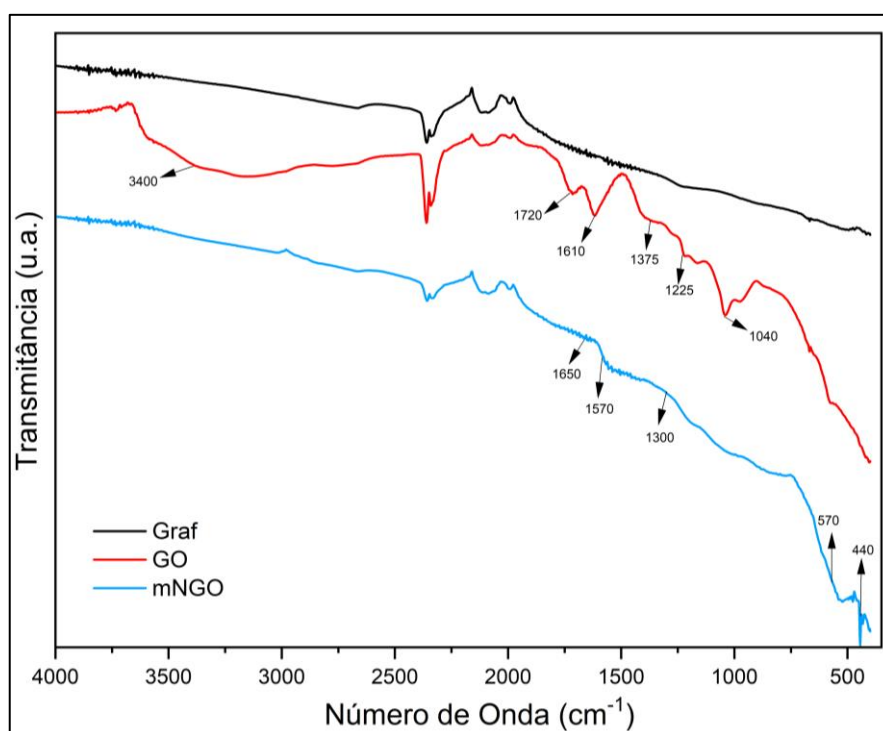


Figura 33 - Espectroscopia de Infravermelho do Graf, GO e mNGO. Graf: Grafite; GO: Oxido de Grafeno; mNGO: GO Funcionalizado (rota hidrotermal assistida). Fonte: Próprio autor

O grafite apresenta um perfil praticamente inerte no infravermelho, sem banda larga de estiramento O–H (na faixa de 3000–3600 cm^{-1}), sem absorção de estiramento C=O em torno de 1720 cm^{-1} e com ausência de sinais intensos na região entre 1250 e 1000 cm^{-1} . Esse comportamento confirma a natureza altamente ordenada e pouco funcionalizada do grafite, composta basicamente por ligações C=C em estrutura gráfica²²⁸.

Após o processo de oxidação pelo método de Hummers modificado, o espectro do GO passou a exibir um conjunto de bandas características dos grupos oxigenados introduzidos na estrutura. Observa-se uma banda muito larga em aproximadamente 3400 cm^{-1} , atribuída ao estiramento O–H de hidroxilas e possível hidratação, indicando a presença de grupos hidroxílicos e possivelmente forte interação por pontes de hidrogênio. A banda intensa em $1720\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ corresponde ao estiramento C=O de grupos carboxílicos e anidrílicos localizados nas bordas das folhas de grafeno. Na região de $1610\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ ocorre uma absorção associada à deformação angular H–O–H da água adsorvida, sobreposta ao estiramento C=C do esqueleto aromático residual do grafeno parcialmente oxidado. Bandas em torno de $1360\text{--}1390\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas à deformação angular C–OH de fenóis e álcoois, enquanto as absorções em $1210\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ e $1040\text{--}1080\text{ cm}^{-1}$ referem-se respectivamente ao estiramento C–O–C de grupos epóxi e ao estiramento C–O de álcoois e éteres. Esse conjunto confirma a inserção eficiente de oxigênio e a presença de diferentes grupos funcionais oxigenados no GO²²⁹.

No compósito mNGO, preparados por aquecimento hidrotermal assistido por micro-ondas, observa-se uma redução significativa das intensidades das bandas de estiramento O–H na faixa de $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, de estiramento C=O em torno de 1720 cm^{-1} e de estiramento C–O–C na faixa de $1210\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$. Essa atenuação sugere redução parcial do GO durante o tratamento, promovendo a recuperação da conjugação eletrônica π entre os planos grafênicos. Simultaneamente, surgem novas bandas em aproximadamente $580\text{--}570\text{ cm}^{-1}$ e $480\text{--}440\text{ cm}^{-1}$, correspondentes ao estiramento Fe–O em sítios tetraédricos e octaédricos, o que confirma a formação de óxidos de ferro nanocristalinos (magnetita ou maghemita) ancorados sobre as folhas de GO²³⁰.

Na região de $1570\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ e 1400 cm^{-1} , as bandas atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico do grupo carboxilato (COO^-) sugere a conversão de grupos carboxílicos livres em carboxilatos coordenados ao ferro, caracterizando a ancoragem das nanopartículas magnéticas à matriz grafênica²³¹. O uso de ureia como precursor de nitrogênio durante a síntese contribui para o surgimento de bandas discretas em $1200\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$ associadas ao estiramento C–N e de um leve ombro em torno de 1650 cm^{-1} , sugerindo a formação provenientes de amidação e/ou dopagem nitrogenada da estrutura do GO¹⁵⁹.

Em conjunto, os resultados de FT-IR sugerem transformações químicas ocorridas ao longo da síntese: (i) oxidação efetiva do grafite e inserção de grupos oxigenados durante a formação do GO; (ii) redução parcial desses grupos durante a etapa hidrotermal; (iii) formação de ligações Fe–O representando nanopartículas de óxido de ferro fixadas à matriz; e (iv) incorporação de grupos nitrogenados na estrutura grafênica a partir da decomposição da ureia. Essas evidências apoiam a formação de um compósito mNGO estruturalmente reduzido, funcionalizado magneticamente e dopado com nitrogênio, combinando características desejáveis para aplicações fototérmicas, fotodinâmicas e de adsorção seletiva de macromoléculas em sistemas biomédicos.

5.5.5 Caracterização por UV-Vis e Emissão de Fluorescência

As caracterizações ópticas mostradas na Figura 34 evidenciaram modificações progressivas na estrutura eletrônica dos materiais ao longo das etapas de oxidação, dopagem e funcionalização do GO.

Na espectroscopia UV-Vis, o GO apresentou uma banda intensa centrada em aproximadamente 280 nm, atribuída à transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ dos domínios aromáticos sp^2 remanescentes, além de um ombro em torno de 300 nm associado às transições $n \rightarrow \pi^*$ de grupos carbonílicos, confirmando o elevado grau de oxidação e a ruptura parcial da conjugação π da rede grafítica^{232,233}.

Após a incorporação das fases magnéticas e nitrogênio (mNGO), observou-se um alargamento das bandas na região do UV e um aumento significativo da absorção contínua no visível e no infravermelho próximo, esse comportamento sugere a introdução de novos estados eletrônicos intermediários associados à formação de Fe_3O_4 e a processos de transferência de carga entre a matriz grafênica e os óxidos de ferro, além de refletir a reorganização da densidade eletrônica promovida pela dopagem nitrogenada^{223,234,235}. A absorção estendida até a região NIR sugere maior eficiência na conversão de energia luminosa em calor, característica desejável para aplicações fototérmicas, enquanto a manutenção das bandas características do GO indica preservação estrutural da plataforma grafênica²³⁶. Em conjunto, os resultados de UV-Vis corroboram as análises estruturais e morfológicas, confirmando que a rota hidrotermal assistida por micro-ondas em etapa única promoveu a obtenção de um material com propriedades ópticas ampliadas e adequadas para aplicações biomédicas multimodais, especialmente em PTT e PDT.

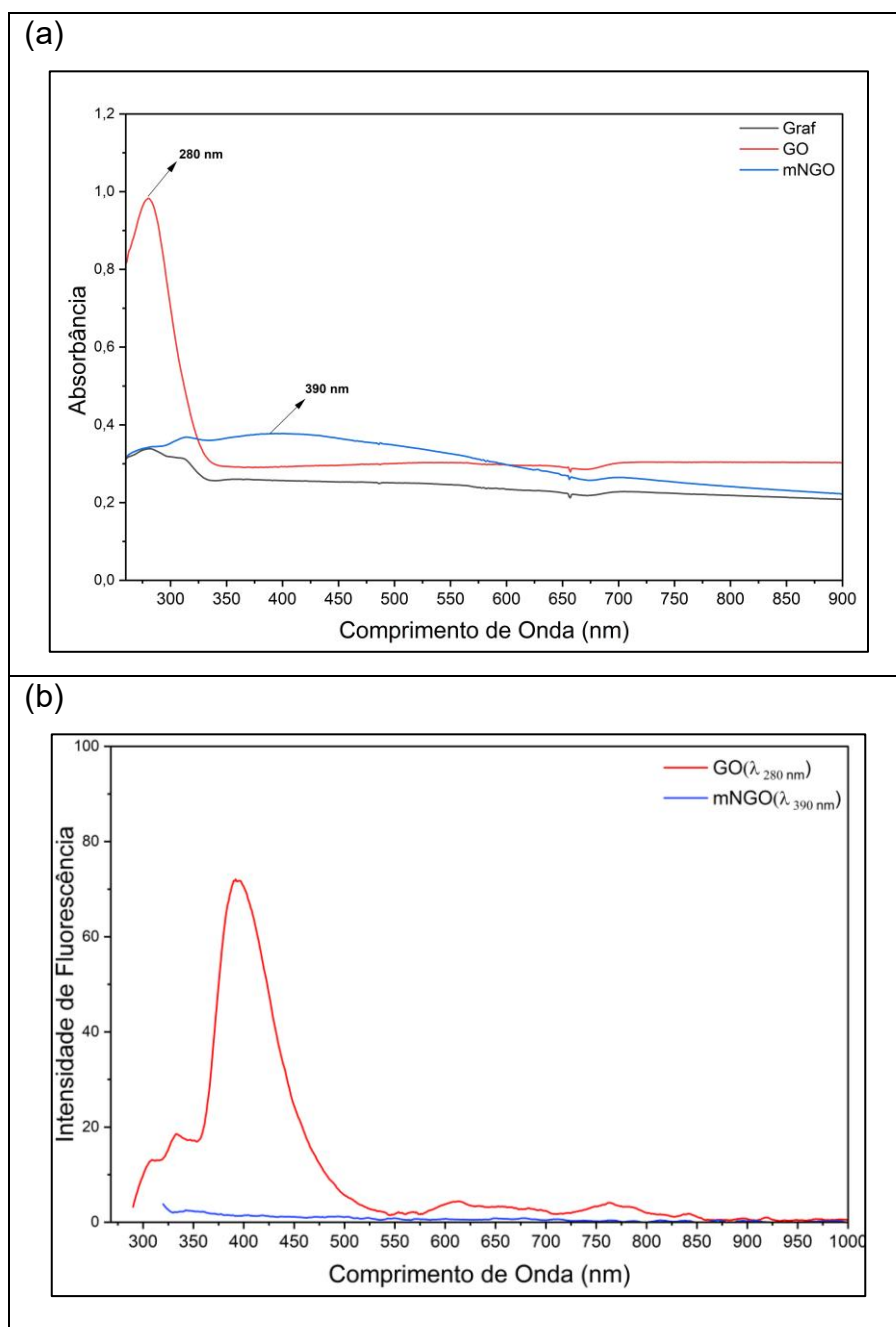


Figura 34 - UV-Vis (a) e Emissão de Fluorescência (b) do Graf, GO e mNGO. **Fonte:** Próprio autor

A espectroscopia de fluorescência evidenciou diferenças marcantes no comportamento fotoluminescente do GO e do mNGO, refletindo modificações na estrutura eletrônica após o processo de funcionalização. Para o GO, excitado em ~ 280 nm, observou-se uma banda larga de emissão entre 350 e 500 nm, com máximo centrado em aproximadamente 400 nm, atribuída à recombinação radiativa de pares elétron-lacuna gerados por transições $\pi \rightarrow \pi^*$ em domínios aromáticos sp^2 isolados na matriz oxidada²³⁷. A largura dessa banda está associada à distribuição heterogênea desses domínios e à contribuição de estados de defeito introduzidos por grupos

oxigenados, além disso, uma emissão secundária de baixa intensidade foi observada em ~540–800 nm, relacionada a níveis de armadilha mais profundos associados aos grupos oxigenados e desordem estrutural²³⁷.

Após a dopagem nitrogenada e incorporação das nanopartículas magnéticas, o mNGO, excitado em ~390 nm, apresentou supressão significativa da emissão característica do GO, evidenciando a ocorrência de processos de transferência de carga fotoinduzida entre a matriz grafênica excitada e os óxidos de ferro^{237,238}. Esse mecanismo reduz a recombinação radiativa original, favorecendo caminhos não radiativos de dissipação energética²³⁸ indicando que processos radiativos ainda ocorrem, porém a partir de centros emissores distintos^{237,239} que foi associada a estados de defeito profundos de dopagem heteroatômica e interfaces metal-carbono²⁴⁰.

Assim, a evolução do espectro de fluorescência sugere não apenas a supressão parcial da recombinação radiativa original do GO, mas a redistribuição dos canais de relaxação excitada, com coexistência de processos radiativos deslocados espectralmente e mecanismos não radiativos, comportamento que favorece a separação de cargas e o aproveitamento fotoenergético em aplicações fotodinâmicas e fototérmicas²⁴¹.

5.5.6 Caracterização por Potencial Zeta do mNGO

O PZ é um parâmetro fundamental na caracterização de sistemas coloidais, pois representa o potencial elétrico na interface entre a superfície das partículas dispersas e o meio líquido. Essa grandeza está diretamente relacionada à mobilidade eletroforética das partículas e à estrutura da dupla camada elétrica formada ao redor delas. A determinação do PZ por meio da técnica de espalhamento de luz eletroforético (ELS) permite avaliar a magnitude das interações eletrostáticas no sistema, sendo amplamente utilizada para inferir a estabilidade coloidal, a tendência à agregação e as propriedades superficiais de materiais dispersos em meio aquoso^{242,243}. No presente estudo, o PZ das dispersões do compósito mNGO foi avaliado em duas diluições distintas, com o objetivo de investigar o comportamento coloidal do material em condições próximas ao meio fisiológico (pH 6,8), conforme mostrado na Figura 35.

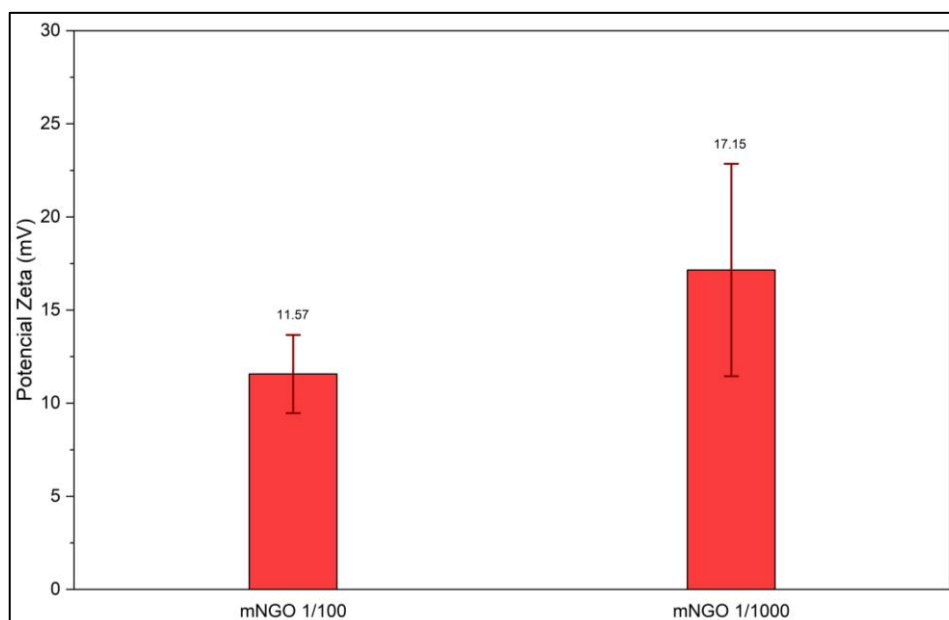


Figura 35 - Potencial Zeta do Compósito mNGO. Potencial Zeta das diluições 1:100 e 1:1000 do GO modificado via reação hidrotermal assistida por micro-ondas. Fonte: Próprio autor

Os resultados indicaram valores médios de $11,57 \pm 2,1$ mV para a diluição 1/100 e $17,15 \pm 5,7$ mV para a diluição 1/1000. Observou-se que a maior diluição resultou em aumento do PZ, comportamento atribuído à redução das interações interpartículas e à consequente expansão da dupla camada elétrica ao redor das partículas. Esse efeito é consistente com os princípios da teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)^{244,245}, segundo a qual a estabilidade coloidal resulta do balanço entre forças atrativas de van der Waals e forças repulsivas eletrostáticas^{244,245}.

Embora os valores obtidos não atinjam magnitudes superiores a ± 30 mV, frequentemente associadas a sistemas altamente estáveis, os resultados sugerem a presença de estabilização eletrostática moderada. Esse comportamento é típico de compósitos híbridos baseados em GO funcionalizado com nanopartículas magnéticas, nos quais a heterogeneidade química da superfície e a presença de múltiplos domínios estruturais influenciam a distribuição de cargas.

O caráter positivo do PZ observado sugere a presença de grupos funcionais nitrogenados protonados, introduzidos durante o processo de síntese hidrotérmica^{246,247}. Esse deslocamento, em relação ao potencial tipicamente negativo do GO não modificado, constitui outra evidência do sucesso da dopagem com nitrogênio e da modificação superficial do material. Além disso, a ocorrência de distribuições bimodais em algumas medições sugere uma superfície quimicamente

heterogênea, possivelmente decorrente da coexistência de regiões de grafeno ainda parcialmente oxidado e domínios funcionalizados com nanopartículas de Fe_3O_4 ^{248,249}.

Do ponto de vista aplicado, a presença de carga superficial positiva moderada em pH próximo ao fisiológico é particularmente relevante, uma vez que pode favorecer interações eletrostáticas com membranas celulares, que apresentam carga predominantemente negativa^{250,251}. Adicionalmente, essa característica superficial favorece a incorporação de moléculas com cargas opostas, contribuindo para a formação de sistemas híbridos funcionalizados por meio de interações eletrostáticas e interfaciais. Nesse contexto, a ancoragem da ICG na superfície do compósito pode ser favorecida, não apenas por interações eletrostáticas, mas também por interações π - π com os domínios grafênicos e possíveis interações de coordenação com as nanopartículas de Fe_3O_4 .

Essas interações interfaciais desempenham papel fundamental na estabilização fotofísica e fotoquímica da ICG reduzindo processos de agregação, autoextinção e degradação sob irradiação, fenômenos frequentemente observados para a molécula livre em solução aquosa que será discutido mais adiante. A heterogeneidade de carga superficial e a presença de múltiplos sítios de interação no compósito favorecem a distribuição do PS na interface sólido-líquido, contribuindo para maior estabilidade estrutural e funcional do sistema híbrido. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que o mNGO apresenta propriedades coloidais compatíveis com dispersões moderadamente estáveis, constituindo uma plataforma eficiente para imobilização e estabilização de PS, com potencial aplicação em PDT e PTT.

5.6 HÍBRIDOS HPG: ESTUDOS DE DESEMPENHO FOTODINÂMICO

5.6.1 Estudos Fotofísicos e Fotoquímicos da ICG e HSG mNGO@ICG

A Figura 36 reúne os resultados espectroscópicos obtidos para avaliação do comportamento fotofísico e fotoquímico do composto ICG e do mNGO@ICG sob irradiação em 808 nm, incluindo as análises de estabilidade fotônica.

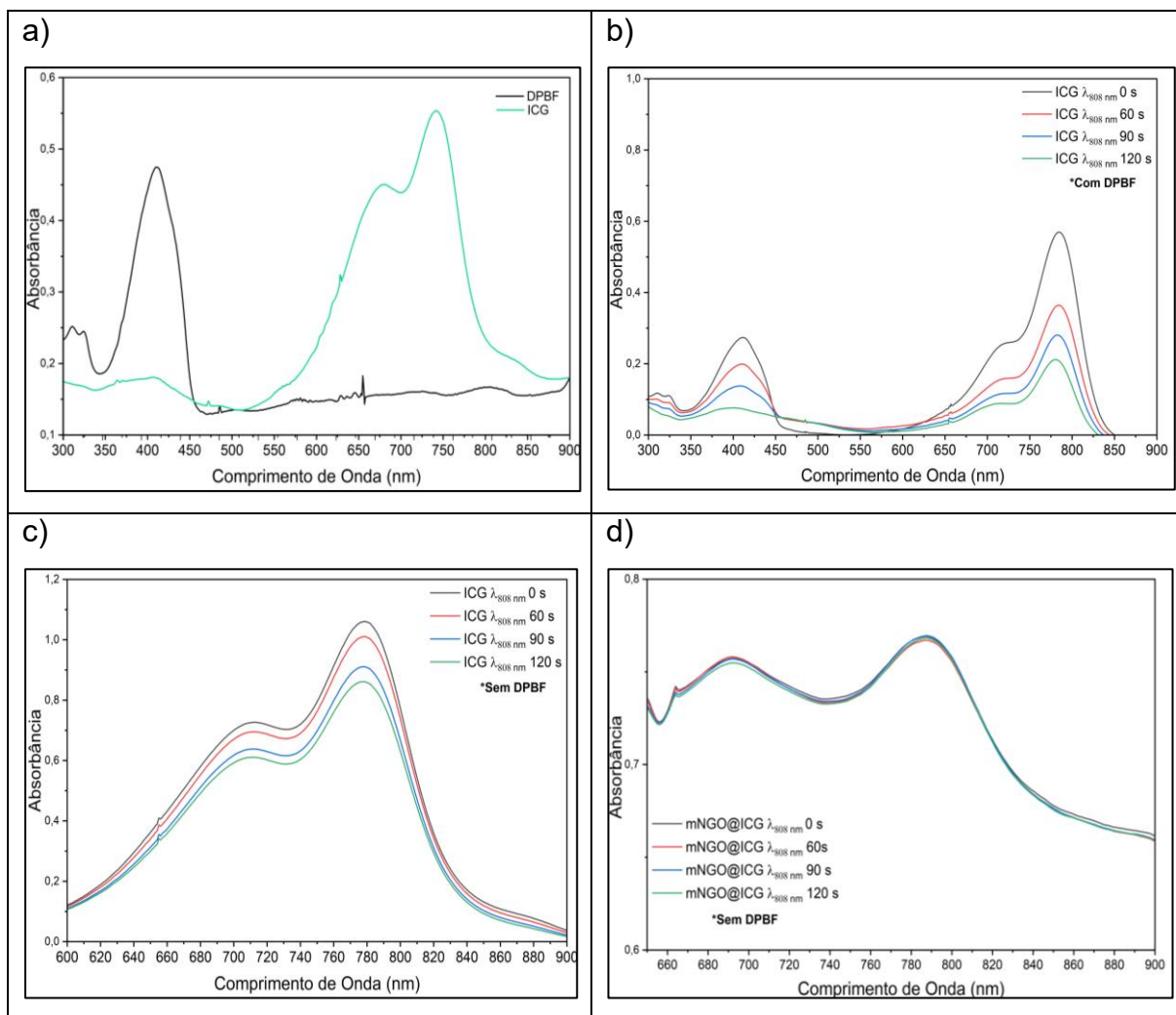


Figura 36 - Ensaio de Estabilidade e Fotodegradação da ICG e mNGO@ICG (a) – Absorção do UV-VIS da ICG e DPBF; (b) - Degradação do DPBF na presença da ICG livre sob irradiação à 808 nm; (c) - Degradação do ICG sob irradiação à 808 nm na ausência do DPBF; (d) - Estabilidade fotoquímica da ICG@mNGO na ausência do DPBF. Fonte: Próprio autor

Inicialmente, a Figura 36a apresenta os espectros de absorbância individuais do DPBF e da ICG, utilizados como base espectral para interpretação dos ensaios fotoquímicos subsequentes. O DPBF exibe banda característica intensa centrada em ~410 nm, atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do anel furânico conjugado, sendo amplamente empregado como sonda indireta para detecção de $^1\text{O}_2$ devido à sua elevada sensibilidade à oxidação fotoinduzida. Por sua vez, a ICG apresenta duas bandas principais na região do infravermelho próximo: uma banda de menor intensidade em ~710–730 nm e outra mais intensa centrada em ~770–800 nm, associadas às transições eletrônicas da banda Q do corante cianínico. Essas bandas situam-se

dentro da janela terapêutica biológica, justificando a escolha do laser de 808 nm para os estudos de ativação fotoquímica.

Na Figura 36b, observa-se a evolução espectral do sistema contendo ICG e DPBF sob irradiação em 808 nm no intervalo de 0 a 120 s. Verifica-se redução progressiva da absorbância do DPBF em ~410 nm com o aumento do tempo de exposição, evidenciando sua degradação foto-oxidativa. Esse comportamento sugere a geração de $^1\text{O}_2$ mediada pela ICG excitada, uma vez que o DPBF reage seletivamente com $^1\text{O}_2$ formando endoperóxidos não conjugados, resultando na perda da banda característica no UV-Vis. Paralelamente, nota-se redução gradual das bandas da própria ICG, particularmente do pico principal em ~778 nm, sugerindo que, além de atuar como PS, o corante sofre fotodegradação simultânea durante o processo de irradiação. Esse fenômeno é amplamente relatado para a ICG livre, estando associado à instabilidade fotoquímica do corante em meio aquoso e à formação de produtos de degradação após múltiplos ciclos de excitação^{132–134}.

A Figura 36c apresenta o comportamento espectral da ICG irradiada em 808 nm na ausência de DPBF, permitindo avaliar isoladamente sua estabilidade fotônica. Observa-se novamente diminuição gradual da absorbância das bandas em ~720 nm e ~778 nm ao longo do tempo, confirmando que a fotodegradação da ICG não está exclusivamente vinculada à reação com a sonda, mas também decorre de processos intrínsecos de fotobranqueamento, tais como clivagem da cadeia polimetínica, fotoisomerização e oxidação molecular. Esse resultado reforça a limitação da ICG livre em aplicações terapêuticas prolongadas, uma vez que a perda de integridade estrutural reduz sua eficiência fotodinâmica e fototérmica.

Em contraste, a Figura 36d evidencia comportamento substancialmente distinto para o híbrido mNGO@ICG sob as mesmas condições de irradiação e na ausência de DPBF. Observa-se manutenção praticamente inalterada da intensidade do pico principal em ~790 nm ao longo de 120 s de exposição ao laser, indicando elevada estabilidade fotônica do corante quando imobilizado na plataforma grafênica magnética. A ausência de degradação significativa sugere que a interação interfacial entre ICG e mNGO, mediada por empilhamento π - π , interações hidrofóbicas e possíveis interações eletrostáticas, promove proteção estrutural da cadeia conjugada da ICG, reduzindo sua suscetibilidade à fotólise e à oxidação direta.

Do ponto de vista mecanístico, essa estabilização pode estar associada à dissipação eficiente da energia excitada via transferência de carga para a matriz grafênica ou para as nanopartículas de óxido de ferro, diminuindo a ocorrência de processos autodestrutivos do corante. Adicionalmente, a plataforma mNGO pode atuar como reservatório eletrônico, facilitando a separação de cargas e redirecionando a energia excitada para processos fotoquímicos externos, como a geração de ROS, em vez de promover degradação intramolecular da ICG.

De forma integrada, os resultados demonstram que, enquanto a ICG livre apresenta simultaneamente geração de $^1\text{O}_2$ e fotodegradação significativa sob irradiação NIR, sua imobilização no mNGO resulta em aumento expressivo da estabilidade fotônica sem comprometer a atividade fotoinduzida. Essa combinação de alta eficiência fotodinâmica potencial e elevada resistência à fotobranqueamento consolida o híbrido mNGO@ICG como uma plataforma promissora para aplicações terapêuticas multimodais, nas quais estabilidade, geração de ROS e conversão fototérmica devem coexistir de maneira sinérgica.

5.6.2 Avaliação da Geração de Oxigênio Singlete e Estabilidade Fotônica do Híbrido mNGO@ICG

A Figura 37 reúne de forma integrada os resultados obtidos, possibilitando a análise comparativa da eficiência fotodinâmica, da estabilidade espectral do corante e do papel estrutural do mNGO na modulação desses processos.

A avaliação fotoquímica do sistema iniciou-se pela análise da degradação do DPBF na presença do híbrido sob irradiação NIR, conforme apresentado na Figura 37a. Observa-se redução progressiva da banda característica do DPBF centrada em ~410 nm ao longo do intervalo de 0 a 150 s, sugerindo sua foto-oxidação. Considerando a elevada seletividade do DPBF para $^1\text{O}_2$, a diminuição de sua absorbância sugere produção contínua de ROS mediada pelo HSG mNGO@ICG quando excitado em 808 nm ao longo do tempo, sugerindo eficiência fotodinâmica sustentada do híbrido.

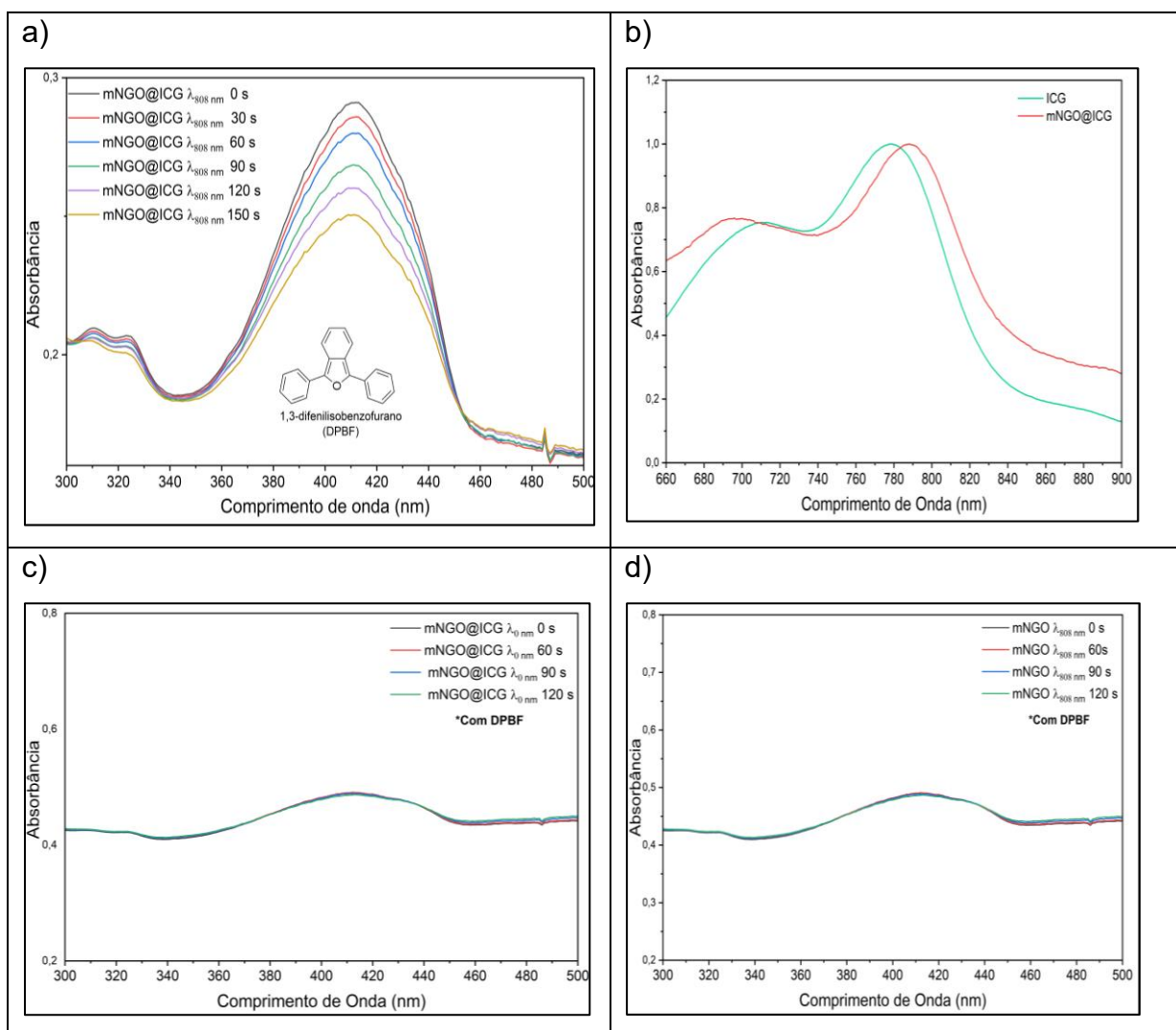


Figura 37 - Atividade fotodinâmica e Estabilidade Fotônica do HSG mNGO@ICG Avaliada por Degradação do DPBF sob Irradiação NIR. (a) - Degradação da sonda DPBF sob excitação NIR na presença do mNGO@ICG; (b) – Efeito batocrômico após a conjugação do ICG ao mNGO; (c) Ausência da degradação da sonda DPBF no escuro na presença do mNGO@ICG; (d) Ausência da degradação da sonda DPBF na presença do mNGO. Fonte: Próprio autor

O comportamento espectral responsável por essa ativação fotoquímica é elucidado na Figura 37b, que compara os espectros de absorbância da ICG livre e conjugada ao mNGO. Observa-se deslocamento batocrômico do pico principal da banda Q, passando de ~778 nm (ICG livre) para ~790 nm no mNGO@ICG. Esse deslocamento evidencia interação eletrônica entre o corante e a matriz grafênica, atribuída a acoplamento π - π , alterações no microambiente eletrônico e possível redistribuição de densidade de eletrônica. Tal deslocamento amplia a eficiência de absorção na região de 808 nm, favorecendo a ativação fotoquímica do sistema sob irradiação terapêutica.

Para validar que a degradação do DPBF observada decorre exclusivamente de processos fotoinduzidos, foi realizado experimento controle no escuro, apresentado na Figura 37c. Nesse caso, não se observa variação significativa da banda em ~410 nm ao longo de 120 s, indicando ausência de degradação espontânea da sonda na presença do mNGO@ICG sem estímulo fotônico. Esse resultado confirma que o HSG não promove oxidação do DPBF por vias catalíticas ou reações redox no escuro, sendo a geração de $^1\text{O}_2$ dependente da excitação luminosa na faixa de onda estudada.

De forma complementar, a Figura 37d apresenta o comportamento do mNGO isolado na presença do DPBF sob irradiação em 808 nm. Observa-se manutenção praticamente inalterada da absorbância da sonda ao longo do tempo, demonstrando que a plataforma magnética, na ausência da ICG, não gera quantidades detectáveis de $^1\text{O}_2$ sob essas condições experimentais. Esse resultado confirma que a atividade fotodinâmica do sistema HSG está diretamente associada à presença do fotossensibilizador orgânico, enquanto o mNGO atua predominantemente como plataforma estrutural e moduladora eletrônica.

A análise das figuras evidencia que o híbrido mNGO@ICG combina três características fundamentais para aplicações fototerapêuticas: (i) capacidade eficiente de geração de $^1\text{O}_2$ sob excitação NIR, confirmada pela degradação do DPBF; (ii) modulação espectral do corante, expressa pelo deslocamento batocrômico que favorece a absorção em 808 nm; e (iii) elevada estabilidade fotoquímica e seletividade reacional, comprovadas pelos experimentos controle no escuro e na ausência de ICG. Esses resultados demonstram que a imobilização da ICG na plataforma grafênica magnética preserva sua atividade fotodinâmica e otimiza sua resposta espectral e sua eficiência fotoinduzida, consolidando o mNGO@ICG como sistema promissor para aplicações em PDT mediada por NIR.

5.6.3 Caracterização por Fluorescência da Molécula ICG e HSG mNGO@ICG

A análise dos espectros de fluorescência da ICG e do mNGO@ICG, mostrado na Figura 38, evidencia uma modulação significativa das propriedades fotofísicas do sistema após a incorporação do corante à matriz grafênica funcionalizada.

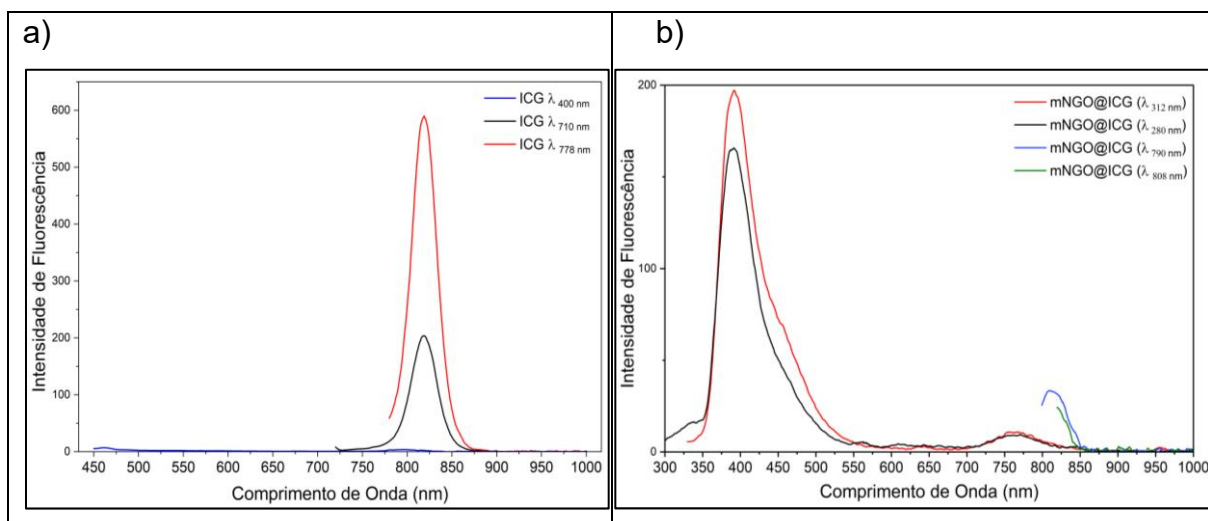


Figura 38 - Ensaios de Fluorescência da ICG e mNGO@ICG. (a) – Espectro de fluorescência da ICG com excitações em 400, 710 e 778 nm, regiões com maiores intensidade de absorção da molécula; (b) – Espectro de fluorescência do mNGO@ICG com excitações em 280, 312, 790 e 808 nm, regiões com maiores intensidade de absorção do híbrido. **Fonte:** Próprio autor

A ICG livre, Figura 38a, apresentou um perfil espectral típico de corantes cianínicos, com emissão centrada na região do infravermelho próximo (~800–830 nm), independentemente do comprimento de onda de excitação, em concordância com a regra de Kasha. A excitação em 400 nm que pode ser atribuída à excitação em bandas de maior energia ($\pi \rightarrow \pi^*$), resultando em maior população do estado excitado seguida de relaxação interna até o estado emissivo S_1 . As excitações mais próximas da banda de absorção principal (710 e 778 nm) apresentaram maiores intensidades de emissão, refletindo a emissão de fluorescência da ICG na região entre 800 e 850 nm. A largura e assimetria da banda de emissão sugerem a influência do microambiente e a possível formação de agregados, fenômeno amplamente descrito para a ICG e associado à redução da fluorescência por autoextinção. Além disso, a elevada suscetibilidade a processos não radiativos e à fotodegradação reforça as limitações da ICG livre em aplicações biomédicas.

Após a incorporação na matriz mNGO, (Figura 38b) o comportamento espectral torna-se substancialmente mais complexo, refletindo a natureza multifuncional do sistema híbrido. Observa-se uma emissão intensa na região de 380–420 nm sob excitação no UV (280 e 312 nm), característica da recombinação radiativa em domínios sp^2 isolados do GO, sugerindo a manutenção da heterogeneidade eletrônica

mesmo após o tratamento hidrotermal. Na região do NIR, correspondente à emissão da ICG, observa-se uma redução significativa da intensidade de fluorescência, caracterizando um processo de supressão. Esse comportamento é consistente com mecanismos de transferência de carga fotoinduzida e transferência de energia entre a ICG e a matriz mNGO, favorecidos pela interação π - π e pela proximidade eletrônica entre os componentes.

A comparação entre os sistemas evidencia que a incorporação da ICG promove uma transição de um comportamento molecular isolado para um sistema eletronicamente acoplado, no qual os caminhos de relaxação energética são significativamente alterados. A supressão da fluorescência no NIR não representa perda de funcionalidade, mas sim um redirecionamento da energia excitada para processos não radiativos, como dissipação térmica e geração de ROS, fundamentais para aplicações em PDT e PTT. Paralelamente, o surgimento de novas bandas emissivas no UV e visível indica a criação de um sistema eletrônico hierárquico, resultante da sinergia entre os domínios grafênicos, os sítios dopados com nitrogênio, as nanopartículas magnéticas e a ICG. Adicionalmente, a interação com a matriz contribui para a estabilização fotofísica do corante, reduzindo sua degradação e ampliando sua aplicabilidade.

Dessa forma, os resultados demonstram que o híbrido nanocompósito mNGO@ICG preserva as características ópticas essenciais da ICG e promove uma modulação estratégica de suas propriedades eletrônicas, favorecendo vias não radiativas mais eficientes e consolidando o material como uma plataforma promissora para aplicações biomédicas baseadas em excitação no infravermelho próximo.

5.7 PROPOSTA DE MECANISMO FOTOFÍSICO E FOTOQUÍMICO DO SISTEMA mNGO@ICG

Com base nos resultados experimentais obtidos pelas técnicas de espectroscopia UV-Vis, fluorescência, Raman e ensaios de geração de $^1\text{O}_2$, é possível propor um modelo mecanístico para o comportamento fotofísico e fotoquímico do sistema mNGO@ICG sob irradiação na região do NIR que pode ser compreendido a partir da interação entre os estados excitados da ICG e a estrutura eletronicamente modificada do GO dopado e funcionalizado.

Sob excitação em 808 nm, a ICG absorve radiação promovendo a transição eletrônica do estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_1). Em

sistemas convencionais, a desativação desse estado ocorre predominantemente por emissão de fluorescência ou por processos não radiativos. No entanto, quando ancorada à matriz mNGO, observa-se uma supressão significativa da fluorescência, indicando a ocorrência de processos de transferência de carga e/ou energia do cromóforo excitado para a rede grafênica.

A estrutura do mNGO, caracterizada pela presença de defeitos estruturais, domínios sp^2 reduzidos e dopagem com nitrogênio, favorece a formação de estados eletrônicos intermediários que atuam como aceitadores de carga. Esse cenário promove a desativação não radiativa do estado excitado da ICG, reduzindo a recombinação radiativa e direcionando a energia absorvida para processos fotoquímicos^{252–254}.

Adicionalmente, a interação entre a ICG e o mNGO pode favorecer a ISC, aumentando a população do estado T_1 , etapa fundamental para a geração de ROS via transferência de energia para o oxigênio molecular, resultando na formação de 1O_2 . Esse mecanismo é corroborado pelos ensaios com a sonda DPBF, que evidenciam a degradação do marcador sob irradiação NIR na presença do sistema híbrido.

Paralelamente, a matriz de mNGO, devido à sua natureza condutora e à presença de centros metálicos associados às nanopartículas de óxidos de ferro, pode contribuir para processos adicionais de dissipação de energia, incluindo conversão fototérmica que será evidenciado mais adiante. Esse efeito potencializa a ação terapêutica do sistema, caracterizando um mecanismo combinado de PDT e PTT.

Dessa forma, o sistema mNGO@ICG atua como uma plataforma multifuncional na qual a matriz carbonácea modificada não apenas estabiliza o PS, mas também modula seus caminhos de desativação eletrônica, favorecendo processos não radiativos, transferência de carga e geração eficiente de espécies reativas sob excitação no NIR.

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA *IN VITRO* DO COMPÓSITO mNGO@ICG EM CÉLULAS DE MELANOMA

A Figura 39 apresenta os resultados dos testes *in vitro* em culturas de células de melanoma A375, dos grupos tratados com mNGO@ICG irradiados e não irradiados com luz NIR. A viabilidade celular avaliada por MTT em dois tempos permitiu avaliar tanto o efeito imediato da exposição ao sistema mNGO@ICG quanto a resposta

celular após um período de recuperação. Apesar da revelação em 0 h indicar a diminuição da viabilidade celular no grupo irradiado, observou-se um aumento da viabilidade celular após 24 h, o que é indicativo de retomada do crescimento celular.

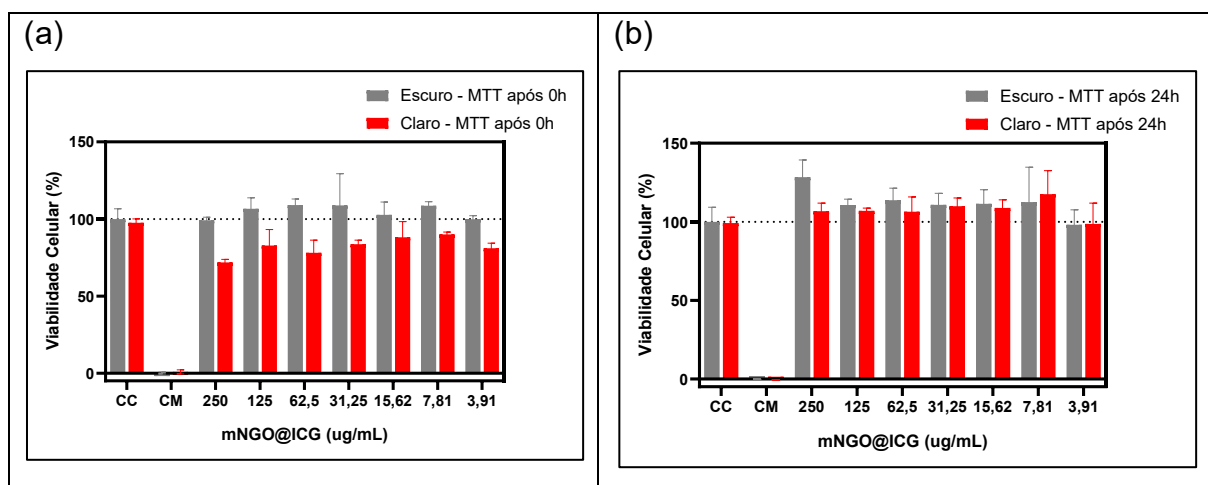


Figura 39: Viabilidade celular avaliada por MTT em dois tempos. (a) 0 h e (b) 24 h. A viabilidade do grupo controle (células não tratadas) é indicada como CC (controle positivo) e CM (controle negativo)

Um dos possíveis fatores que possa ter interferido nestes resultados é devido à possível agregação do mNGO@ICG antes da exposição *in vitro*. A estabilidade coloidal do sistema em meio aquoso, avaliada por meio do potencial zeta, indicam uma dispersão classificada como moderadamente estável, segundo os critérios estabelecidos na literatura coloidal. Como a exposição foi realizada alguns dias após o preparo da solução, possivelmente a resposta possa ter sido comprometida.

Mesmo estes resultados *in vitro* não terem sido conclusivos, acredita-se que o ajuste de alguns parâmetros pode gerar resultados promissores, devido aos excelentes resultados obtidos com a sonda DPBF. A utilização da sonda DPBF como indicador da geração de $^1\text{O}_2$ é amplamente descrita na literatura, sendo considerada uma abordagem confiável para avaliação da atividade fotodinâmica em sistemas homogêneos. A diminuição da absorbância da sonda ao longo do tempo de irradiação está diretamente associada à oxidação promovida por espécies reativas, o que permite inferir a eficiência fotoquímica do sistema. Nesse contexto, os resultados obtidos indicam que o mNGO@ICG apresenta comportamento fotoativo robusto, mesmo após processos de funcionalização e ancoragem, o que é particularmente

relevante considerando que interações com matrizes carbonáceas podem, em determinados casos, induzir processos de supressão eletrônica.

5.9 AVALIAÇÃO DOS ENSAIOS FOTOTÉRMICOS EM DISPERSÃO AQUOSA

A avaliação do desempenho fototérmico foi conduzida com o objetivo de investigar a capacidade de conversão de energia luminosa em calor sob irradiação NIR, considerando a influência da composição e da concentração dos sistemas. Foram analisados separadamente mNGO, ICG livre e o híbrido mNGO@ICG, permitindo identificar as contribuições individuais e possíveis efeitos sinérgicos, conforme mostrado na Figura 40.

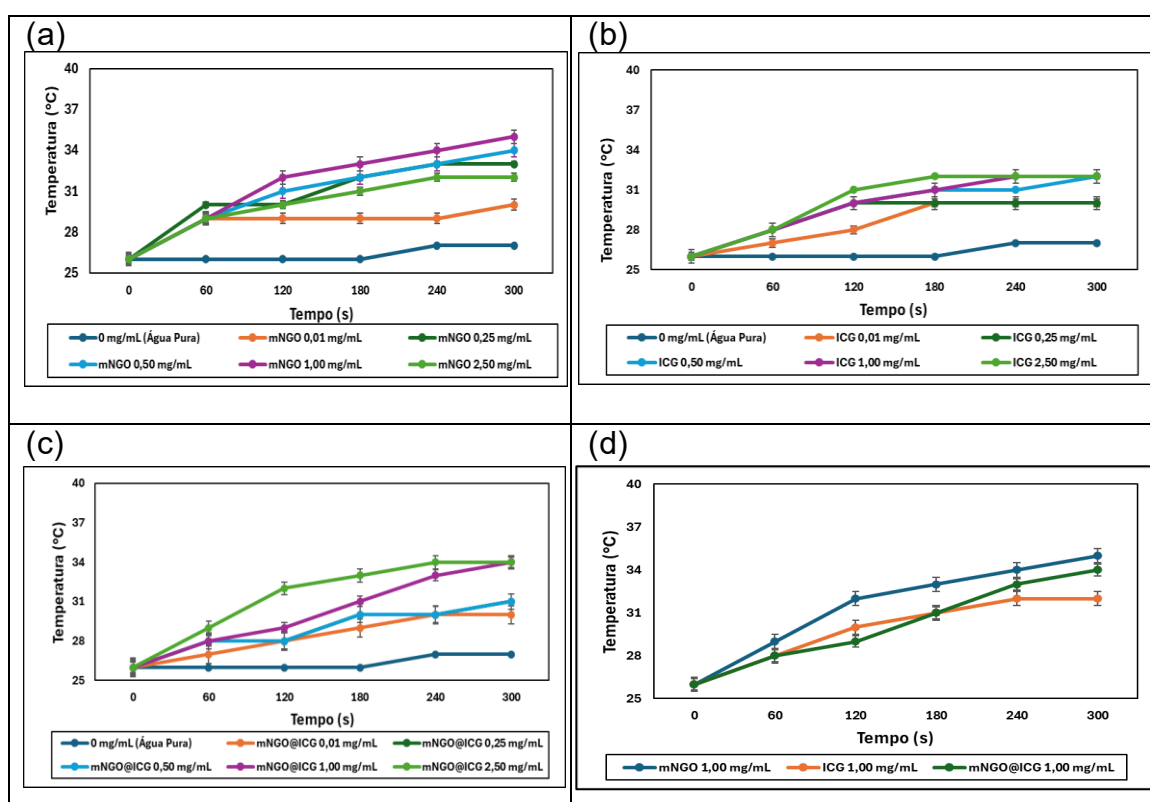


Figura 40 - Curvas de Temperatura em Função do Tempo Usando: (a) mNGO; (b) ICG livre; (c) mNGO@ICG (d) Comparação das 3 concentração com possível melhor desempenho fototérmico do híbrido. **Fonte:** Próprio autor

Para o mNGO, observou-se aumento progressivo da temperatura com a elevação da concentração, evidenciando sua atuação como agente fototérmico. O sistema contendo apenas água Milli-Q manteve temperatura praticamente constante (~26–27 °C), confirmando que o aquecimento está associado à absorção do material. Em baixas concentrações (0,01 mg/mL), o aumento térmico foi discreto (~30 °C),

enquanto em 0,25 e 0,50 mg/mL houve incremento mais pronunciado, associado à maior disponibilidade de domínios sp^2 . O melhor desempenho foi observado em 1,00 mg/mL ($\sim 35^\circ\text{C}$), indicando condição próxima ao regime ideal de dispersão. Em 2,50 mg/mL, o ganho térmico não foi proporcional, possivelmente devido à sedimentação parcial, que reduz a fração efetivamente dispersa e a eficiência de absorção.

Já, para a ICG livre, também se observou aumento de temperatura com a concentração, porém com tendência à estabilização precoce. Em baixas concentrações, o aquecimento foi limitado ($\sim 30^\circ\text{C}$), enquanto em concentrações intermediárias (0,50–1,00 mg/mL) atingiu $\sim 32^\circ\text{C}$, com formação de platôs térmicos. Esse comportamento indica rápido equilíbrio entre absorção e dissipação de energia, sendo limitado por vias competitivas de desativação, como fluorescência e geração de ROS. Além disso, a ICG apresenta instabilidade fotoquímica e tendência à agregação em meio aquoso, especialmente em concentrações mais elevadas, o que compromete a eficiência fototérmica.

Logo, para o híbrido mNGO@ICG, observou-se comportamento fototérmico dependente da concentração, com aumento progressivo da temperatura ao longo da irradiação. Na concentração de 2,50 mg/mL, o sistema atingiu $\sim 35^\circ\text{C}$, indicando elevada eficiência de conversão energética e menor limitação por sedimentação em relação ao mNGO isolado. Em 1,00 e 0,50 mg/mL, as temperaturas máximas foram de $\sim 34^\circ\text{C}$ e $\sim 31^\circ\text{C}$, respectivamente, mantendo desempenho consistente. Já em concentrações mais baixas (0,25 e 0,01 mg/mL), o aumento térmico foi mais discreto (~ 30 – 31°C), refletindo a menor densidade de centros absorvedores.

Quando comparados diretamente os sistemas na concentração de 1,00 mg/mL, observa-se que o mNGO apresentou o maior incremento térmico, enquanto a ICG livre teve um menor desempenho. O sistema híbrido mNGO@ICG, por sua vez, apresentou comportamento intermediário, porém com perfil de aquecimento mais gradual ao longo do tempo. Esse resultado indica que, embora o mNGO possua maior eficiência intrínseca de conversão fototérmica, a incorporação da ICG não compromete significativamente o desempenho térmico do sistema, ao mesmo tempo em que promove maior estabilidade e controle do aquecimento. O comportamento do híbrido sugere ainda uma redistribuição dos mecanismos de dissipação de energia, na qual parte da energia absorvida pela ICG é direcionada para processos não radiativos mediados pela matriz carbonácea.

Portanto, o híbrido apresentou resposta mais estável em comparação à ICG livre, sem estabilização precoce das curvas, sugerindo redução de agregação e fotodegradação devido à ancoragem no mNGO. Esses resultados sugerem um efeito sinérgico, no qual o mNGO contribui com eficiência fototérmica e a ICG amplia a absorção no NIR e a estabilidade do sistema. Assim, o desempenho do mNGO@ICG não depende apenas da concentração, mas do equilíbrio entre absorção óptica, dispersão coloidal e interação entre os componentes, tornando o sistema promissor para aplicações combinadas de PTT/PDT.

6 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a eficiência fotodinâmica de sistemas baseados em GO sob irradiação na região do NIR não está associada apenas à presença de um PS, mas principalmente às interações eletrônicas estabelecidas na interface híbrida. Nesse contexto, a simples incorporação de PSs ao GO mostrou-se insuficiente, evidenciando que a resposta fotoativa depende tanto das modificações estruturais da matriz quanto da escolha de PSs compatíveis com a faixa de excitação desejada.

A modificação estrutural do GO, via síntese hidrotermal assistida, resultando no mNGO promoveu aumento da densidade de defeitos, modificação dos domínios sp^2/sp^3 e incorporação de nitrogênio, resultando na formação de estados eletrônicos intermediários capazes de atuar como centros de transferência de carga. Esses estados favoreceram a supressão da recombinação radiativa e o redirecionamento da energia excitada para processos não radiativos e fotoquímicos.

Nesse cenário, a interação mNGO e ICG resultou em um sistema com comportamento fotofísico distinto da ICG livre, caracterizado pela supressão de fluorescência e manutenção da absorção no NIR. Esse comportamento sugere a ocorrência de transferência de carga e/ou energia na interface, além de estar associado a maior estabilidade do sistema, com redução de agregação e fotodegradação da ICG.

Os ensaios fototérmicos confirmaram resposta dependente da concentração, com aquecimento progressivo e perfil mais estável para o híbrido, evidenciando melhor controle da dissipação de energia. Em paralelo, os ensaios *in vitro* em células de melanoma demonstraram efeito citotóxico inicial dependente da irradiação, porém com recuperação parcial da viabilidade celular após 24 h, indicando que a eficácia biológica ainda requer otimização dos parâmetros experimentais, especialmente

concentração do sistema, tempo de incubação e condições de irradiação. Tal comportamento contrasta com os resultados obtidos nos ensaios com a sonda DPBF, que evidenciaram geração eficiente de espécies reativas, sugerindo que a limitação observada está associada às condições experimentais e à interação com o meio biológico do que à capacidade fotoquímica intrínseca do sistema.

De forma integrada, os resultados evidenciam que o sistema mNGO@ICG apresenta propriedades emergentes decorrentes da interação entre matriz e PS, atuando na modulação da dinâmica excitônica, na estabilidade fotofísica e na resposta fototérmica.

Assim, este trabalho estabelece uma relação consistente entre estrutura, estados eletrônicos e resposta fotoativa em materiais derivados de GO, demonstrando que a modificação da rede carbonácea é determinante para o controle de processos de transferência de energia sob NIR, atuando na estabilização fotofísica da ICG, enquanto esta desempenha papel essencial na absorção eficiente da radiação em 808 nm, contribuindo diretamente para a ativação dos processos fotoquímicos e fototérmicos do sistema.

Em síntese, o sistema mNGO@ICG configura-se como uma plataforma promissora para aplicações combinadas em PDT/PTT.

REFERÊNCIAS

1. Zheng Z, Liu H, Zhai S, et al. Highly efficient singlet oxygen generation, two-photon photodynamic therapy and melanoma ablation by rationally designed mitochondria-specific near-infrared AIEgens. *Chem Sci*. 2020;11(9):2494-2503. doi:10.1039/c9sc06441a
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):7-30. doi:10.3322/caac.21387
3. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 2003;22(20):3138-3151. doi:10.1038/sj.onc.1206454
4. Akasov RA, Sholina N V., Khochenkov DA, et al. Photodynamic therapy of melanoma by blue-light photoactivation of flavin mononucleotide. *Sci Rep*. 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-46115-w
5. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(6):345-358. doi:10.1038/nrc.2016.37

6. Kuphal S, Bosserhoff A. Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *Journal of Pathology*. 2009;219(4):400-409. doi:10.1002/path.2617
7. Kalluru P, Vankayala R, Chiang CS, Hwang KC. Nano-graphene oxide-mediated In vivo fluorescence imaging and bimodal photodynamic and photothermal destruction of tumors. *Biomaterials*. 2016;95:1-10. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.04.006
8. Baldea I, Olteanu DE, Bolfa P, et al. Efficiency of photodynamic therapy on WM35 melanoma with synthetic porphyrins: Role of chemical structure, intracellular targeting and antioxidant defense. *J Photochem Photobiol B*. 2015;151:142-152. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.07.019
9. Nguyen VN, Yan Y, Zhao J, Yoon J. Heavy-Atom-Free Photosensitizers: From Molecular Design to Applications in the Photodynamic Therapy of Cancer. *Acc Chem Res*. 2021;54(1):207-220. doi:10.1021/acs.accounts.0c00606
10. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal. Portland Press Ltd*. 2016;473(4):347-364. doi:10.1042/BJ20150942
11. Li X, Lee S, Yoon J. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. *Chem Soc Rev. Royal Society of Chemistry*. 2018;47(4):1174-1188. doi:10.1039/c7cs00594f
12. Correia JH, Rodrigues JA, Pimenta S, Dong T, Yang Z. Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics*. 2021;13(9). doi:10.3390/pharmaceutics13091332
13. Lee CN, Hsu R, Chen H, Wong TW. Daylight Photodynamic Therapy: An Update. *Molecules. NLM (Medline)*. 2020;25(21). doi:10.3390/molecules25215195
14. De Oliveira KT, De Souza JM, Da Silva Gobo NR, De Assis FF, Brocksom TJ. Basic concepts and applications of porphyrins, chlorins and phthalocyanines as photosensitizers in photonic therapies. *Revista Virtual de Quimica*. 2015;7(1):310-335. doi:10.5935/1984-6835.20150016
15. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy. Elsevier Masson SAS*. 2018;106:1098-1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049
16. Bastos MM, Boechat N, Gomes ATPC, Neves MGPMS, Cavaleiro JAS. The use of porphyrins in photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis. *Revista Virtual de Quimica*. 2012;4(3):257-267. doi:10.5935/1984-6835.20120021
17. Warriar A, Mazumder N, Prabhu S, Satyamoorthy K, Murali TS. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis Photodyn Ther. Elsevier B.V*. 2021;33. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.102090

18. Prazmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, Mielczarek A. Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2016;25(4):799-807. doi:10.17219/acem/32488
19. Li Y, Wang B, Zheng S, He Y. Photodynamic therapy in the treatment of oral leukoplakia: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther. Elsevier B.V.* 2019;25:17-22. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.10.023
20. Wen X, Li Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update. *Photodiagnosis Photodyn Ther. Elsevier B.V.* 2017;19:140-152. doi:10.1016/j.pdpdt.2017.06.010
21. Hamblin MR, Huang YY, Vecchio D, Avci P, Yin R, Garcia-Diaz M. Melanoma resistance to photodynamic therapy: New insights. *Biol Chem. Walter de Gruyter GmbH*. 2013;394(2):239-250. doi:10.1515/hsz-2012-0228
22. Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chem Rev. American Chemical Society*. 2015;115(4):1990-2042. doi:10.1021/cr5004198
23. Wu K, Su D, Liu J, Saha R, Wang JP. Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances. *Nanotechnology*. 2019;30(50). doi:10.1088/1361-6528/ab4241
24. Pieretti JC, Gonçalves MC, Nakazato G, Santos de Souza AC, Boudier A, Seabra AB. Multifunctional hybrid nanoplatform based on Fe₃O₄@Ag NPs for nitric oxide delivery: development, characterization, therapeutic efficacy, and hemocompatibility. *J Mater Sci Mater Med*. 2021;32(3). doi:10.1007/s10856-021-06494-x
25. Tamtaji M, Tyagi A, You CY, et al. Singlet Oxygen Photosensitization Using Graphene-Based Structures and Immobilized Dyes: A Review. *ACS Appl Nano Mater. American Chemical Society*. 2021;4(8):7563-7586. doi:10.1021/acsanm.1c01436
26. Li Q, Hong L, Li H, Liu C. Graphene oxide-fullerene C₆₀ (GO-C₆₀) hybrid for photodynamic and photothermal therapy triggered by near-infrared light. *Biosens Bioelectron*. 2017;89:477-482. doi:10.1016/j.bios.2016.03.072
27. Liu J, Yuan X, Deng L, et al. Graphene oxide activated by 980 nm laser for cascading two-photon photodynamic therapy and photothermal therapy against breast cancer. *Appl Mater Today*. 2020;20. doi:10.1016/j.apmt.2020.100665
28. Denis PA. Heteroatom Codoped Graphene: The Importance of Nitrogen. *ACS Omega*. 2022;7(50):45935-45961. doi:10.1021/acsomega.2c06010
29. Kumari P, Kundu R. Heteroatom-Doped Graphene Quantum Dots: Recent Advancements in Energy Storage, Optical, and Optoelectronic Applications. *Chem Asian J*. 2025;20(22). doi:10.1002/asia.70293
30. Nabawy A, Gamil M, Mohamed SA, Hessein A. High-performance flexible temperature sensor based on heteroatom doped laser-reduced graphene

- oxide. *Emergent Mater.* Published online September 16, 2025.
doi:10.1007/s42247-025-01226-1
31. Ngidi NPD, Ollengo MA, Nyamori VO. Heteroatom-doped graphene and its application as a counter electrode in dye-sensitized solar cells. *Int J Energy Res.* 2019;43(5):1702-1734. doi:10.1002/er.4326
 32. Robinson JT, Tabakman SM, Liang Y, et al. Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy. *J Am Chem Soc.* 2011;133(17):6825-6831. doi:10.1021/ja2010175
 33. Su S, Wang J, Wei J, Martínez-Zaguilán R, Qiu J, Wang S. Efficient photothermal therapy of brain cancer through porphyrin functionalized graphene oxide. *New Journal of Chemistry.* 2015;39(7):5743-5749. doi:10.1039/c5nj00122f
 34. Lee C, Collichio F, Ollila D, Moschos S. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clin Dermatol.* 2013;31(2):141-147. doi:10.1016/j.clindermatol.2012.08.015
 35. Laennec RTH. Sur les melanosés. . *Bull Faculte Med Paris* . 1812;1:6-24.
 36. Dirk Schadendorf; Alexander C J van Akkooi; Carola Berking; Klaus G Griewank; Ralf Gutzmer; Axel Hauschild; Andreas Stang; Alexander Roesch; Selma Ugurel. Melanoma. *The Lancet.* 2018;392:971-984. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9
 37. Corrales E, Levit-Zerdoun E, Metzger P, et al. PI3K/AKT signaling allows for MAPK/ERK pathway independency mediating dedifferentiation-driven treatment resistance in melanoma. *Cell Communication and Signaling.* 2022;20(1). doi:10.1186/s12964-022-00989-y
 38. Meier F, Schitteck B, Busch S, et al. *The RAS/RAF/MEK/ERK AND PI3K/AKT Signaling Pathways Present Molecular Targets for the Effective Treatment of Advanced Melanoma.* Vol 10. 2005.
 39. Graells J, Vinyals A, Figueras A, et al. Overproduction of VEGF165 concomitantly expressed with its receptors promotes growth and survival of melanoma cells through MAPK and PI3K signaling. *Journal of Investigative Dermatology.* 2004;123(6):1151-1161. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23460.x
 40. Grupo Brasileiro de Melanoma. Grupo Brasileiro de Melanoma . 2012. Accessed December 28, 2024. <https://gbm.org.br/o-melanoma/>
 41. Falchook GS, Lewis KD, Infante JR, et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(8):782-789. doi:10.1016/S1470-2045(12)70269-3
 42. Dossett LA, Kudchadkar RR, Zager JS. BRAF and MEK inhibition in melanoma. *Expert Opin Drug Saf. Informa Healthcare.* 2015;14(4):559-570. doi:10.1517/14740338.2015.1011618

43. Ugurel S, Röhm J, Ascierto PA, et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: The impact of MAP kinase pathway inhibition and immune checkpoint inhibition - Update 2019. *Eur J Cancer*. 2020;130:126-138. doi:10.1016/j.ejca.2020.02.021
44. Li J, Kan H, Zhao L, Sun Z, Bai C. Immune checkpoint inhibitors in advanced or metastatic mucosal melanoma: a systematic review. *Ther Adv Med Oncol*. SAGE Publications Inc. 2020;12. doi:10.1177/1758835920922028
45. Razavi A, Keshavarz-Fathi M, Pawelek J, Rezaei N. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for melanoma. *Expert Rev Clin Immunol*. Taylor and Francis Ltd. 2021;17(3):209-223. doi:10.1080/1744666X.2021.1880895
46. Soltantoyeh T, Akbari B, Karimi A, et al. Chimeric antigen receptor (Car) t cell therapy for metastatic melanoma: Challenges and road ahead. *Cells*. MDPI. 2021;10(6). doi:10.3390/cells10061450
47. Blass E, Ott PA. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Clin Oncol*. Nature Research. 2021;18(4):215-229. doi:10.1038/s41571-020-00460-2
48. Yu C, Liu X, Yang J, et al. Combination of immunotherapy with targeted therapy: Theory and practice in metastatic melanoma. *Front Immunol*. Frontiers Media S.A. 2019;10(MAY). doi:10.3389/fimmu.2019.00990
49. Blank CU, Hooijkaas AI, Haanen JB, Schumacher TN. Combination of targeted therapy and immunotherapy in melanoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2011;60(10):1359-1371. doi:10.1007/s00262-011-1079-2
50. Naidoo C, Kruger CA, Abrahamse H. *Targeted Photodynamic Therapy Treatment of in Vitro A375 Metastatic Melanoma Cells*. 2019. www.oncotarget.com
51. Robertson CA, Tech M, Abrahamse H. The In Vitro PDT Efficacy of a Novel Metallophthalocyanine (MPc) Derivative and Established 5-ALA Photosensitizing Dyes Against Human Metastatic Melanoma Cells. *Lasers Surg Med*. 2010;42:926-936. doi:10.1002/lsm..20980
52. Kolarova H, Nevrelva P, Bajgar R, Jirova D, Kejlova K, Strnad M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. *Toxicology in Vitro*. 2007;21(2):249-253. doi:10.1016/j.tiv.2006.09.020
53. Henderson BW, Dougherty TJ. How does Photodynamic Therapy Work? *Photochem Photobiol*. 1992;55(1):145-157. doi:10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x
54. Kwiatkowski S, Knap B, Przysupski D, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS. 2018;106:1098-1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049

55. Xi Y, Chen L, Tang J, Yu B, Shen W, Niu X. Amplifying “eat me signal” by immunogenic cell death for potentiating cancer immunotherapy. *Immunol Rev. John Wiley and Sons Inc.* 2024;321(1):94-114. doi:10.1111/imr.13251
56. Lipson RL, Baldes EJ. *The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative*. 1960.
57. Kolarikova M, Hosikova B, Dilenko H, et al. Photodynamic therapy: Innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments. *Med Res Rev. John Wiley and Sons Inc.* 2023;43(4):717-774. doi:10.1002/med.21935
58. James D. Regan; John A. Parrish. *The Science of Photomedicine*. 1 st edition 1982. (Plenum Press NY, ed.). 1982. doi:10.1007/978-1-4684-8312-3
59. Ribeiro JN, Flores AV, Mesquita RC, Nicola JH, Nicola EMD. Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. *Physicae*. 2005;5(5). doi:10.5196/physicae.5.2
60. Cristiano L. Use of infrared-based devices in aesthetic medicine and for beauty and wellness treatments. *Infrared Phys Technol. Elsevier B.V.* 2019;102. doi:10.1016/j.infrared.2019.102991
61. Lovatto C, Silva IZ da. Ativação de Terapias Fotônicas Via Transferência de Energia de Ressonância de Förster e Nanopartículas Transdutoras. In: SEPE - Simposio de Ensino, Pesquisa e Extensao; 2023. doi:10.48195/sepe2023.27066
62. Bulat FA, Murray JS, Politzer P. Identifying the most energetic electrons in a molecule: The highest occupied molecular orbital and the average local ionization energy. *Comput Theor Chem*. 2021;1199. doi:10.1016/j.comptc.2021.113192
63. Glogauer AAL. Síntese e Caracterização Fotofísica de Dois Copolímeros Eletroluminescentes: Um Completamente Conjugado e outro Multibloco tendo como Unidade Cromofórica o Fluoreno-Vinileno-Fe. Published online 2004. doi:10.13140/RG.2.2.29387.59689
64. Svirskiy GI, Generalov A V., Vinogradov NA, et al. Electronic structure of the [Ni(Salen)] complex studied by core-level spectroscopies. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2021;23(18):11015-11027. doi:10.1039/d1cp00511a
65. Arulmozhiraja S, Ehara M, Nakatsuji H. Electronic transitions in cis- and trans-dichloroethylenes and tetrachloroethylene. *Journal of Chemical Physics*. 2008;129(17). doi:10.1063/1.3002911
66. Bouabã T, Ben Amor N, Maynau D, Caffarel M. A study of the fixed-node error in quantum Monte Carlo calculations of electronic transitions: The case of the singlet $n \rightarrow \pi^*$ (CO) transition of the acrolein. *Journal of Chemical Physics*. 2009;130(11). doi:10.1063/1.3086023

67. Ashfold MNR, King GA, Murdock D, Nix MGD, Oliver TAA, Sage AG. $\pi\sigma^*$ Excited states in molecular photochemistry. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2010;12(6):1218-1238. doi:10.1039/b921706a
68. Monro S, Colón KL, Yin H, et al. Transition Metal Complexes and Photodynamic Therapy from a Tumor-Centered Approach: Challenges, Opportunities, and Highlights from the Development of TLD1433. *Chem Rev. American Chemical Society*. 2019;119(2):797-828. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00211
69. Amal NM, Shiddiq M, Armynah B, Tahir D. High reactive oxygen species produced from fluorescence carbon dots for anticancer and photodynamic therapies: A review. *Luminescence*. 2022;37(12):2006-2017. doi:10.1002/bio.4388
70. Jung AC, Moinard-Butot F, Thibaudeau C, Gasser G, Gaiddon C. Antitumor immune response triggered by metal-based photosensitizers for photodynamic therapy: Where are we? *Pharmaceutics*. MDPI. 2021;13(11). doi:10.3390/pharmaceutics13111788
71. Pal AK, Datta A. *First-principles* design of heavy-atom-free singlet oxygen photosensitizers for photodynamic therapy. *J Chem Phys*. 2024;160(16). doi:10.1063/5.0196557
72. Marchanka A, Maier SK, Höger S, van Gastel M. Photoinduced Charge Separation in an Organic Donor–Acceptor Hybrid Molecule. *J Phys Chem B*. 2011;115(46):13526-13533. doi:10.1021/jp208334y
73. Wang Z, Zheng X, Chen P, et al. Synchronous construction of a porous intramolecular D-A conjugated polymer via electron donors for superior photocatalytic decontamination. *J Hazard Mater*. 2022;424:127379. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.127379
74. Alisi IO, Uzairu A, Abechi SE. Free radical scavenging mechanism of 1,3,4-oxadiazole derivatives: thermodynamics of O–H and N–H bond cleavage. *Heliyon*. 2020;6(3):e03683. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03683
75. Berneth H, Bruder FK, Fäcke T, et al. A new three-component photo-initiating system for visible light recording of volume holograms with single-pulsed laser. *Polymers (Basel)*. 2021;13(20). doi:10.3390/polym13203517
76. Brauer HD, Acs A, Drews W, Gabriel R, Ghaeni S, Schmidt R. Generation of 1O_2 from oxygen quenching of the lowest excited singlet and triplet states of some aromatic compounds. *Journal of Photochemistry*. 1984;25(2-4):475-488. doi:10.1016/0047-2670(84)87047-1
77. Scholes GD, Harcourt RD, Ghiggino KP. Rate expressions for excitation transfer. III. An *ab initio* study of electronic factors in excitation transfer and exciton resonance interactions. *J Chem Phys*. 1995;102(24):9574-9581. doi:10.1063/1.468773

78. Xia P, Huang Z, Li X, et al. On the efficacy of anthracene isomers for triplet transmission from CdSe nanocrystals. *Chemical Communications*. 2017;53(7):1241-1244. doi:10.1039/C6CC08229G
79. Skourtis SS, Liu C, Antoniou P, Virshup AM, Beratan DN. Dexter energy transfer pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(29):8115-8120. doi:10.1073/pnas.1517189113
80. Schweitzer C, Schmidt R. Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen. *Chem Rev*. 2003;103(5):1685-1758. doi:10.1021/cr010371d
81. Gonçalves ASP; PMVB. "*Fotogeração de Espécies Reativas de Oxigênio Induzida Por Fullerenos e Derivados: Um Estudo Por EPR e Captura de Spins*". Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais; 2010. Accessed January 2, 2025. <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/IACO-8A8P5R/1/ana_silvia_p.g_dis..pdf>
82. Huang L, Zhao S, Wu J, et al. Photodynamic therapy for hypoxic tumors: Advances and perspectives. *Coord Chem Rev*. 2021;438:213888. doi:10.1016/j.ccr.2021.213888
83. Algorri JF, Ochoa M, Roldán-Varona P, Rodríguez-Cobo L, López-Higuera JM. Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13(14):3484. doi:10.3390/cancers13143484
84. Baldea I, Giurgiu L, Teacoe ID, et al. Photodynamic Therapy in Melanoma - Where do we Stand? *Curr Med Chem*. 2019;25(40):5540-5563. doi:10.2174/0929867325666171226115626
85. Huang L, Li Z, Zhao Y, et al. Ultralow-Power Near Infrared Lamp Light Operable Targeted Organic Nanoparticle Photodynamic Therapy. *J Am Chem Soc*. 2016;138(44):14586-14591. doi:10.1021/jacs.6b05390
86. Dutta D, Wang J, Li X, Zhou Q, Ge Z. Covalent Organic Framework Nanocarriers of Singlet Oxygen for Oxygen-Independent Concurrent Photothermal/Photodynamic Therapy to Ablate Hypoxic Tumors. *Small*. 2022;18(37). doi:10.1002/smll.202202369
87. Han HS, Choi KY. Advances in nanomaterial-mediated photothermal cancer therapies: Toward clinical applications. *Biomedicines*. MDPI AG. 2021;9(3). doi:10.3390/biomedicines9030305
88. Chen J, Ning C, Zhou Z, et al. Nanomaterials as photothermal therapeutic agents. *Prog Mater Sci. Elsevier Ltd*. 2019;99:1-26. doi:10.1016/j.pmatsci.2018.07.005
89. Kim D, Kim H. Optimization of Photothermal Therapy Treatment Effect under Various Laser Irradiation Conditions. *Int J Mol Sci*. 2022;23(11). doi:10.3390/ijms23115928

90. Estelrich J, Antònia Busquets M. Iron oxide nanoparticles in photothermal therapy. *Molecules*. MDPI AG. 2018;23(7). doi:10.3390/molecules23071567
91. ISO 20473:2007. ISO 20473:2007 - Optics and photonics — Spectral bands. ISO. 2007. Accessed February 4, 2025. <https://www.iso.org/standard/39482.html>
92. Instituto Nacional Americano de Padrões. *Norma Nacional Americana Para Uso Seguro de Lasers*. 2000.
93. Lucas Portilho. Efeitos da Luz visível sobre a Pele. January 9, 2023. Accessed December 28, 2024. <https://www.lucasportilho.com/post/2019/06/17/efeitos-da-luz-vis%C3%ADvel-sobre-a-pele>
94. Hamblin MR, Huang YY, Vecchio D, Avci P, Yin R, Garcia-Diaz M. Melanoma resistance to photodynamic therapy: New insights. *Biol Chem. Walter de Gruyter GmbH*. 2013;394(2):239-250. doi:10.1515/hsz-2012-0228
95. Czarnecka AM, Bartnik E, Fiedorowicz M, Rutkowski P. Targeted therapy in melanoma and mechanisms of resistance. *Int J Mol Sci. MDPI AG*. 2020;21(13):1-21. doi:10.3390/ijms21134576
96. Valli F, García Vior MC, Roguin LP, Marino J. Crosstalk between oxidative stress-induced apoptotic and autophagic signaling pathways in Zn(II) phthalocyanine photodynamic therapy of melanoma. *Free Radic Biol Med*. 2020;152:743-754. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.01.018
97. Hamblin MR, Huang YY, Vecchio D, Avci P, Yin R, Garcia-Diaz M. Melanoma resistance to photodynamic therapy: New insights. *Biol Chem. Walter de Gruyter GmbH*. 2013;394(2):239-250. doi:10.1515/hsz-2012-0228
98. Sharma SK, Huang YY, Hamblin MR. Melanoma Resistance to Photodynamic Therapy. In: 2015:229-246. doi:10.1007/978-3-319-12730-9_11
99. Baldea I, Giurgiu L, Teacoe ID, et al. Photodynamic Therapy in Melanoma - Where do we Stand? *Curr Med Chem*. 2017;25(40):5540-5563. doi:10.2174/0929867325666171226115626
100. Huang X, Wu J, He M, et al. Combined Cancer Chemo-Photodynamic and Photothermal Therapy Based on ICG/PDA/TPZ-Loaded Nanoparticles. *Mol Pharm*. 2019;16(5):2172-2183. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.9b00119
101. Sahu A, Choi W II, Lee JH, Tae G. Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*. 2013;34(26):6239-6248. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.04.066
102. Li X, Fang F, Sun B, et al. Near-infrared small molecule coupled with rigidity and flexibility for high-performance multimodal imaging-guided photodynamic and photothermal synergistic therapy. *Nanoscale Horiz*. 2021;6(2):177-185. doi:10.1039/d0nh00672f

103. Novoselov KS, Morozov S V., Mohinddin TMG, et al. Electronic properties of graphene. *physica status solidi (b)*. 2007;244(11):4106-4111. doi:10.1002/pssb.200776208
104. Stoller MD, Park S, Zhu Y, An J, Ruoff RS. Graphene-Based Ultracapacitors. *Nano Lett*. 2008;8(10):3498-3502. doi:10.1021/nl802558y
105. Marcano DC, Kosynkin D V., Berlin JM, et al. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano*. 2010;4(8):4806-4814. doi:10.1021/nn1006368
106. Hummers WS, Offeman RE. *Preparation of Graphitic Oxide*. 1958. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
107. Romero MP, Marangoni VS, de Faria CG, et al. Graphene Oxide Mediated Broad-Spectrum Antibacterial Based on Bimodal Action of Photodynamic and Photothermal Effects. *Front Microbiol*. 2020;10. doi:10.3389/fmicb.2019.02995
108. He Y, del Valle A, Qian Y, Huang YF. Near infrared light-mediated enhancement of reactive oxygen species generation through electron transfer from graphene oxide to iron hydroxide/oxide. *Nanoscale*. 2017;9(4):1559-1566. doi:10.1039/C6NR08784A
109. Li Q, Hong L, Li H, Liu C. Graphene oxide-fullerene C60 (GO-C60) hybrid for photodynamic and photothermal therapy triggered by near-infrared light. *Biosens Bioelectron*. 2017;89:477-482. doi:10.1016/j.bios.2016.03.072
110. Maiti R, Midya A, Narayana C, Ray SK. Tunable optical properties of graphene oxide by tailoring the oxygen functionalities using infrared irradiation. *Nanotechnology*. 2014;25(49):495704. doi:10.1088/0957-4484/25/49/495704
111. Wu C, Li D, Wang L, et al. Single wavelength light-mediated, synergistic bimodal cancer photoablation and amplified photothermal performance by graphene/gold nanostar/photosensitizer theranostics. *Acta Biomater*. 2017;53:631-642. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.078
112. Guo S, Song Z, Ji DK, et al. Combined Photothermal and Photodynamic Therapy for Cancer Treatment Using a Multifunctional Graphene Oxide. *Pharmaceutics*. 2022;14(7):1365. doi:10.3390/pharmaceutics14071365
113. Khan MS, Pandey S, Bhaisare ML, Gedda G, Talib A, Wu HF. Graphene oxide@gold nanorods for chemo-photothermal treatment and controlled release of doxorubicin in mice Tumor. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017;160:543-552. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.09.001
114. Luccock M. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. *Mol Genet Metab*. 2000;71(1-2):121-138. doi:10.1006/mgme.2000.3027
115. Di Tinno A, Cancelliere R, Micheli L. Determination of Folic Acid Using Biosensors—A Short Review of Recent Progress. *Sensors*. 2021;21(10):3360. doi:10.3390/s21103360

116. Davis RE. Clinical Chemistry of Folic Acid. In: 1986:233-294. doi:10.1016/S0065-2423(08)60127-4
117. Cieřlik E, Cieřlik I. Occurrence and significance of folic acid. *Pteridines*. 2018;29(1):187-195. doi:10.1515/pteridines-2018-0017
118. Baibarac M, Smaranda I, Nila A, Serbschi C. Optical properties of folic acid in phosphate buffer solutions: the influence of pH and UV irradiation on the UV-VIS absorption spectra and photoluminescence. *Sci Rep*. 2019;9(1):14278. doi:10.1038/s41598-019-50721-z
119. Beztsinna N, Solé M, Taib N, Bestel I. Bioengineered riboflavin in nanotechnology. *Biomaterials*. 2016;80:121-133. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.050
120. J. Henriques B, K. Olsen R, Bross P, M. Gomes C. Emerging Roles for Riboflavin in Functional Rescue of Mitochondrial β-Oxidation Flavoenzymes. *Curr Med Chem*. 2010;17(32):3842-3854. doi:10.2174/092986710793205462
121. Zanetti-Polzi L, Aschi M, Daidone I, Amadei A. Theoretical modeling of the absorption spectrum of aqueous riboflavin. *Chem Phys Lett*. 2017;669:119-124. doi:10.1016/j.cplett.2016.12.022
122. Bitsch I, Bitsch R. Riboflavin: Properties and Determination. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier; 2016:633-640. doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00593-6
123. Ionita G, Matei I. Application of Riboflavin Photochemical Properties in Hydrogel Synthesis. In: *Biophysical Chemistry - Advance Applications*. IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.88855
124. Xu F, Li J, Zhu T ting, et al. A new trick (hydroxyl radical generation) of an old vitamin (B₂) for near-infrared-triggered photodynamic therapy. *RSC Adv*. 2016;6(104):102647-102656. doi:10.1039/C6RA23440B
125. Brown CJ. Crystal structure of β -copper phthalocyanine. *J Chem Soc A*. 1968;0(0):2488-2493. doi:10.1039/J19680002488
126. Christie R, Abel A. Phthalocyanine blue pigments. *Physical Sciences Reviews*. 2021;6(9):391-404. doi:10.1515/psr-2020-0192
127. Djuriřić AB, Kwong CY, Lau TW, et al. Optical properties of copper phthalocyanine. *Opt Commun*. 2002;205(1-3):155-162. doi:10.1016/S0030-4018(02)01311-1
128. Hussein MT, Mohammed RR. Study the Nonlinearity Characteristics of Organic-Semiconductor (CuPc) Prepared Via Pulsed Laser Deposition Technique with Different Thickness. *Nano Hybrids and Composites*. 2019;27:11-20. doi:10.4028/www.scientific.net/NHC.27.11

129. Mahmut Z, Zhang C, Ruan F, et al. Medical Applications and Advancement of Near Infrared Photosensitive Indocyanine Green Molecules. *Molecules*. 2023;28(16):6085. doi:10.3390/molecules28166085
130. Hu D, Zha M, Zheng H, Gao D, Sheng Z. Recent Advances in Indocyanine Green-Based Probes for Second Near-Infrared Fluorescence Imaging and Therapy. *Research*. 2025;8. doi:10.34133/research.0583
131. Li D, Smith BD. Deuterated Indocyanine Green (ICG) with Extended Aqueous Storage Shelf-Life: Chemical and Clinical Implications. *Chemistry – A European Journal*. 2021;27(58):14535-14542. doi:10.1002/chem.202102816
132. Jo E, Savsani K, Alfonso A, et al. Photodynamic effect of indocyanine green and its application to hepatocellular carcinoma treatment. *J Cancer Metastasis Treat*. Published online April 11, 2024. doi:10.20517/2394-4722.2024.18
133. Radzi R, Osaki T, Tsuka T, Imagawa T, Minami S, Okamoto Y. Morphological Study in B16F10 Murine Melanoma Cells after Photodynamic Hyperthermal Therapy with Indocyanine Green (ICG). *Journal of Veterinary Medical Science*. 2012;74(4):465-472. doi:10.1292/jvms.11-0467
134. Shirata C, Kaneko J, Inagaki Y, et al. Near-infrared photothermal/photodynamic therapy with indocyanine green induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through oxidative stress. *Sci Rep*. 2017;7(1):13958. doi:10.1038/s41598-017-14401-0
135. Acar HY, Bilici K, Atac N, et al. Broad Spectrum Antibacterial Photodynamic and Photothermal Therapy Achieved with Indocyanine Green Loaded SPIONs under Near Infrared Irradiation. Preprint posted online May 12, 2020. doi:10.21203/rs.3.rs-27911/v1
136. Zhu S, Wang S, Liu C, Lyu M, Huang Q. Cu-Hemin Nanosheets and Indocyanine Green Co-Loaded Hydrogel for Photothermal Therapy and Amplified Photodynamic Therapy. *Front Oncol*. 2022;12. doi:10.3389/fonc.2022.918416
137. Singh DP, Herrera CE, Singh B, Singh S, Singh RK, Kumar R. Graphene oxide: An efficient material and recent approach for biotechnological and biomedical applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;86:173-197. doi:10.1016/j.msec.2018.01.004
138. Parsamehr PS, Zahed M, Tofighy MA, Mohammadi T, Rezakazemi M. Preparation of novel cross-linked graphene oxide membrane for desalination applications using (EDC and NHS)-activated graphene oxide and PEI. *Desalination*. 2019;468:114079. doi:10.1016/j.desal.2019.114079
139. Bansal SA, Singh S, Srivastava A, Singh AP, Kumar S. Covalent attachment of 2D graphene oxide (GO) sheets with poly allylamine (PAA) for enhanced mechanical performance: Theoretical and experimental study. *Polymer (Guildf)*. 2021;213:123195. doi:10.1016/j.polymer.2020.123195

140. Vacchi IA, Raya J, Bianco A, Ménard-Moyon C. Controlled derivatization of hydroxyl groups of graphene oxide in mild conditions. *2d Mater.* 2018;5(3):035037. doi:10.1088/2053-1583/aac8a9
141. Huber F, Berwanger J, Polesya S, Mankovsky S, Ebert H, Giessibl FJ. Chemical bond formation showing a transition from physisorption to chemisorption. *Science (1979)*. 2019;366(6462):235-238. doi:10.1126/science.aay3444
142. Deka MJ, Chowdhury D. Tuning Electrical Properties of Graphene with Different π -Stacking Organic Molecules. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2016;120(7):4121-4129. doi:10.1021/acs.jpcc.5b12403
143. Ding YF, Kwong CHT, Li S, et al. Supramolecular nanomedicine derived from cucurbit[7]uril-conjugated nano-graphene oxide for multi-modality cancer therapy. *Biomater Sci.* 2021;9(10):3804-3813. doi:10.1039/D1BM00426C
144. Zhang X, Zhang P, Wu Z, Zhang L, Zeng G, Zhou C. Adsorption of methylene blue onto humic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* Published online 2013. doi:10.1016/j.colsurfa.2012.12.056
145. Georgakilas V, Tiwari JN, Kemp KC, et al. Noncovalent Functionalization of Graphene and Graphene Oxide for Energy Materials, Biosensing, Catalytic, and Biomedical Applications. *Chem Rev.* 2016;116(9):5464-5519. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00620
146. Nebol'sin VA, Galstyan V, Silina YE. Graphene oxide and its chemical nature: Multi-stage interactions between the oxygen and graphene. *Surfaces and Interfaces.* 2020;21:100763. doi:10.1016/j.surfin.2020.100763
147. Aliyev E, Filiz V, Khan MM, Lee YJ, Abetz C, Abetz V. Structural Characterization of Graphene Oxide: Surface Functional Groups and Fractionated Oxidative Debris. *Nanomaterials.* 2019;9(8):1180. doi:10.3390/nano9081180
148. Xiong K, Fan Q, Wu T, Shi H, Chen L, Yan M. Enhanced bovine serum albumin absorption on the N-hydroxysuccinimide activated graphene oxide and its corresponding cell affinity. *Materials Science and Engineering: C.* 2017;81:386-392. doi:10.1016/j.msec.2017.08.044
149. Zhang K, Gai X, Zhang X, et al. Preparation of nitrogen and sulfur co-doped graphene/Fe₃O₄/C nanocomposite and study on the absorbing properties. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics.* 2021;32(7):8807-8818. doi:10.1007/s10854-021-05552-y
150. Norouzi M, DS, KM, & FR. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Theranostics. *Advances in Materials Science and Engineering.* 2018;2(1). doi:10.33140/AMSE/02/01/04
151. Ahmed A, Kim E, Jeon S, Kim J, Choi H. Closed-Loop Temperature-Controlled Magnetic Hyperthermia Therapy with Magnetic Guidance of

- Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles. *Adv Ther (Weinh)*. 2022;5(2). doi:10.1002/adtp.202100237
152. Dulińska-Litewka J, Łazarczyk A, Hałubiec P, Szafranski O, Karnas K, Karewicz A. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles—Current and Prospective Medical Applications. *Materials*. 2019;12(4):617. doi:10.3390/ma12040617
 153. Janko C, Ratschker T, Nguyen K, et al. Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) as Platform for the Targeted Multimodal Tumor Therapy. *Front Oncol*. 2019;9. doi:10.3389/fonc.2019.00059
 154. Ahmed A, Kim E, Jeon S, Kim J, Choi H. Closed-Loop Temperature-Controlled Magnetic Hyperthermia Therapy with Magnetic Guidance of Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles. *Adv Ther (Weinh)*. 2022;5(2). doi:10.1002/adtp.202100237
 155. Osborne EA, Atkins TM, Gilbert DA, Kauzlarich SM, Liu K, Louie AY. Rapid microwave-assisted synthesis of dextran-coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Nanotechnology*. 2012;23(21):215602. doi:10.1088/0957-4484/23/21/215602
 156. Hemery G, Keyes AC, Garaio E, et al. Tuning Sizes, Morphologies, and Magnetic Properties of Monocore Versus Multicore Iron Oxide Nanoparticles through the Controlled Addition of Water in the Polyol Synthesis. *Inorg Chem*. 2017;56(14):8232-8243. doi:10.1021/acs.inorgchem.7b00956
 157. Riasat R, Nie G. Synthesis and Characterization of Nontoxic Hollow Iron Oxide Nanoparticles Using a Simple Hydrothermal Strategy. *J Nanomater*. 2016;2016:1-7. doi:10.1155/2016/1920475
 158. Ali A, Zafar H, Zia M, et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl*. 2016;Volume 9:49-67. doi:10.2147/NSA.S99986
 159. Wei T, Wen X, Wu D, Shen J, Wei Y, Wang C. One-step hydrothermal synthesis of magnetic nitrogen-doped graphene for magnetic solid-phase extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples. *J Sep Sci*. 2020;43(15):3110-3119. doi:10.1002/jssc.202000275
 160. Yokwana K, Ntsendwana B, Nxumalo EN, Mhlanga SD. Recent advances in nitrogen-doped graphene oxide nanomaterials: Synthesis and applications in energy storage, sensor electrochemical applications and water treatment. *J Mater Res*. 2023;38(13):3239-3263. doi:10.1557/s43578-023-01070-1
 161. Oladoyinbo FO. Hexamethylenetetramine (C₆H₁₂N₄) Induced High-Density Nitrogen Doped Reduced Graphene: A Novel Sono-Microwave Assisted Synthesis And Characterization Towards Renewable Energies Applications. *Journal of Chemical Society of Nigeria*. 2023;48(4). doi:10.46602/jcsn.v48i4.910
 162. Garino N, Zeng J, Castellino M, et al. Facilely synthesized nitrogen-doped reduced graphene oxide functionalized with copper ions as electrocatalyst for

- oxygen reduction. *NPJ 2D Mater Appl.* 2021;5(1):2. doi:10.1038/s41699-020-00185-x
163. Wojnarowicz J, Chudoba T, Lojkowski W. A Review of Microwave Synthesis of Zinc Oxide Nanomaterials: Reactants, Process Parameters and Morphologies. *Nanomaterials*. 2020;10(6):1086. doi:10.3390/nano10061086
 164. Alam SN, Sharma N, Kumar L. Synthesis of Graphene Oxide (GO) by Modified Hummers Method and Its Thermal Reduction to Obtain Reduced Graphene Oxide (rGO)*. *Graphene*. 2017;06(01):1-18. doi:10.4236/graphene.2017.61001
 165. Kota M, Yu X, Yeon SH, Cheong HW, Park HS. Ice-templated three dimensional nitrogen doped graphene for enhanced supercapacitor performance. *J Power Sources*. 2016;303:372-378. doi:10.1016/j.jpowsour.2015.11.006
 166. Rodrigues BM, Diniz CC, da Rocha VN, et al. First report of trans-A2B-corrole derived from a lapachone derivative: photophysical, TD-DFT and photobiological assays. *RSC Adv.* 2023;13(16):11121-11129. doi:10.1039/D3RA00823A
 167. Georgitsopoulou S, Stola ND, Bakandritsos A, Georgakilas V. Advancing the boundaries of the covalent functionalization of graphene oxide. *Surfaces and Interfaces*. 2021;26:101320. doi:10.1016/j.surfin.2021.101320
 168. Han JL, Xia X, Tao Y, et al. Shielding membrane surface carboxyl groups by covalent-binding graphene oxide to improve anti-fouling property and the simultaneous promotion of flux. *Water Res.* 2016;102:619-628. doi:10.1016/j.watres.2016.06.032
 169. Hubbell AK, Coates GW. Nucleophilic Transformations of Lewis Acid-Activated Disubstituted Epoxides with Catalyst-Controlled Regioselectivity. *J Org Chem.* 2020;85(21):13391-13414. doi:10.1021/acs.joc.0c01691
 170. Zhang J, Lu X, Shi C, et al. Unraveling the molecular interaction mechanism between graphene oxide and aromatic organic compounds with implications on wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*. 2019;358:842-849. doi:10.1016/j.cej.2018.10.064
 171. Esmaeili Y, Bidram E, Zarrabi A, Amini A, Cheng C. Graphene oxide and its derivatives as promising In-vitro bio-imaging platforms. *Sci Rep.* 2020;10(1). doi:10.1038/s41598-020-75090-w
 172. Gul W, Alrobei H. Effect of graphene oxide nanoparticles on the physical and mechanical properties of medium density fiberboard. *Polymers (Basel)*. 2021;13(11). doi:10.3390/polym13111818
 173. Kanta UA, Thongpool V, Sangkhun W, Wongyao N, Wootthikanokkhan J. Preparations, characterizations, and a comparative study on photovoltaic performance of two different types of graphene/TiO₂ nanocomposites photoelectrodes. *J Nanomater.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/2758294

174. Parin FN, Ullah S, Yıldırım K, Hashmi M, Kim IS. Fabrication and characterization of electrospun folic acid/hybrid fibers: In vitro controlled release study and cytocompatibility assays. *Polymers (Basel)*. 2021;13(20). doi:10.3390/polym13203594
175. İnce İ, Yıldırım Y, Güler G, et al. Synthesis and characterization of folic acid-chitosan nanoparticles loaded with thymoquinone to target ovarian cancer cells. *J Radioanal Nucl Chem*. 2020;324(1):71-85. doi:10.1007/s10967-020-07058-z
176. He YY, Wang XC, Jin PK, Zhao B, Fan X. Complexation of anthracene with folic acid studied by FTIR and UV spectroscopies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2009;72(4):876-879. doi:10.1016/j.saa.2008.12.021
177. Qin XC, Guo ZY, Liu ZM, Zhang W, Wan MM, Yang BW. Folic acid-conjugated graphene oxide for cancer targeted chemo-photothermal therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2013;120:156-162. doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.12.005
178. Swidan MM, Essa BM, Sakr TM. Pristine/folate-functionalized graphene oxide as two intrinsically radioiodinated nano-theranostics: self/dual in vivo targeting comparative study. *Cancer Nanotechnol*. 2023;14(1):6. doi:10.1186/s12645-023-00157-y
179. João Bosco Ferreira da Conceição; Anderson de Jesus Gomes. *Riboflavina Associada a Nanopartículas de Ácido Poli-Lático Carregadas Com e Melatonina: Síntese, Caracterização Físico-Química, Morfológica E Citotóxica in Vitro*. Universidade de Brasília; 2019. Accessed January 28, 2025. <http://www.realp.unb.br/jspui/handle/10482/45999>
180. Wojciechowski C, Dupuy N, Ta CD, Huvenne JP, Legrand P. Quantitative analysis of water-soluble vitamins by ATR-FTIR spectroscopy. *Food Chem*. 1998;63(1):133-140. doi:10.1016/S0308-8146(97)00138-6
181. Alqerban A. Effectiveness of Riboflavin and Rose Bengal Photosensitizer Modified Adhesive Resin for Orthodontic Bonding. *Pharmaceuticals*. 2021;14(1):48. doi:10.3390/ph14010048
182. Jin B, Zhou X, Li X, Lin W, Chen G, Qiu R. Self-Assembled Modified Soy Protein/Dextran Nanogel Induced by Ultrasonication as a Delivery Vehicle for Riboflavin. *Molecules*. 2016;21(3):282. doi:10.3390/molecules21030282
183. Bonetti C, Mathes T, van Stokkum IHM, et al. Hydrogen Bond Switching among Flavin and Amino Acid Side Chains in the BLUF Photoreceptor Observed by Ultrafast Infrared Spectroscopy. *Biophys J*. 2008;95(10):4790-4802. doi:10.1529/biophysj.108.139246
184. Khoso FM, Duan MY, Yang B, Liu GC, Zhu X, Yu JG. Synthesis, characterization, and application of riboflavin covalently functionalized graphene oxide (RF-GO composite) for selective removal of Cd²⁺. *New Journal of Chemistry*. 2026;50(2):1077-1091. doi:10.1039/D5NJ03610K

185. Topuz BB, Gündüz G, Mavis B, Çolak Ü. Synthesis and characterization of copper phthalocyanine and tetracarboxamide copper phthalocyanine deposited mica-titania pigments. *Dyes and Pigments*. 2013;96(1):31-37. doi:10.1016/j.dyepig.2012.06.010
186. Xin G, Wang H, Kim N, Hwang W, Cho SM, Chae H. Investigation of charge-transfer complexes formation between photoluminescent graphene oxide and organic molecules. *Nanoscale*. 2012;4(2):405-407. doi:10.1039/C1NR11062D
187. Patrizi B, Cozza C, Pietropaolo A, Foggi P, Siciliani de Cumis M. Synergistic Approach of Ultrafast Spectroscopy and Molecular Simulations in the Characterization of Intramolecular Charge Transfer in Push-Pull Molecules. *Molecules*. 2020;25(2):430. doi:10.3390/molecules25020430
188. Suguna S, David CI, Prabhu J, Nandhakumar R. Functionalized graphene oxide materials for the fluorometric sensing of various analytes: a mini review. *Mater Adv*. 2021;2(19):6197-6212. doi:10.1039/D1MA00467K
189. Cole JM. Enumerating Intramolecular Charge Transfer in Conjugated Organic Compounds. *J Chem Inf Model*. 2020;60(12):6095-6108. doi:10.1021/acs.jcim.0c00913
190. Dey N, Biswakarma D, Bajpai A, Moorthy JN, Bhattacharya S. Modulation of Excited-State Proton-Transfer Dynamics inside the Nanocavity of Microheterogeneous Systems: Microenvironment-Sensitive Förster Energy Transfer to Riboflavin. *ChemPhysChem*. 2019;20(6):881-889. doi:10.1002/cphc.201801085
191. Lavie-Cambot A, Lincheneau C, Cantuel M, Leydet Y, McClenaghan ND. Reversible electronic energy transfer: a means to govern excited-state properties of supramolecular systems. *Chem Soc Rev*. 2010;39(2):506-515. doi:10.1039/B810669J
192. Uran S, Alhani A, Silva C. Study of ultraviolet-visible light absorbance of exfoliated graphite forms. *AIP Adv*. 2017;7(3). doi:10.1063/1.4979607
193. Ojrzynska M, Wroblewska A, Judek J, Malolepszy A, Duzynska A, Zdrojek M. Study of optical properties of graphene flakes and its derivatives in aqueous solutions. *Opt Express*. 2020;28(5):7274. doi:10.1364/OE.382523
194. (Bidram) E, (Dunstan) D, (Stewart) A. Graphene Oxide as a Photoluminated Carrier. *Mater Today Proc*. 2016;3(2):240-244. doi:10.1016/j.matpr.2016.01.064
195. Novikova AS, Ponomaryova TS, Goryacheva IYu. Fluorescent AgInS/ZnS quantum dots microplate and lateral flow immunoassays for folic acid determination in juice samples. *Microchimica Acta*. 2020;187(8):427. doi:10.1007/s00604-020-04398-1
196. Iyer SN, Behary N, Nierstrasz V, Guan J, Chen G. Study of photoluminescence property on cellulosic fabric using multifunctional biomaterials riboflavin and its derivative Flavin mononucleotide. *Sci Rep*. 2019;9(1):8696. doi:10.1038/s41598-019-45021-5

197. Han J, Zou HY, Gao MX, Huang CZ. A graphitic carbon nitride based fluorescence resonance energy transfer detection of riboflavin. *Talanta*. 2016;148:279-284. doi:10.1016/j.talanta.2015.10.038
198. Robinson GW. Intensity Enhancement of Forbidden Electronic Transitions by Weak Intermolecular Interactions. *J Chem Phys*. 1967;46(2):572-585. doi:10.1063/1.1840705
199. Avila Ferrer FJ, Cerezo J, Stendardo E, Improta R, Santoro F. Insights for an Accurate Comparison of Computational Data to Experimental Absorption and Emission Spectra: Beyond the Vertical Transition Approximation. *J Chem Theory Comput*. 2013;9(4):2072-2082. doi:10.1021/ct301107m
200. Ortí E, Brédas JL, Clarisse C. Electronic structure of phthalocyanines: Theoretical investigation of the optical properties of phthalocyanine monomers, dimers, and crystals. *J Chem Phys*. 1990;92(2):1228-1235. doi:10.1063/1.458131
201. Kumar GA, Thomas J, Unnikrishnan NV, Nampoori VPN, Vallabhan CPG. Optical properties of phthalocyanine molecules in cyano acrylate polymer matrix. *Mater Res Bull*. 2001;36(1-2):1-8. doi:10.1016/S0025-5408(01)00484-6
202. Cataldo F. Synthesis and study of electronic spectra of planar polymeric phthalocyanines. *Dyes and Pigments*. 1997;34(1):75-85. doi:10.1016/S0143-7208(96)00059-9
203. Tuček J, Kemp KC, Kim KS, Zbořil R. Iron-Oxide-Supported Nanocarbon in Lithium-Ion Batteries, Medical, Catalytic, and Environmental Applications. *ACS Nano*. 2014;8(8):7571-7612. doi:10.1021/nn501836x
204. Malinga NN. *Synthesis and Characterisation of Magnetic Graphene-Nanoparticle Composites for Water Purification*. Tese de Doutorado. University of KwaZulu-Natal, Howard College.; 2021.
205. Yokwana K, Ntsendwana B, Nxumalo EN, Mhlanga SD. Recent advances in nitrogen-doped graphene oxide nanomaterials: Synthesis and applications in energy storage, sensor electrochemical applications and water treatment. *J Mater Res*. 2023;38(13):3239-3263. doi:10.1557/s43578-023-01070-1
206. Iordache M, Oubraham A, Sorlei IS, et al. Noble Metals Functionalized on Graphene Oxide Obtained by Different Methods—New Catalytic Materials. *Nanomaterials*. 2023;13(4):783. doi:10.3390/nano13040783
207. Yang W, Rehman S, Chu X, Hou Y, Gao S. Transition Metal (Fe, Co and Ni) Carbide and Nitride Nanomaterials: Structure, Chemical Synthesis and Applications. *ChemNanoMat*. 2015;1(6):376-398. doi:10.1002/cnma.201500073
208. Beigiazaraghbelagh P, Poursattar Marjani A. Carbon-based catalysts: advances in synthesizing N-heterocyclic compounds using graphene family and graphite oxide. *Research on Chemical Intermediates*. 2024;50(2):485-531. doi:10.1007/s11164-023-05205-1

209. Carvalho AS, Oliveira DM, Assis LKCS, et al. Synthesis of nanocomposites based on Fe₃O₄ nanoparticles and nitrogen-doped reduced graphene oxide aerogel by ex-situ approach and their magnetic properties. *J Alloys Compd.* 2023;968:172038. doi:10.1016/j.jallcom.2023.172038
210. Saini R, Naaz F, Bashal AH, Pandit AH, Farooq U. Recent advances in nitrogen-doped graphene-based heterostructures and composites: mechanism and active sites for electrochemical ORR and HER. *Green Chemistry.* 2024;26(1):57-102. doi:10.1039/D3GC03576J
211. Mourdikoudis S, Kostopoulou A, LaGrow AP. Magnetic Nanoparticle Composites: Synergistic Effects and Applications. *Advanced Science.* 2021;8(12). doi:10.1002/advs.202004951
212. Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim WS. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater.* 2015;16(2):023501. doi:10.1088/1468-6996/16/2/023501
213. Chaudhary K, Kumar K, Venkatesu P, Masram DT. In-depth understanding of a nano-bio interface between lysozyme and Au NP-immobilized N-doped reduced graphene oxide 2-D scaffolds. *Nanoscale Adv.* 2020;2(5):2146-2159. doi:10.1039/D0NA00155D
214. Damasceno BS, da Silva AFV, Ferreira MC, de Melo AN, Leite DMG, de Araújo ACV. A facile and eco-friendly hydrothermal synthesis of magnetic graphite nanocomposite and its application in water purification. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 2023;670:131528. doi:10.1016/j.colsurfa.2023.131528
215. Hatel R, Majdoub S El, Bakour A, Khenfouch M, Baitoul M. Graphene oxide/Fe₃O₄ nanorods composite: structural and Raman investigation. *J Phys Conf Ser.* 2018;1081:012006. doi:10.1088/1742-6596/1081/1/012006
216. Pramanik N, De J, Basu RK, Rath T, Kundu PP. Fabrication of magnetite nanoparticle doped reduced graphene oxide grafted polyhydroxyalkanoate nanocomposites for tissue engineering application. *RSC Adv.* 2016;6(52):46116-46133. doi:10.1039/C6RA03233H
217. Kimiagar S, Abrinaei F. Third-order optical nonlinearity of N-doped graphene oxide nanocomposites at different GO ratios. *Opt Mater (Amst).* 2018;79:120-128. doi:10.1016/j.optmat.2018.03.030
218. Stankovich S, Dikin DA, Piner RD, et al. Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon N Y.* 2007;45(7):1558-1565. doi:10.1016/j.carbon.2007.02.034
219. Mitra S, Hamada N, Mitra SK. Experimental observation and characterization of amorphous carbon generated in graphene on gold nanoparticles. *RSC Adv.* 2024;14(35):25307-25315. doi:10.1039/D4RA04893H
220. López-Díaz D, Delgado-Notario JA, Clericò V, Diez E, Merchán MD, Velázquez MM. Towards Understanding the Raman Spectrum of Graphene Oxide: The

- Effect of the Chemical Composition. *Coatings*. 2020;10(6):524.
doi:10.3390/coatings10060524
221. Sun L, Wang L, Tian C, et al. Nitrogen-doped graphene with high nitrogen level via a one-step hydrothermal reaction of graphene oxide with urea for superior capacitive energy storage. *RSC Adv*. 2012;2(10):4498.
doi:10.1039/c2ra01367c
 222. Mi H, Yang X, Hu J, Zhang Q, Liu J. Carbothermal synthesis of nitrogen-doped graphene composites for energy conversion and storage devices. *Front Chem*. 2018;6(OCT). doi:10.3389/fchem.2018.00501
 223. Witjaksono G, Junaid M, Khir MH, et al. Effect of Nitrogen Doping on the Optical Bandgap and Electrical Conductivity of Nitrogen-Doped Reduced Graphene Oxide. *Molecules*. 2021;26(21):6424.
doi:10.3390/molecules26216424
 224. Muthuvijayan S, Banerjee D, Chatterjee S, Theivasanthi T, Gopinath SCB. Nitrogen-doped graphene and iron oxide nanoparticles for photocatalytic degradation. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2025;168:105950.
doi:10.1016/j.jtice.2025.105950
 225. Akhmetsadyk D, Ilyin A, Sagidolda E, Beall G. Functionalization of Graphene Oxide by Nitrogen. *BULLETIN of D Serikbayev EKTU*. 2023;2:43-52.
doi:10.51885/1561-4212_2023_2_43
 226. Anwar A, Mohammed BS, Wahab MBA, Muthusamy K, Liew MS. Structural Quality of Graphene Oxide Nanosheets on the Basis of Defect Ratio: A Raman Study. In: 2021:423-439. doi:10.1007/978-981-15-9505-9_38
 227. Ferrari AC, Robertson J. Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon. *Phys Rev B*. 2000;61(20):14095-14107.
doi:10.1103/PhysRevB.61.14095
 228. Mageed AK, Dayang RAB, Salmiaton A, et al. *Preparation and Characterization of Nitrogen Doped Reduced Graphene Oxide Sheet*. Vol 12. 2016.
<http://www.ripublication.com>
 229. Zafar S, Khan BA, Ahmad I, et al. Hydrothermal synthesis of Fe₂O₃ –Ag₂O nanocomposites supported on pristine, N/S doped graphene oxide for photocatalytic and biological applications. *RSC Adv*. 2025;15(37):30089-30099.
doi:10.1039/D5RA05475C
 230. Su S, Lin Y, Dai H, Lai L, Zhu X. Nitrogen-Doped Porous Graphene Coated with Fe₃O₄ Nanoparticles for Advanced Supercapacitor Electrode Material with Improved Electrochemical Performance. *Particle & Particle Systems Characterization*. 2020;37(4). doi:10.1002/ppsc.202000011
 231. Zhou N, An Q, Xiao Z, Zhai S, Shi Z. Solvothermal synthesis of three-dimensional, Fe₂O₃NPs-embedded CNT/N-doped graphene composites with excellent microwave absorption performance. *RSC Adv*. 2017;7(71):45156-45169. doi:10.1039/C7RA06751H

232. Setiadi S, Nuryadin BW, Ramadhan H, et al. Preparation of reduced Graphene Oxide (rGO) assisted by microwave irradiation and hydrothermal for reduction methods. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*. 2018;434:012079. doi:10.1088/1757-899X/434/1/012079
233. Kaur M, Kaur H, Kukkar D. Synthesis and characterization of graphene oxide using modified Hummer's method. In: 2018:030180. doi:10.1063/1.5032515
234. Sherin JFJ, Vijayakumar C, Bindhu MR, Gatasheh MK, Hatamleh AA, Arokiyaraj S. UV Light-Assisted Photodegradation of Industrial Dyes by Reduced Graphene Oxide/Nickel Codoped Fe_3O_4 Nanocomposites Synthesized Using the Coprecipitation Method. *physica status solidi (a)*. 2023;220(14). doi:10.1002/pssa.202300076
235. Kaveh R, Mokhtarifar M, Bagherzadeh M, Lucotti A, Diamanti MV, Pedferri M. Magnetically Recoverable $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{rGO}$ Composite with Significantly Enhanced UV-Visible Light Photocatalytic Activity. *Molecules*. 2020;25(13):2996. doi:10.3390/molecules25132996
236. Mahmoodabadi M, Goodarzi MT, Salehi N, Jalali A, Zahedi E. Investigation of structure, optical, and photothermal properties in $\text{MoS}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{CuS}$ nanocomposite for doxorubicin delivery. *Applied Physics A*. 2025;131(1):81. doi:10.1007/s00339-024-08202-2
237. Hill CM, Zhu Y, Pan S. Fluorescence and Electroluminescence Quenching Evidence of Interfacial Charge Transfer in Poly (3-hexylthiophene): Graphene Oxide Bulk Heterojunction Photovoltaic Devices. *ACS Nano*. 2011;5(2):942-951. doi:10.1021/nn1022457
238. Wang C, Qian J, Wang K, et al. Nitrogen-Doped Graphene Quantum Dots@ SiO_2 Nanoparticles as Electrochemiluminescence and Fluorescence Signal Indicators for Magnetically Controlled Aptasensor with Dual Detection Channels. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(48):26865-26873. doi:10.1021/acsami.5b09300
239. Wu D, Qu C, Wang J, Yang R, Qu L. Highly sensitive and selective fluorescence sensing and imaging of Fe^{3+} based on a novel nitrogen-doped graphene quantum dots. *Luminescence*. 2021;36(7):1592-1599. doi:10.1002/bio.4062
240. Valimukhametova AR, Fannon O, Topkiran UC, et al. Five near-infrared-emissive graphene quantum dots for multiplex bioimaging. *2d Mater*. 2024;11(2):025009. doi:10.1088/2053-1583/ad1c6e
241. Chen X, Sun Z, Peng X, et al. Graphene Oxide/Black Phosphorus Functionalized Collagen Scaffolds with Enhanced Near-Infrared Controlled In Situ Biomineralization for Promoting Infectious Bone Defect Repair through PI3K/Akt Pathway. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2024;16(38):50369-50388. doi:10.1021/acsami.4c10284

242. Lunardi CN, Gomes AJ, Rocha FS, De Tommaso J, Patience GS. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. *Can J Chem Eng.* 2021;99(3):627-639. doi:10.1002/cjce.23914
243. Pochapski DJ, Carvalho dos Santos C, Leite GW, Pulcinelli SH, Santilli CV. Zeta Potential and Colloidal Stability Predictions for Inorganic Nanoparticle Dispersions: Effects of Experimental Conditions and Electrokinetic Models on the Interpretation of Results. *Langmuir.* 2021;37(45):13379-13389. doi:10.1021/acs.langmuir.1c02056
244. Takács D, Katana B, Szerlauth A, Sebők D, Tomšič M, Szilágyi I. Influence of adsorption of ionic liquid constituents on the stability of layered double hydroxide colloids. *Soft Matter.* 2021;17(40):9116-9124. doi:10.1039/D1SM01074C
245. Sameut Bouhaik I, Leroy P, Ollivier P, Azaroual M, Mercury L. Influence of surface conductivity on the apparent zeta potential of TiO₂ nanoparticles: Application to the modeling of their aggregation kinetics. *J Colloid Interface Sci.* 2013;406:75-85. doi:10.1016/j.jcis.2013.05.034
246. Damasceno JPV, Kubota LT. The Electronic Origin of the Zeta Potential is Supported by the Redox Mechanism on an Aqueous Dispersion of Exfoliated Graphite. *Angew Chem Int Ed.* 2022;61(52). doi:10.1002/anie.202214995
247. Uskoković V, Odsinada R, Djordjevic S, Habelitz S. Dynamic light scattering and zeta potential of colloidal mixtures of amelogenin and hydroxyapatite in calcium and phosphate rich ionic milieus. *Arch Oral Biol.* 2011;56(6):521-532. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.11.011
248. Zhu N, Ji H, Yu P, et al. Surface Modification of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials.* 2018;8(10):810. doi:10.3390/nano8100810
249. Demir Z, Sungur B, Bayram E, Özkan A. Selective cytotoxic effects of nitrogen-doped graphene coated mixed iron oxide nanoparticles on HepG2 as a new potential therapeutic approach. *Discover Nano.* 2024;19(1):33. doi:10.1186/s11671-024-03977-y
250. Dar MS, Sahu NK. Graphene quantum dot-crafted nanocomposites: shaping the future landscape of biomedical advances. *Discover Nano.* 2024;19(1):79. doi:10.1186/s11671-024-04028-2
251. Di Pietro P, Forte G, D'Urso L, Satriano C. The hybrid nanobiointerface between nitrogen-doped graphene oxide and lipid membranes: a theoretical and experimental study. *AIMS Mater Sci.* 2016;4(1):43-60. doi:10.3934/matensci.2017.1.43
252. Xiao X, Zhang Y, Zhou L, Li B, Gu L. Photoluminescence and Fluorescence Quenching of Graphene Oxide: A Review. *Nanomaterials.* 2022;12(14):2444. doi:10.3390/nano12142444

253. Vempati S, Uyar T. Fluorescence from graphene oxide and the influence of ionic, π – π interactions and heterointerfaces: electron or energy transfer dynamics. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16(39):21183-21203.
doi:10.1039/C4CP03317E
254. Lv R, Li Q, Botello-Méndez AR, et al. Nitrogen-doped graphene: beyond single substitution and enhanced molecular sensing. *Sci Rep*. 2012;2(1):586.
doi:10.1038/srep00586