

JULIANA MORENO DE PAIVA

Nanoestruturas de óxido de grafeno magnético: modificação e funcionalização de superfície para terapia fotodinâmica e fototérmica

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

P142n Paiva, Juliana Moreno de
Nanoestruturas de óxido de grafeno magnético:
modificação e funcionalização de superfície para terapia
fotodinâmica e fototérmica / Juliana Moreno de Paiva. –
Araraquara : [s.n.], 2017
76 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

1. Grafeno. 2. Câncer. 3. Fotoquimioterapia.
4. Fototerapia. 5. Diagnóstico por imagem. I. Título.

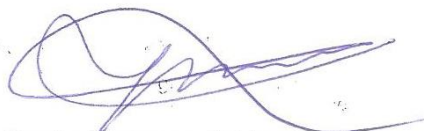
Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de
Araraquara

JULIANA MORENO DE PAIVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 09 de fevereiro de 2017.

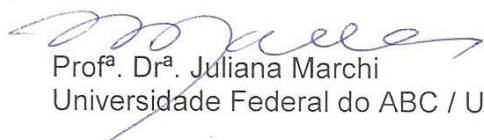
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª Drª Maria Aparecida Zaghethe Bertochi
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Profª. Drª. Juliana Marchi
Universidade Federal do ABC / UFABC / Santo André - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Juliana Moreno de Paiva

Nome em citações bibliográficas: Paiva, J. M.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Rua Prof. Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-060, Araraquara, SP

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Licenciada em Química, concluído 2014 no Instituto de Química de Araraquara/UNESP.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Painel “Homogeneous coprecipitation through urea solid decomposition for magnetic nanoparticles synthesis”, Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Sitiges, março de 2015.

Apresentação Oral “Surface Engineering of Graphene Oxide for Theranostic Cancer Application”, XV Brazilian Materials Research Society meeting, Campinas, setembro 2016.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

XV Brazilian Materials Research Society meeting, Campinas, setembro 2016.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não carrega só uma pesquisa, mas uma colaboração de muitas pessoas que fizeram com que ela acontecesse. Por isso, mais que agradecer, quero demonstrar gratidão e reconhecimento a todos que me ajudaram nesse período. Talvez não existam palavras suficientes e significativas pela ajuda e apoio dado por vocês, mas é tudo o que me resta. Apenas posso me expressar através da limitação de meras palavras.

Mãe e pai, suas palavras e gestos de carinho, reconfortaram meu coração, me apoiaram e me deram força em todos os momentos.

Tiago, obrigada por viver este mundo científico comigo, despertar minha curiosidade científica, me inspirar profissionalmente, me apoiar e ajudar sempre com um sorriso no rosto.

Queridos amigos Xurupitenses e agregados, a amizade de vocês sempre me deu forças para continuar. Obrigada por me ouvirem, ajudarem a procurar soluções e deixarem meus dias mais leves.

Professor Rodrigo, obrigada por me aceitar como orientanda, acreditar em mim, me incentivar, me apoiar sempre que foi preciso e ter permitido que eu tomasse algumas iniciativas, motivando meu estudo e fazendo com que eu aprendesse a tomar decisões científicas.

Colegas de trabalho, o tempo que passei na companhia de vocês contribuiu imensamente para meu crescimento pessoal e profissional graças ao companheirismo e disposição de todos. Gostaria de agradecer em especial ao Professor Miguel, a Anna Carolina e o Rodolfo pelos ensinamentos, por terem me salvado em vários momentos e na colaboração durante minha pesquisa.

A CAPES pela bolsa concedida, o Instituto de Química, cuja formação e apoio me possibilitaram a realização desse trabalho e aos funcionários que direta ou indiretamente ajudaram.

“Queremos ter certezas e não
dúvidas, resultados e não
experiências, mas nem mesmo
percebemos que as certezas só
podem surgir através das dúvidas e
os resultados somente através das
experiências.”

Carl Jung

RESUMO

As terapias fotodinâmica e fototérmica vêm sendo desenvolvidas de forma a oferecer melhores e mais baratas alternativas no tratamento de câncer. Os principais desafios na utilização destas técnicas estão na obtenção de novos materiais fototérmicos e fotosensibilizadores que absorvam no mesmo comprimento de onda. Neste contexto, este trabalho desenvolveu um material com este potencial. Para isso foi escolhido como base o óxido de grafeno devido suas propriedades hidrofílica e atóxica, boa estabilidade térmica, capacidade de absorção de luz e possibilidade de funcionalização. Nanopartículas de óxido de ferro magnéticas, fluoresceína *o*-metacrilato e o Verteporfin foram ligados em sua superfície trazendo novas características como a possibilidade do uso como agente de contraste no diagnóstico por ressonância magnética nuclear e terapia fotodinâmica. Para isso, estratégia de síntese foi feita em quatro etapas: síntese do óxido de grafeno, óxido de grafeno magnético, óxido de grafeno magnético fluorescente e óxido de grafeno magnético fluorescente com fotossensibilizador. Na primeira etapa empregou-se o método de Hummers modificado para obtenção do óxido de grafeno pela oxidação e esfoliação do grafite. Em seguida, nanopartículas de óxido de ferro magnético foram imobilizadas em sua superfície pelo método de coprecipitação simples. A propriedade de fluorescência foi então inserida pela ancoragem da fluoresceína *o*-metacrilato juntamente com o ácido acrílico (AA), persulfato de amônio e bissulfito de sódio. Por fim, o óxido de grafeno foi funcionalizado com o fotossensibilizador Verteporfin por uma reação de transesterificação. A fim de verificar o caráter físico-químico e estrutural dos intermediários e produtos finais de cada etapa foram utilizadas técnicas de caracterização, como microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG-MEV), difratometria de raios X (DRX), espectroscopia RAMAN, espectroscopia na região do ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de fluorescência, potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS). A partir dos resultados obtidos, verificou-se que o material obtido tem potencial teranóstico multifuncional com propriedades advindas do óxido de grafeno magnético modificado para aplicações nas terapias fototérmicas e fotodinâmicas.

Palavras-chave: Óxido de grafeno. Tratamento fototérmico. Tratamento fotodinâmico. Câncer. Teranóstico.

ABSTRACT

Photodynamic and photothermal therapies have been developed in order to offer better and cheaper alternatives in cancer treatment. The main challenges in the use of these techniques are in obtaining new photothermal and photosensitizers materials that absorb at the same wavelength. In this context, this work has developed a material with this potential. For this, graphene oxide was chosen as the base due to its hydrophilic and nontoxic properties, good thermal stability, light absorbing capacity and possibility of functionalization. Magnetic iron oxide nanoparticles, fluorescein *o*-methacrylate and Verteporfin were linked on their surface bringing new features such as the possibility of use as a contrast agent in the diagnosis by nuclear magnetic resonance and photodynamic. For this, the synthesis strategy was done in four steps: synthesis of graphene oxide, magnetic graphene oxide, fluorescent magnetic graphene oxide and fluorescent magnetic graphene oxide with photosensitizer. In the first step, the modified Hummers method was used to obtain graphene oxide by the oxidation and exfoliation of graphite. Next, nanoparticles of magnetic iron oxide were immobilized on their surface by the simple co-precipitation method. The fluorescence property was then inserted by fluorescein *o*-methacrylate anchoring along with acrylic acid (AA), ammonium persulfate and sodium bisulfite. Finally, the graphene oxide was functionalized with the Verteporfin photosensitizer by a transesterification reaction. In order to verify the physical-chemical and structural character of the intermediates and final products of each step, characterization techniques were used, such as high-resolution scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffractometry (XRD), RAMAN spectroscopy, Ultraviolet/visible spectroscopy (UV-Vis), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), fluorescence spectroscopy, zeta potential and dynamic light scattering (DLS). From the obtained results, it was verified that the material obtained has a multifunctional thermostatic potential with properties derived from modified magnetic graphene oxide for photothermal and photodynamic therapies.

Keywords: Graphene oxide. Photothermal treatment. Photodynamic treatment. Cancer. Teranostic.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Câncer	10
1.2	Terapias fototérmica e fotodinâmica	13
1.3	Óxido de grafeno	15
1.4	Nanopartículas de óxido de ferro magnéticas e a ressonância magnética nuclear	16
1.5	Fluoresceína o-metacrilato e o fotodiagnóstico	17
1.6	Verteporfin	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Geral	20
2.2	Específicos	20
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	21
3.1	Síntese do óxido de grafeno (OG)	21
3.2	Síntese do óxido de grafeno magnético (OGM)	22
3.3	Síntese do óxido de grafeno magnético fluorescente (OGMF)	22
3.4	Síntese do óxido de grafeno magnético fluorescente com fotossensibilizador (OGMFV)	23
3.5	Caracterizações	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Caracterizações da síntese do óxido de grafeno (OG)	27
4.1.1	Análise térmica por TG/DTA	28
4.1.2	Microscopia eletrônica de varredura	29
4.1.3	Diâmetro hidrodinâmico	30
4.1.4	Potencial zeta	31
4.1.5	Difratometria de raios X	32

4.1.6	Espectroscopia Raman	34
4.1.7	Espectroscopia na região UV-Vis	37
4.1.8	Espectroscopia na região do infravermelho	38
4.2	Caracterizações da síntese do óxido de grafeno magnético (OGM)	40
4.2.1	Microscopia eletrônica de varredura	41
4.2.2	Diâmetro hidrodinâmico	43
4.2.3	Potencial zeta	43
4.2.4	Difratometria de raios X	44
4.2.5	Espectroscopia Raman	45
4.2.6	Espectroscopia na região do infravermelho	48
4.3	Caracterizações da síntese do óxido de grafeno magnético fluorescente (OGMF)	50
4.3.1	Microscopia eletrônica de varredura	53
4.3.2	Diâmetro hidrodinâmico	54
4.3.3	Potencial zeta	55
4.3.4	Espectroscopia Raman	55
4.3.5	Espectroscopia na região UV-Vis e fluorescência	58
4.3.6	Espectroscopia na região do infravermelho	59
4.4	Caracterizações da síntese do óxido de grafeno magnético fluorescente com fotossensibilizador (OGMFV)	62
4.4.1	Diâmetro hidrodinâmico	64
4.4.2	Potencial zeta	64
4.4.3	Espectroscopia na região UV-Vis	65
4.4.4	Espectroscopia na região do infravermelho	66
5	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

As características da sociedade mundial foram se modificando com os avanços da ciência, tecnologia juntamente com os processos de urbanização e industrialização. Essas modificações trouxeram um novo estilo de vida, expondo as pessoas de forma mais intensa aos fatores de risco próprios do mundo contemporâneo, alterando consideravelmente o perfil de morbimortalidade. Houve uma queda da frequência das patologias infectocontagiosas e assim o foco principal se tornou outro, o das doenças não transmissíveis (DNT).¹

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2012, de 56 milhões de mortes no mundo, 38 milhões (68% do total) foram devido a essas doenças. O câncer aparece como segundo maior fator de mortalidade (8,2 milhões), perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (17,5 milhões de mortes). Neste mesmo ano a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (AIPC) estimou 12,4 milhões de casos incidentes da doença. A OMS estima que em 2030 o número total de mortes aumente em 4 milhões.²

No Brasil segundo a OMS, em 2014, aproximadamente 224 mil (17% das mortes por DNT) foram por câncer. Baseado nas informações do Sistema de Morbidade por Câncer e o Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) estima-se 576 mil novos casos novos para os próximos anos. Estes valores reforçam a magnitude do câncer como problema de saúde pública no país, cujo controle e prevenção devem ser priorizados.¹

Atualmente as estratégias propostas para o tratamento de câncer incluem os métodos de quimioterapia, radioterapia e cirurgia, podendo ser utilizados separados ou combinados de acordo com a neoplasia.³

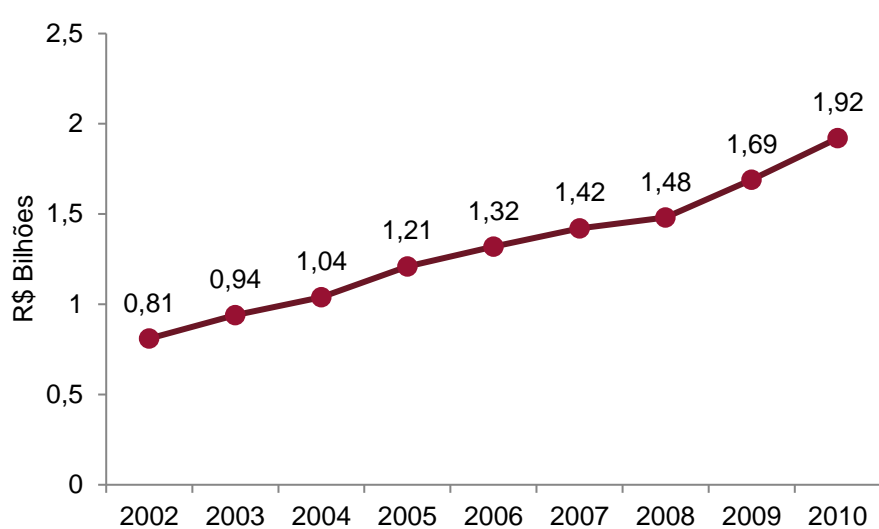
A quimioterapia é um tratamento sistêmico do câncer que utiliza medicamentos, que podem ser quimioterápicos, hormonioterápicos, bioterápicos, imunoterápicos ou alvoterápicos, os quais podem ser administrados continuamente ou a intervalos regulares.^{1,3}

Já a radioterapia é um tratamento local, no qual é empregado um feixe de radiações ionizantes eletromagnéticas ou corpusculares. Essas radiações, ao interagirem com o tecido, tem a capacidade de arrancar elétrons e um átomo, ionizando-o. Esta ionização pode provocar quebras químicas modificando a estrutura molecular, causando, por exemplo, a hidrólise da água, ou ainda promovendo a ruptura de cadeias de DNA e, assim, causando a apoptose celular.^{1,3}

Estes tratamentos, mesmo que efetivos, não possuem uma alta capacidade de distinguir entre células doentes ou não, afetando ou destruindo células saudáveis e assim induzindo efeitos colaterais locais ou sistêmicos. Além disso, podem proporcionar a possibilidade de algumas células tumorais se tornarem resistentes com o tempo. Esta somatória de fatores pode levar o paciente à interrupção do tratamento. Por sua vez, os procedimentos cirúrgicos são invasivos e tem sua eficácia questionada uma vez que a retirada de células tumorais pode não ser total.⁴

Além destes obstáculos, outro aspecto que deve ser observado são os custos oncológicos, pois estes tratamentos comumente empregados possuem alto custo e, a nível nacional, comprometem a receita de saúde pública. No Brasil, houve um aumento nas despesas públicas do Sistema Único de Saúde (SUS) em 1,1 bilhões entre 2002 a 2010, chegando a aproximadamente 2 bilhões em 2010, como pode ser observado na Figura 1. Sendo que nestes dados, consultas, exames de diagnóstico, procedimentos cirúrgicos fora dos centros habilitados em oncologia, não estão inclusos.⁵

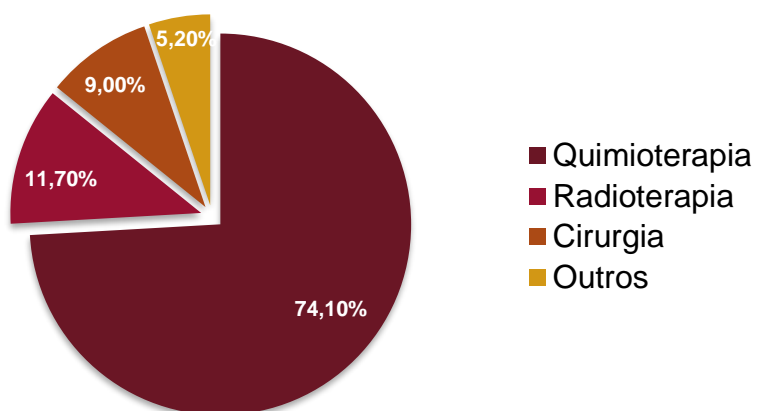
Figura 1 - Despesas federais com tratamentos ambulatoriais e hospitalares de oncologia do SUS no Brasil



Fonte: Tribunal de Contas da União.⁵

Na Figura 2 podemos ver a participação dos tratamentos na despesa total no ano de 2010, com a quimioterapia em maior prevalência de despesas, correspondendo a quase três quartos dos gastos totais.⁵

Figura 2 - Participação com cada tipo de tratamento oncológico nas despesas totais com tratamento – Brasil - 2010



Fonte: Tribunal de Contas da União.⁵

Com todos esses desafios, pesquisadores vêm estudando novas formas de tratamentos e diagnósticos precoce mais eficientes, acessíveis, não invasivos, com menores efeitos colaterais e baixo custo.

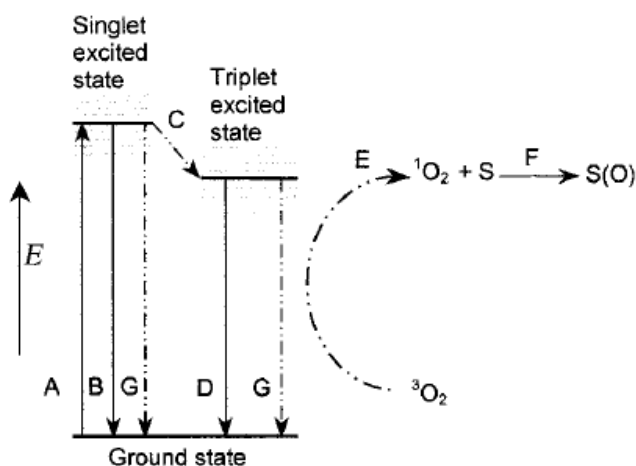
1.2 Terapias fototérmica e fotodinâmica

A fotomedicina surgiu como um novo ramo na medicina, a qual emprega luz para o tratamento de diversas doenças. Dentre estes tratamentos, as terapias fototérmica (TFT) e fotodinâmica (TFD) são tipos emergentes que vêm tendo destaque no tratamento de câncer. Essa notoriedade é dada por sua seletividade na área de interesse, com natureza minimamente ou não invasiva, não havendo resistência do organismo e conseqüentemente diminuindo os efeitos secundários graves.⁶

A TFT utiliza materiais biocompatíveis, chamados de agentes fototérmicos, que são capazes de absorver radiação eletromagnética, e transforma-la em energia térmica, provocando um aquecimento local, de 41 a 47 °C. Este aquecimento causa um dano irreversível às células pela desnaturação das proteínas, causando o rompimento da membrana celular.^{7,8}

Já a TFD utiliza uma combinação de irradiação com luz, oxigênio e fármacos fotoativos, também chamados de fotosensibilizadores, para provocar a apoptose celular no tecido tumoral. Para isso inicialmente incide-se luz com comprimento de onda de acordo com a absorção do fotossensibilizador excitando-o. Essa excitação gera espécies reativas de oxigênio, como o singleto e o tripleto de oxigênio, que podem oxidar organelas celulares e subcelulares, incluindo membrana plasmática, mitocôndrias, lisossomos e membrana nuclear, levando a danos irreversíveis nas células tumorais. Na Figura 3 pode se observar um esquema de como ocorre a TFD.⁷⁻⁹

Figura 3 - Diagrama de excitação e relaxamento em um fotossensibilizador: (A) excitação; (B) fluorescência; (C) passagem entre os sistemas; (D) fosforescência; (E) transferência não radiativa de energia para singlete de oxigênio; (F) oxidação do substrato por singlete de oxigênio; (G) conversão interna.



Fonte: Gao *et al.*⁸

Atualmente, os principais desafios na utilização destas técnicas estão na obtenção de novos materiais fototérmicos e fotossensibilizadores que absorvam no mesmo comprimento de onda. Assim há a possibilidade de utilizar simultaneamente o TFT e o TFD potencializando a eficácia do tratamento e diminuindo o custo e o tempo do tratamento por ambos necessitarem de apenas uma fonte de luz.

Assim sendo, este trabalho propõe o desenvolvimento de um material que tenha potencial para superar estas dificuldades. Além disso propriedades para que ele também possa atuar como diagnóstico de neoplasias por ressonância magnética nuclear (RMN) e fotodiagnóstico serão inseridas.

Para a síntese deste material utilizou-se óxido de grafeno, para atuar como agente fototérmico, verteporfin como fotossensibilizador, fluoresceína *o*-metacrilato como marcador fluorescente do material no organismo e nanopartículas de óxido de ferro magnético para potencializar o contraste de tecidos no diagnóstico por RMN. Cada uma destas substâncias será abordada nos tópicos seguintes, enfatizando suas predileções.

1.3 Óxido de grafeno

A síntese do óxido de grafeno tem como matéria prima o grafite em flocos e pode ser dividida em três etapas cruciais: oxidação do grafite, clivagem por ultrassom e remoção das impurezas.¹⁰ Este grafite é utilizado por possuir maior tamanho do cristalito, maior distância entre as camadas além de ter uma direção preferida das folhas, facilitando sua oxidação.¹¹

Seu primeiro relato foi feito em 1859 com Brodie, utilizando HNO_3 fumegante como intercalante nas folhas de grafite e KClO_3 como oxidante. Contudo, a síntese é demorada perdurando por 4 dias e necessitando 4 ciclos de oxidação, lavagem, secagem. Os gases N_2O_4 e NO_2 , prejudiciais à saúde e ClO_2 , o qual é altamente explosivo também são produzidos.¹²

Staudenmaier¹³ em 1898, com uma mistura de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$ (2:1), conseguiu a oxidação em apenas uma etapa, porém as outras dificuldades não foram sanadas.

Ao final da década de 50, Hummers e Offeman¹⁴ desenvolveram o método até hoje empregado. Utilizaram H_2SO_4 e NaNO_3 para intercalar as folhas no grafite e KMnO_4 para oxidar. Com isso eles diminuíram o tempo de síntese para apenas algumas horas apresentando-se mais segura com a remoção KClO_3 , não formando ClO_2 . Contudo, ainda há a liberação de gases tóxicos N_2O_4 e NO_2 e, ao final, difícil remoção dos íons Na^+ e NO_3^- .

Atualmente novas alternativas de rota de síntese vêm sendo desenvolvidas de acordo com sua aplicação. Em biomedicina o óxido de grafeno vem sendo estudado nas áreas de crescimento e diferenciação celular, biossensores, *drug delivery*, engenharia de tecidos, tratamentos de doenças. Dessa forma buscam-se novas formas de torná-la mais rápida e mais segura, com produção em massa de óxido de grafeno e com propriedades de acordo com sua aplicação.^{10,15}

Estes esforços provem de suas características físico-químicas atraentes que o tornam uma potencial substância para o desenvolvimento de biomateriais, pois suas características hidrofílicas e atóxicas o tornam interessantes para atuação biológica. Além disso, sua boa estabilidade térmica e capacidade de absorção de luz fazem dele um potencial agente fototérmico. E, por fim, a presença de grupos funcionais

em sua superfície, tais como epóxi, hidroxil e carboxil, auxiliam sua funcionalização, trazendo novas características ao material.¹⁵

1.4 Nanopartículas de óxido de ferro magnéticas e a ressonância magnética nuclear

O diagnóstico por RMN é feito pela exposição do tecido a um campo magnético externo. Transversalmente ao tecido emite-se uma onda pulsada com rádio frequência, provocando perturbação nos prótons, principalmente de moléculas de água. Quando os prótons retornam ao estado inicial, obtém-se a imagem pela conversão da radiação emitida por eles. Essa retomada é chamada de relaxação, podendo ser longitudinal ou transversal. Cada tecido possui uma velocidade de relaxação e densidade de prótons diferente diferenciando os tecidos e mapeando-os.^{16,17}

Para melhorar a resolução das imagens através do contraste obtido pela variação dos tempos de relaxação, alguns agentes de contraste são aplicados.

Dentre estes agentes, utilizou-se nanopartículas de óxido de ferro magnéticas neste trabalho, pois quando um campo magnético externo é aplicado neste material ele responde com grande momento magnético, e assim as interações dipolares entre as nanopartículas e os prótons do solvente resultam no aumento da relaxação transversal e longitudinal, gerando um contraste ainda maior nas imagens. Além disso, seu tamanho na ordem nanométrica (10^{-9}) é interessante, pois elas podem acessar macromoléculas biológicas, tais como as células (10 – 100 μm), vírus (20 – 450 nm), proteínas (5 – 50 nm) e DNA (2 nm de largura e 10-100 nm de comprimento). Possuem possibilidade de modificação de sua superfície, a qual novas propriedades podem ser inseridas. [16,17] [16,18,19,20]

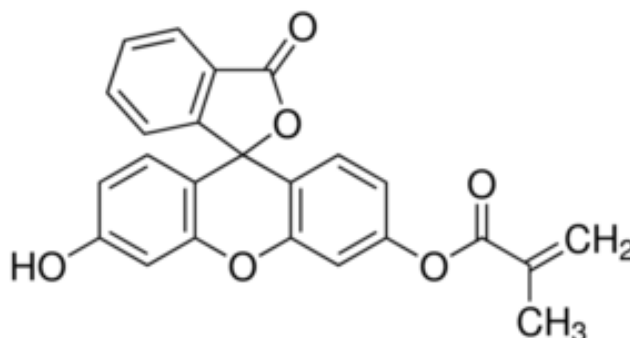
Atualmente tem-se algumas nanopartículas sendo comercializadas, dentre as principais destaca-se: Feridx®, constituído por nanopartículas de primeira geração, produzido pela Bayer HealthCare Pharmaceuticals Inc., e o Resovist®, constituído por nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas, revestidas com carboxidextrana, produzido pela Bayer Schering Pharma AG.

1.5 Fluoresceína *o*-metacrilato e o fotodiagnóstico

O fotodiagnóstico baseia-se na forma em que tecidos normais e cancerígenos absorvem luz, permitindo então a visualização de fluorescência diferencial nestes tecidos. Tecidos cancerígenos possuem uma hiperatividade celular aumentando assim a produção de protoporfirina IX, que é uma substância presente em um dos passos para produção de hemoglobina. Esse composto absorve fótons em 410 nm e emite em 635 nm fazendo com que o tecido apresente coloração vermelha, dando contraste com o tecido que fica azul. Assim o diagnóstico pode ser feito antes mesmo da presença de lesões visíveis a olho nu.⁷

Com base nisso, estipulou-se que o material a ser desenvolvido tivesse características fluorescentes, de cor diferente do tumor (vermelho) e do tecido (azul), identificando o local em que ele se encontra no corpo, ou seja, se já foi ou não acumulado pelo tecido tumoral. Para isso a fluoresceína *o*-metacrilato, um fluoróforo orgânico constituído por vários anéis aromáticos, o qual pode ser observado na Figura 4, que emite 514 nm (verde), foi escolhido como marcador. Além de sua emissão, ainda possui características como: elevado coeficiente de absorção e capacidade de formar ligações covalentes ou não covalentes com outros materiais, proporcionando melhor fotoestabilidade, hidrofiliabilidade, atóxicidade e biocompatibilidade.²¹⁻²³

Figura 4 - Molécula de Fluoresceína *o*-metacrilato



Fonte: Autor

1.6 Verteporfin

O tratamento de câncer por TFD necessita, além de luz e oxigênio, fotossensibilizadores. Contudo nem todos os tipos podem ser utilizados, pois, para este tipo de aplicação, vários critérios devem ser cumpridos. Eles devem ter baixa toxicidade, acumular seletivamente no tecido tumoral e minimizar a sensibilidade da pele. Ter rápida remoção pelo organismo, ou seja, estabilidade in vivo limitada. Deve ter absorção em comprimentos de onda mais longos na região do infravermelho/visível, absorvendo um grande número de fótons aumentando a penetração da luz no tecido. Além disso, sua banda de absorção não deve sobrepor às bandas de absorção de outros cromóforos presentes nos tecidos.²⁴

Os fotossensibilizadores são classificados em três gerações. Os de primeira geração, derivados de Hematoporfirina e seus correlatos. Os de segunda, compostos estruturalmente distintos com absorção de longo comprimento de onda. E os de terceira, fotossensibilizadores de segunda geração ligados a carregadores para melhor seletividade.²⁴

Os de segunda, em relação ao de primeira, são melhores por sua facilidade de reprodução, além de ter maior seletividade para o tecido tumoral e ser rapidamente excretadas do corpo. Sua absorção é em uma faixa de comprimento de onda maior (de 675 a \pm 800 nm) e com isso permite maior penetração de luz.²⁴

Dentre estes fotossensibilizadores de segunda geração, o verteporfin é um potente agente fotossensibilizador. As indústrias QLT Phototherapeutics de Vancouver (Canadá) e a Ciba Vision Corporation de Duluth (EUA) em colaboração o produziram sob o nome comercial Visudyne. Atualmente ele é empregado no tratamento de degeneração macular relacionada com a idade e está em ensaios clínicos de Fase III para o câncer de pele do tipo não melanoma cutâneo e de Fases I/II contra o tipo não melanoma.²⁴⁻²⁶

Comparado ao fármaco de primeira geração, o Photofrin, o verteporfin possui uma absorbância mais intensa em um comprimento de onda maior (690nm), com penetração 50% maior de luz no tecido. Além disso, é rapidamente absorvido pelo tumor, com taxa tecido/tumor entre 30 a 150 minutos após a injeção intravenosa, e

sua fotossensibilidade na pele dura apenas alguns dias, pois é eliminada do corpo entre 1 a 2 dias.²⁴⁻²⁷

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral sintetizar óxido de grafeno magnético fluorescente multifuncional, tendo propriedades óticas e magnéticas conjugadas em uma única estrutura, e caracterizá-lo por meio de diversas técnicas em seu caráter físico-químico e estrutural.

2.2 Específicos

- Sintetizar o óxido de grafeno a partir do grafite pelo processo de Hummers modificado;
- Imobilizar nanopartículas de óxido de ferro magnético em sua superfície pelo método de coprecipitação simples modificado;
- Ancorar o composto fluoresceína *o*-metacrilato;
- Funcionalizar com o fotossensibilizador Verteporfin;
- Caracterizar os intermediários e produtos finais de cada etapa por: microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG-MEV), difratometria de raios-x (DRX), espectroscopia RAMAN, espectroscopia na região do ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de fluorescência, potencial zeta e espalhamento dinâmico de luz (DLS).

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A síntese do óxido de grafeno magnético fluorescente com fotossensibilizador (OGMFV) foi feita em quatro etapas. Inicialmente o grafite foi oxidado de acordo com o método de Hummers¹⁴ e Gollavelli e colaboradores²⁸ com modificações produzindo óxido de grafeno. Posteriormente, através do método modificado de coprecipitação simples, nanopartículas de óxido de ferro magnético foram incorporadas a sua superfície.²⁹ A fluoresceína o-metacrilato foi então ancorada no óxido de grafeno utilizando o ácido acrílico, persulfato de amônio e bissulfito de sódio.³⁰ Por fim foi feita uma transesterificação funcionalizando-o com verteporfin.³¹⁻³³ A cada etapa as amostras obtidas foram submetidas às técnicas de caracterização.

3.1 Síntese do óxido de grafeno (OG)

O óxido de grafeno foi sintetizado com base na teoria do método de Hummers modificado, removendo o NaNO_3 , pela oxidação do grafite em flocos.^{14,28}

Em um balão de três bocas de 250 mL adicionou-se cerca de 1,0 g de grafite em flocos (100 mesh) Aldrich, 23,0 mL de H_2SO_4 P.A. Aldrich ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e por 24 horas foi mantido sob agitação.

Posteriormente, o balão foi levado a um banho de gelo até atingir temperatura abaixo de 20°C e então 3,0 g KMnO_4 ($\geq 99,0\%$) Aldrich foram adicionados de forma que se mantivesse a temperatura. Em seguida a mistura de reação foi agitada por 8 horas e após esse período aqueceu-se a 40°C por 30 minutos, em banho de óleo.

Ao final desse processo, uma alíquota de 50,0 mL de H_2O deionizada foi adicionada e a temperatura elevada a 75°C por 1 hora sob agitação constante. Por fim, ao atingir temperatura ambiente, 150 mL H_2O destilada e 5,0 mL de H_2O_2 30 % (v/v) foram adicionados.

A remoção das impurezas foi feita por filtração. O sobrenadante foi retirado e passado em uma membrana de fluoreto de polivinilideno, poro $0,22 \mu\text{m}$. Ao final, a membrana foi coletada e seca, a amostra retirada e transferida a um béquer com 50,0 mL de H_2O . A esfoliação foi então feita utilizando uma ponteira ultrassônica por

30 minutos, utilizando amplitude de 30% em modo pulsado (2 segundos ligado e 2 desligado).

3.2 Síntese do óxido de grafeno magnético (OGM)

A superfície do OG obtido anteriormente foi decorada com nanopartículas de óxido de ferro magnético através do método modificado de coprecipitação simples.^{20,29,34}

Para esta metodologia foram preparadas duas soluções. Em um béquer, 30mg de OG e 9,0 mL de NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados, originando a solução (A). A solução (B) foi preparada com 10,0 mL com concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ferro (1:2 de FeCl_2 Aldrich: FeCl_3 Aldrich) em um tubo falcon, onde foi avolumada para 20,0 mL. Posteriormente, a solução foi transferida para um béquer sob agitação constante.

A solução (A) foi gotejada lentamente sobre a (B) formando o óxido de ferro na superfície do OG. A fim de remover as impurezas, o OGM precipitado magneticamente foi lavado, redisperso em água e, por fim, caracterizado.

3.3 Síntese do óxido de grafeno magnético fluorescente (OGMF)

Uma das grandes vantagens do óxido de grafeno é sua capacidade em ser funcionalizado por polímeros.^{30,35} Assim a introdução da propriedade de fluorescência foi feita com a fluoresceína *o*-metacrilato (FMA), juntamente com o ácido acrílico (AA), persulfato de amônio e bissulfito de sódio.³⁰

Em um tubo falcon contendo o OGM foi adicionado 1,5 mL de ácido acrílico ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e levado a um agitador mecânico, no qual foi submetido a uma rotação de 2 rpm durante 24h. Posteriormente 3 mg de FMA, 2,0 mg de persulfato de amônio e 1,0 mg de bissulfito de sódio foram adicionados a solução sob agitação.

Após, a solução foi sujeita a etapa de centrifugação visando à remoção dos reagentes em excesso. Este procedimento foi repetido cinco vezes empregando as condições de 8000 rpm por 30 min.

3.4 Síntese do óxido de grafeno magnético fluorescente com fotossensibilizador (OGMFV)

Para funcionalizar o OGMF com o fotossensibilizador Verteporfin foi feita uma reação de transesterificação entre os grupos hidroxil do óxido de grafeno e o grupo éster.

Para isso, 2,0 mg de verteporfin Aldrich foram solubilizados em 2,0 mL de DMSO. Já o OGMF foi suspenso em DMSO com pH ajustado para 10, a fim de desprotonar as hidroxilas presentes e facilitar a transesterificação. Ao final, adicionou-se o verteporfin ao OGMF e este foi levado a um agitador mecânico, no qual foi submetido a uma rotação de 2 rpm durante 24h.

Para remoção do excesso do fotossensibilizador, a amostra OGMFV foi lavada com auxílio de uma centrífuga. Este procedimento foi repetido cinco vezes, utilizando água deionizada e empregando as condições de 10000 rpm por 30 min.

3.5 Caracterizações

A cada etapa de síntese as amostras OG, OGM, OGMF e OGMFV foram submetidas às técnicas de caracterização descritas abaixo.

A caracterização morfológica das amostras foi feita por Microscopia de Varredura Eletrônica de Alta resolução (FEG-MEV; JEOL modelo 7500F). Para isso, as amostras foram diluídas em propanol e 10 μ L das suspensões foram gotejadas em um substrato de óxido de silício (SiO_2/Si), e então secas a temperatura ambiente.

A difratometria de raios X foi empregada para avaliar as propriedades estruturais dos materiais sintetizados. As amostras foram secas, maceradas e então colocadas em um suporte de vidro. Os difratogramas foram obtidos de $2\theta = 5^\circ$ a 80° , utilizando difratômetro de raios X marca SIEMENS modelo D5005, Radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\alpha = 1,5418\text{\AA}$), com detector de Cintilação e Monocromador de Grafite foi empregado. Além do padrão difratométrico característico de cada substância, obteve-se a distância interplanar através da equação de Bragg, conforme apresentada a seguir.³⁶

$$2d \sin\theta = \lambda$$

Equação 1

Sendo d a distância interplanar no cristal, θ o ângulo entre o vetor de onda incidente e os planos cristalinos da amostra e λ o comprimento de onda da radiação incidente.

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

Os espectros de UV-Vis foram adquiridos em um Espectrofotômetro de feixe duplo UV/VIS/NIR, Perkin Elmer Lambda 1050, operando na faixa espectral de 200 a 800 nm em modo de absorbância. Para isso as amostras foram diluídas em água até obterem absorção máxima próximo a 1.

Os espectros no infravermelho foram obtidos utilizando um espectrômetro na região do infravermelho (400 a 4000 cm^{-1}) com transformada de Fourier, empregando reflexão total atenuada (FTIR-ATR) marca PerkinElmer Frontier FT-IR. Foram feitas pastilhas das amostras previamente secas e maceradas, na proporção 1:99 (amostra:KBr), para a obtenção dos espectros.

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

As medidas de Fluorescência foram feitas com excitação a 475 nm, que é a faixa do comprimento de onda de absorção da fluoresceína o-metacrilato. Para esta análise as amostras foram utilizadas em forma de suspensão. Os espectros foram obtidos de 400 a 800 cm^{-1} utilizando um Fluorímetro RF-5301PC da Shimadzu Scientific Instruments, Inc. e um Fluorímetro Horiba Jobin Yvon (Spex Fluorolog-3), medidos à temperatura ambiente. Como fonte de excitação das amostras utilizou-se lâmpada de Xenônio 400 W.








A partir do potencial zeta (ζ) pode-se caracterizar a estabilidade coloidal, medindo a magnitude e o sinal de carga da superfície, associada à dupla camada elétrica em torno da partícula, decorrentes da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície ou da adsorção de espécies iônicas do meio de dispersão. Partículas com potenciais maiores que 30 mV ou menores que - 30 mV possuem maior repulsão eletrostática interparticular e por isso suas dispersões são consideradas estáveis. Neste trabalho foi utilizado o equipamento Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS, para determinar o potencial Zeta das amostras. Para isso elas foram dispersas utilizando uma ponteira ultrassônica em modo pulsado (2 segundos ligado e 2 segundos desligado) por 5 minutos. A titulação foi feita com as amostras diluídas, no intervalo de pH de 2 a 10, e a cada 0,5 unidade de pH o potencial Zeta foi medido.

O espalhamento de luz dinâmico é uma técnica baseada no movimento Browniano das partículas, no qual é possível medir o tamanho destas pela relação entre a velocidade de movimentação da partícula e a intensidade e a mudança de frequência da luz espalhada (efeito Doppler). O diâmetro hidrodinâmico das amostras diluídas foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, marca Malvern, com detector posicionado no ângulo de 173° em relação a luz incidente sobre a amostra, a uma temperatura de 25° C. Contudo o instrumento considera as partículas como esféricas. Desta forma, os valores obtidos são médias aproximadas utilizadas para analisar a distribuição do tamanho das amostras.^{10,37}

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras OG, OGM, OGMF e OGMFV obtidas no processo de síntese foram caracterizadas de modo a verificar sua composição, morfologia e estrutura. Para comparações, padrões de Grafite Aldrich (G), Óxido de Grafeno Aldrich (OGP) e Fluoresceína o-metacrilato (FMA) também foram caracterizados. Para melhor entendimento, cada um deles foi representado por uma cor conforme a Tabela 1 abaixo, a qual será apresentada junto aos resultados obtidos (figuras, espectros) em cada etapa.

Tabela 1- Relação das amostras por cor.

COR	AMOSTRA	ABREVIATURA
	Grafite	G
	Fluoresceína o-metacrilato	FMA
	Óxido de grafeno padrão	OGP
	Óxido de grafeno	OG
	Óxido de grafeno magnético	OGM
	Óxido de grafeno magnético fluorescente	OGMF
	Óxido de grafeno magnético fluorescente com verteporfin	OGMFV

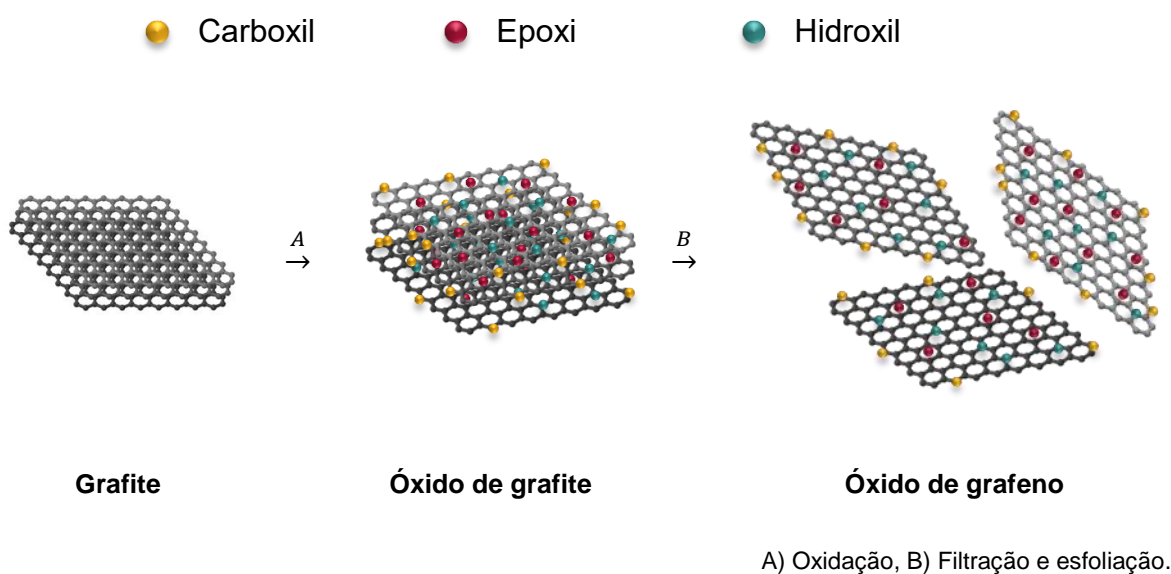
Fonte: Autor

Os resultados obtidos e análises estão descritos nos tópicos subsequentes.

4.1 Caracterizações da síntese do óxido de grafeno (OG)

Uma representação esquemática do método de Hummers modificado é ilustrada na Figura 5.

Figura 5 - Representação do esquema da rota de preparo, pelo método Hummers modificado, do OG.



Fonte: Autor

De acordo com a Figura 5, observa-se que o processo de oxidação do grafite promove a adição dos grupos carboxil, hidroxil e epóxi em suas folhas, aumentando o espaçamento interlamelar. Posteriormente há a esfoliação por ultrassom, produzindo o óxido de grafeno e, após, as impurezas, como o grafite não oxidado, são removidas por filtração. Ao final obtém-se uma dispersão coloidal altamente estável, de coloração amarelada característica, a qual pode ser observada na Figura 6.^{28,38}

Figura 6 – Fotografia da dispersão coloidal de OG em H₂O/NH₄OH (pH=9)



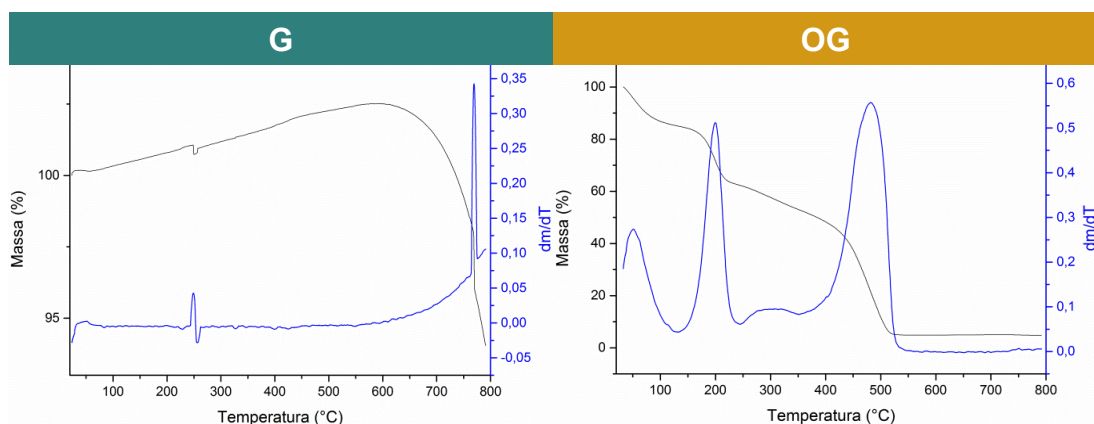
Fonte: Autor

É importante ressaltar que a modificação do método pela remoção do NaNO₃, não gerou os gases tóxicos NO₂ e N₂O₄ nem os íons Na⁺ e NO₃⁻, de difícil remoção, no meio, tornando a síntese mais segura, limpa e, de menor custo.³⁹

4.1.1 Análise térmica por TG/DTA

A fim de verificar a modificação do material, de grafite a óxido de grafeno, foi feito um o estudo do comportamento térmico das amostras G e OG por análise de TG/DTA. Deste modo, para obtê-las variou-se a temperatura em uma taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹. (Figura 7).⁴⁰

Figura 7 - Curvas TG (preta) e DTA (azul) obtidas para as amostras de G e OG.



Fonte: Autor

Observando a amostra G, através da sua TG (linha preta), é possível notar um ganho de massa gradativo de 100 a 600 °C, devido à oxidação dos grupos nas bordas das folhas do grafite. A partir de 600 C° observa-se uma gradativa perda de massa, evidenciada pela presença de um evento na DTA (linha azul), referente à combustão do esqueleto carbônico.

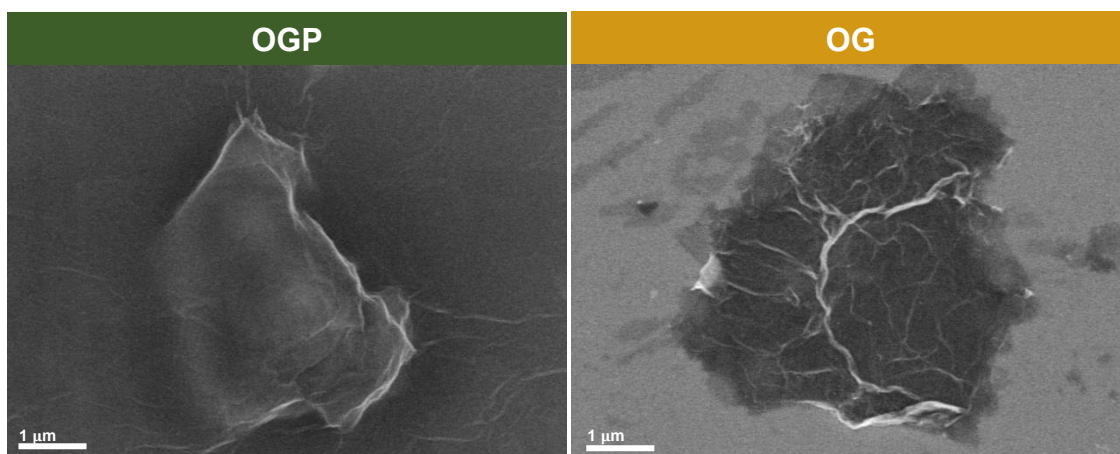
A curva TG do OG apresenta inicialmente uma perda de massa até 120°C proveniente da liberação da água adsorvida em sua superfície hidrofílica. Em 200 e 300°C a perda de massa é atribuída à decomposição dos grupos funcionais oxigenados. Por fim, em 480°C há a combustão do carbono. Estas perdas de massa são confirmadas através dos quatro eventos presentes na DTA.^{39,41,42}

Correlacionando as curvas termogravimétricas observa-se que o OG possui maior teor de grupos oxigenados e menor estabilidade térmica (próxima a 130 °C).

4.1.2 Microscopia eletrônica de varredura

O estudo morfológico da amostra foi feito por FEG-MEV. O OG, quando depositado em um substrato de óxido de silício (SiO₂/Si), gera um contraste com o substrato, possibilitando sua visualização. Assim a Figura 8 ilustra as micrografias do OGP e OG.

Figura 8 – Micrografias eletrônicas de varredura do padrão OGP e da amostra OG.

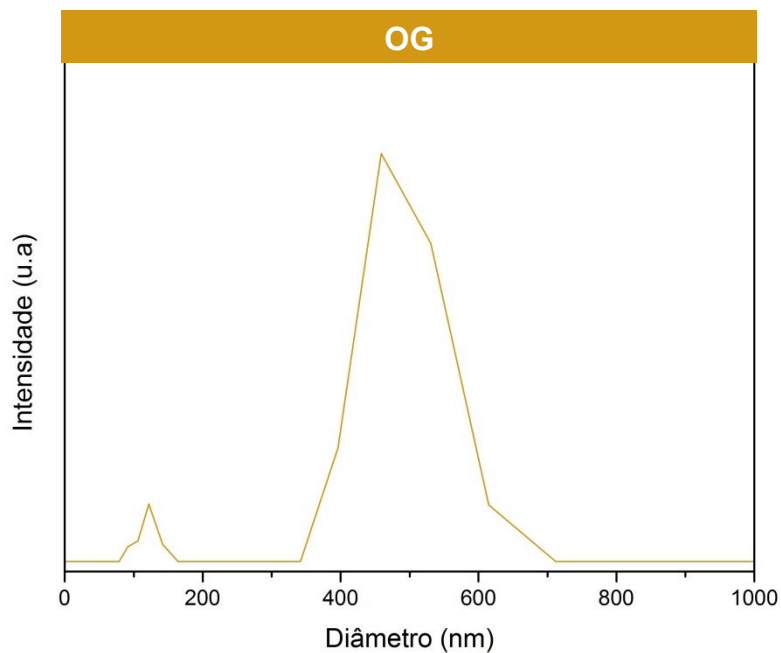


Fonte: Autor

Em ambas as figuras notam-se o aspecto de folhas, com rugas e dobras na superfície, conforme a literatura. Esta aparência ocorre devido às interações entre grupos funcionais oxigenados epóxi, hidroxil e carbonil, presentes entre as folhas.^{43,44}

4.1.3 Diâmetro hidrodinâmico

Os valores da distribuição de tamanho do óxido de grafeno sintetizado obtidos a partir da análise de espalhamento de luz dinâmico para o OG podem ser observados na Figura 9 abaixo.

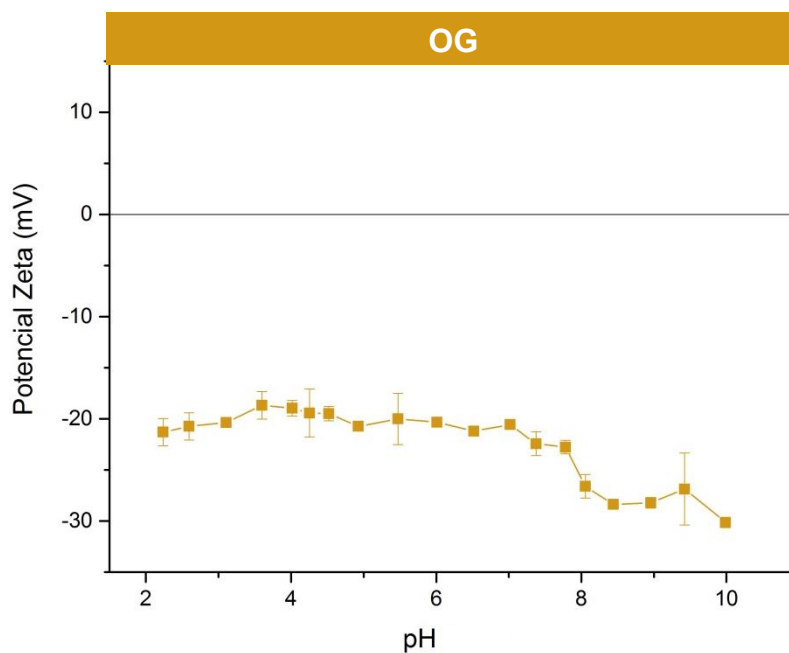
Figura 9 - Distribuição do tamanho médio do OG

Fonte: Autor

Os tamanhos médios das folhas apresentados foram de 122 e 459 nm. Contudo estes valores não correspondam ao observado por MEV. Há a presença de pequenas folhas, contudo a maior parte está na escala de μm . Isso se dá pois, as folhas devem estar com tamanhos maiores do que o limite do equipamento que é de 6000 nm.

4.1.4 Potencial zeta

O potencial zeta da dispersão aquosa de OG a diferentes valores de pH é observado na Figura 10.

Figura 10 - Curva de potencial Zeta versus pH para amostra OG

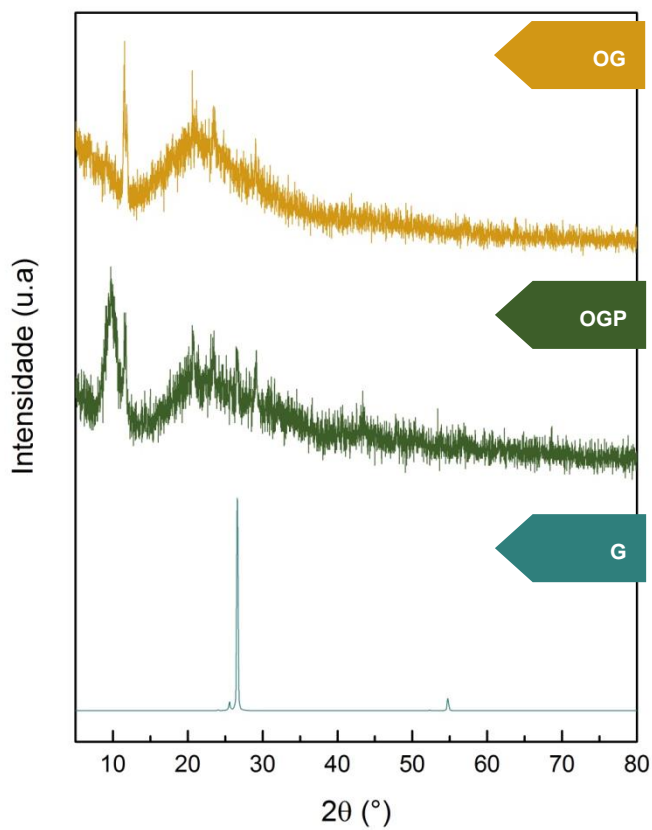
Fonte: Autor

Os valores negativos em toda a faixa de pH estudada na amostra OG indicam uma carga negativa sobre a superfície, a qual pode ser atribuída aos grupos carboxil, hidroxil e epóxi presentes. Em pH acima de 8,5 a dispersão de OG é considerada estável, com valor de $-30,13$ mV. Esta estabilidade a valores mais básicos é consequência da desprotonação dos grupos funcionais presentes nas folhas de grafeno.⁴⁵

4.1.5 Difratometria de raios X

Os difratogramas de raios X obtidos para o OG e os padrões G e OGP estão ilustrados na Figura 11.

Figura 11 - Difratomogramas de raios X de OG, OGP e G.



Fonte: Autor

Observando a Figura 11, nota-se que G é um material de estrutura cristalina, com carbonos altamente orientados, pois apresentou picos finos e pouco ruído. Os picos indexados (002) em $26,62^\circ$ e (004) em $54,74^\circ$ característicos do grafite foram observados.³⁸ A partir da lei de Bragg a distância interplanar D_{002} foi de 0,33 nm.

O padrão de difração de raios-x para o óxido de grafeno puro tem um pico intenso (001), que pode variar de 7 a 12° dependendo da quantidade de água residual intercaladas entre os planos basais. No OGP o pico (001) foi observado em 10° e em $11,7^\circ$, já no OG, um pico intenso e estreito, em $11,56^\circ$ foi apresentado. As distâncias interplanares D_{001} do OGP e OG foram de 0,88 e 0,77 respectivamente. Além do pico característico do óxido, em ambas as amostras outro pico largo próximo a 21° foi notado. Este é atribuído ao óxido de grafeno reduzido (002) também presente.^{38,46}

A ausência do pico $26,62^\circ$ nestas amostras indicam um processo de oxidação completo do material.³⁸ O aumento da distância interplanar dos OG ocorre devido à

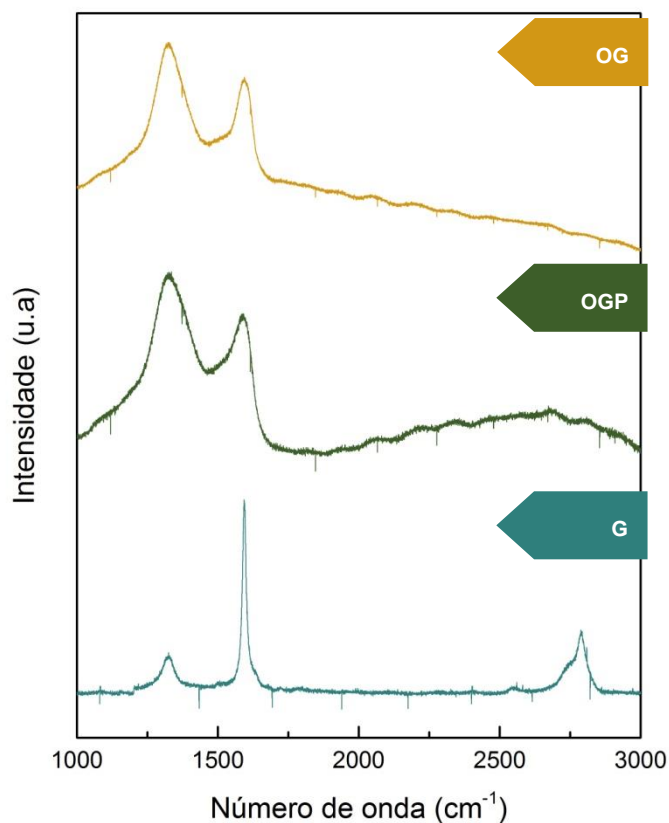
existência de grupos funcionais de oxigênio e alguns outros defeitos estruturais. Desta forma o óxido de grafeno sintetizado, quando comparado ao padrão, apresentou maior cristalinidade e menor distância interplanar.

4.1.6 Espectroscopia Raman

Empregando a espectroscopia Raman é possível obter informações sobre as características estruturais e eletrônicas dos materiais carbônicos, através das bandas D (1200 a 1400 cm^{-1}) e G (1500 a 1600 cm^{-1}). A banda D indica a desordem da estrutura hexagonal pelas vibrações C-C com hibridização sp^3 . Já a banda G corresponde à vibração C-C sp^2 no plano.⁴⁷

Tendo isso em vista, a Figura 12 ilustra os espectros Raman de G, OGP e OG.

Figura 12 - Espectro Raman do G, OGP e OG.



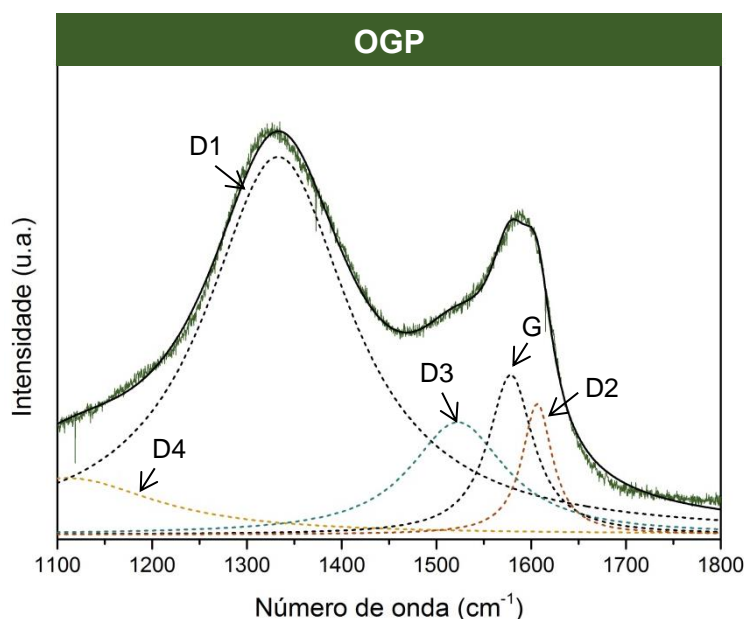
Fonte: Autor

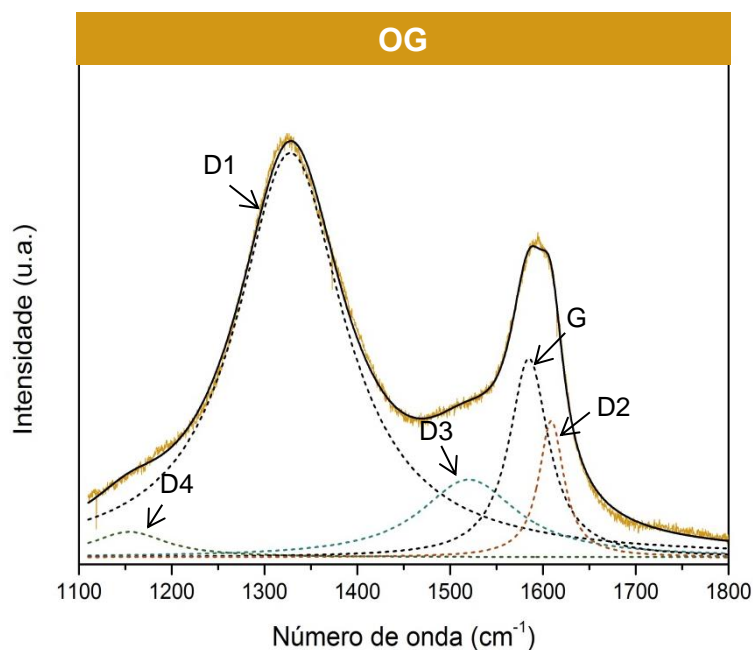
As características dos materiais carbônicos são apresentadas nos três espectros Raman. Porém, uma diferença na intensidade de pico e na largura da meia altura das bandas D e G são notadas. Estas diferenças estão relacionadas à desorganização estrutural do material, uma vez que a presença de defeitos altera significativamente as vibrações das ligações do carbono, alterando a intensidade da banda D observada no espectro Raman.⁴⁷

O grafite, tendo maior quantidade de ligações C-C sp^2 , possui uma banda D baixa se comparada a G. Já nos óxidos, a incorporação dos grupos oxigenados introduz defeitos em sua estrutura cristalina, alterando algumas ligações para sp^3 . Isso pode ser observado por uma banda D mais intensa.⁴⁷

O grau de desordem na estrutura e a quantidade de defeitos estruturais podem ser calculados pelos parâmetros I_D/I_G , dado pela razão da intensidade dos picos, e ω_D/ω_G , pela razão da largura da metade do pico, respectivamente.⁴⁷ Para isso as amostras OGP e OG foram submetidas ao processo de deconvolução utilizando a função lorentziana. Os gráficos obtidos estão ilustrados na Figura 13.

Figura 13 - Deconvolução dos espectros de Raman do OGP e OG.





Fonte: Autor

A deconvolução dos picos aplicada nos espectros Raman originou as bandas D1, D2, D3, D4 e G, soma de todas, as quais podem ser observadas na Figura 13. Os valores obtidos dos parâmetros pelas bandas D1 e G para o OGP e OG são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de I_D/I_G e ω_D/ω_G do OGP e OG.

Amostra	I_D/I_G	ω_D/ω_G
OGP	2,34	3,20
OG	2,03	2,72

Fonte: Autor

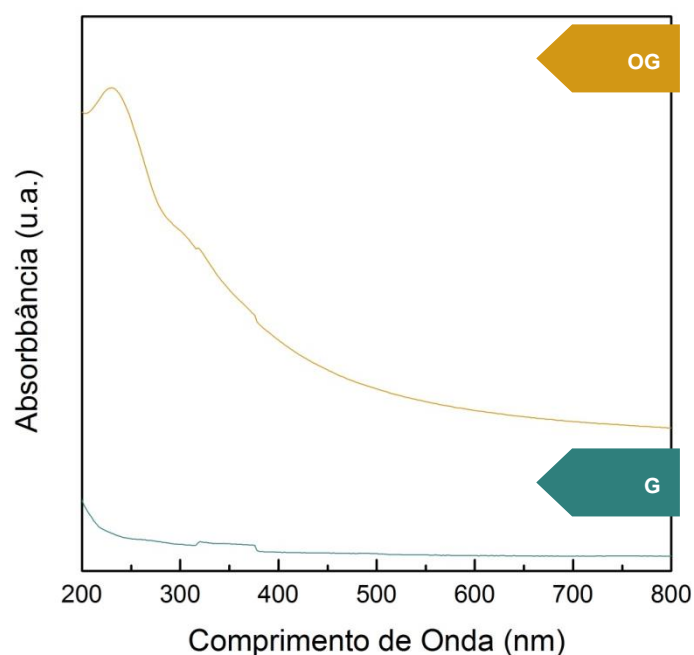
Um material cristalino possui valor de I_D/I_G próximo de zero e, quanto maior o valor, mais desorganizado o material pode ser considerado. Os óxidos apresentaram valores maiores que 0, revelando a presença de uma maior quantidade de defeitos estruturais decorrentes do agressivo processo oxidativo imposto na síntese, quebrando a estrutura gráfica e incorporando grupos oxigenados. O OG

apresentou menor quantidade de defeitos se relacionado ao OGP e, observando os valores de ω_D/ω_G , também apresentou menor quantidade de defeitos estruturais.

4.1.7 Espectroscopia na região UV-Vis

Uma das principais técnicas que pode ser empregada para caracterização do óxido de grafeno é a espectroscopia de UV-Vis. Através dessa técnica é possível observar as transições eletrônicas moleculares de G e OG (Figura 14).

Figura 14 - Espectro de UV-Vis do G e OG.



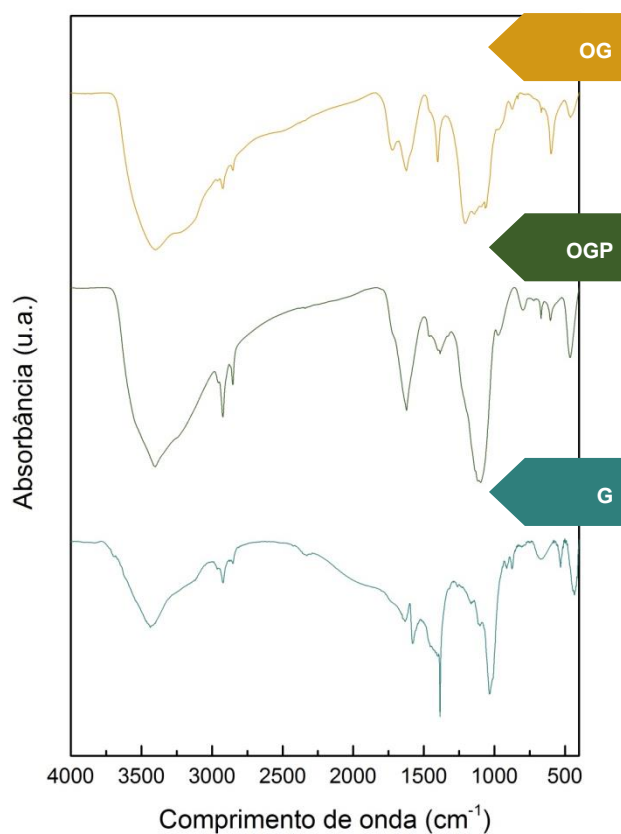
Fonte: Autor.

A linha azul ilustra o espectro UV-Vis para o padrão G e a linha amarela OG. O grafite não apresentou bandas absorção no intervalo de 200 a 800 nm. Toda via, o OG apresentou absorção em 230 nm correspondente às transições $\pi \rightarrow \pi^*$ (orbital ligante para antiligante) dos domínios de carbono aromáticos conjugados, e um ombro em 296 nm que pode ser atribuído a transição do tipo $n \rightarrow \pi^*$ (orbital não ligante para antiligante) atribuídas a ligações do tipo C=O do grupo carbonila.⁴⁸

4.1.8 Espectroscopia na região do infravermelho

A fim de se obter conhecimento das estruturas moleculares da amostra foram feitas análises empregando espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. A Figura 15 ilustra os espectros de infravermelho do óxido de grafeno sintetizado e dos padrões de grafite e óxido de grafeno. Já a Tabela 3 apresenta as principais bandas obtidas e suas respectivas atribuições.

Figura 15 - Espectros na região do Infravermelho do OG, OGP e G.



Fonte: Autor

Tabela 3 - Atribuição das principais bandas de absorção na região do infravermelho.

Grupo	Atribuição	Bandas de absorção (cm ⁻¹)	Amostras
-OH (água)	v	3700-3000	G, OGP, OG
-C-H (Aromático)	v _{as}		
-C-H	v _s	~2922	G, OGP, OG
-C-H	v _{as}	~2850	G, OGP, OG
-C=O (carbonil/carboxil)	v	~1730	OGP, OG
-C=C (aromático)	v	~1620	G, OGP, OG
-COOH	v(C-O)/ δ(O-H)	1480-1300	G, OGP, OG
-CH ₂ CO	v		
-CO (hidroxil)	v	1300-900	OGP, OG
-C-O-C (epoxi)	v		
-C=C-H (insaturação alifática)	(C-H) γ _s	~1011	G, OGP, OG
-C-H (substituído aromático)	γ _s	900-730	OGP, OG
-C-O-C	γ	~580	OGP, OG

v : estiramento; δ: deformação no plano; γ: deformação fora do plano; s: simétrica; as: assimétrica

Fonte: Socrates ⁴⁹

Analisando a Figura 15, nota-se que os espectros de IV obtidos para OG e OGP apresentaram relativa semelhança, uma vez que, as bandas 3700-3000, 2922, 2850, 1730, 1620, 1480-1300, 1300-900, 1011, 900-730 e 580 cm⁻¹ se sobrepuseram. Já

para a amostra de G, observa-se a ausência das bandas 1730, 1300-900, 900-730 e 580 cm^{-1} .

Relacionando esta análise com a Tabela 3, atribuíram-se as bandas vibracionais dos espectros do IV que diferem o G dos óxidos. As bandas 1730, 1300-900 e 580 cm^{-1} estão relacionadas aos grupos carbonil, epóxi e hidroxil. Estas bandas confirmam a oxidação e esfoliação do grafite a óxido de grafeno.

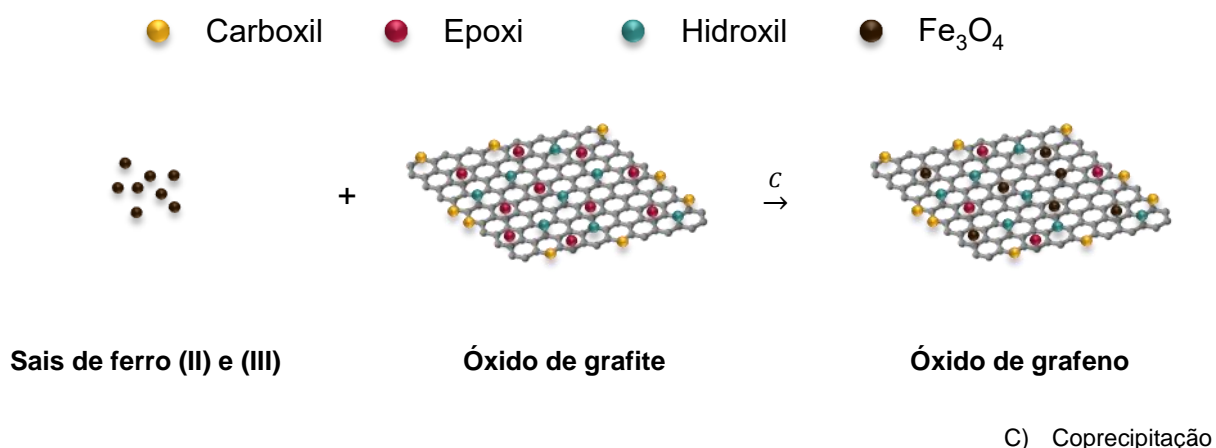
4.2 Caracterizações da síntese do óxido de grafeno magnético (OGM)

A dispersão coloidal de OG em $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$, com pH próximo a 9, foi adicionada a uma solução aquosa de sais de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (1:2) proporcionando uma reação de coprecipitação, representada pela equação química abaixo.



Como consequência, as nanopartículas de óxido de ferro magnético produzidas foram ligadas ao OG por ligações Fe-O-C. [29,50,51] Uma representação ilustrativa das fases do produto durante a síntese é apresentada na Figura 16.

Figura 16 - Representação do esquema da rota de preparo, por coprecipitação modificada, do OGM.



A cor amarela característica do OG foi alterada para marrom escuro indicando a presença do óxido de ferro magnético, a qual pode ser observada na Figura 17A. Ao aplicar campo magnético (0,3 T) através de um imã sobre a suspensão houve separação imediata do OGM conforme observado na Figura 17B. Essas características qualitativas sugerem que a síntese do OGM foi eficaz.

Figura 17 - Dispersão coloidal de OGM em H₂O/NH₄OH (pH=9) A) sem e B) com campo magnético

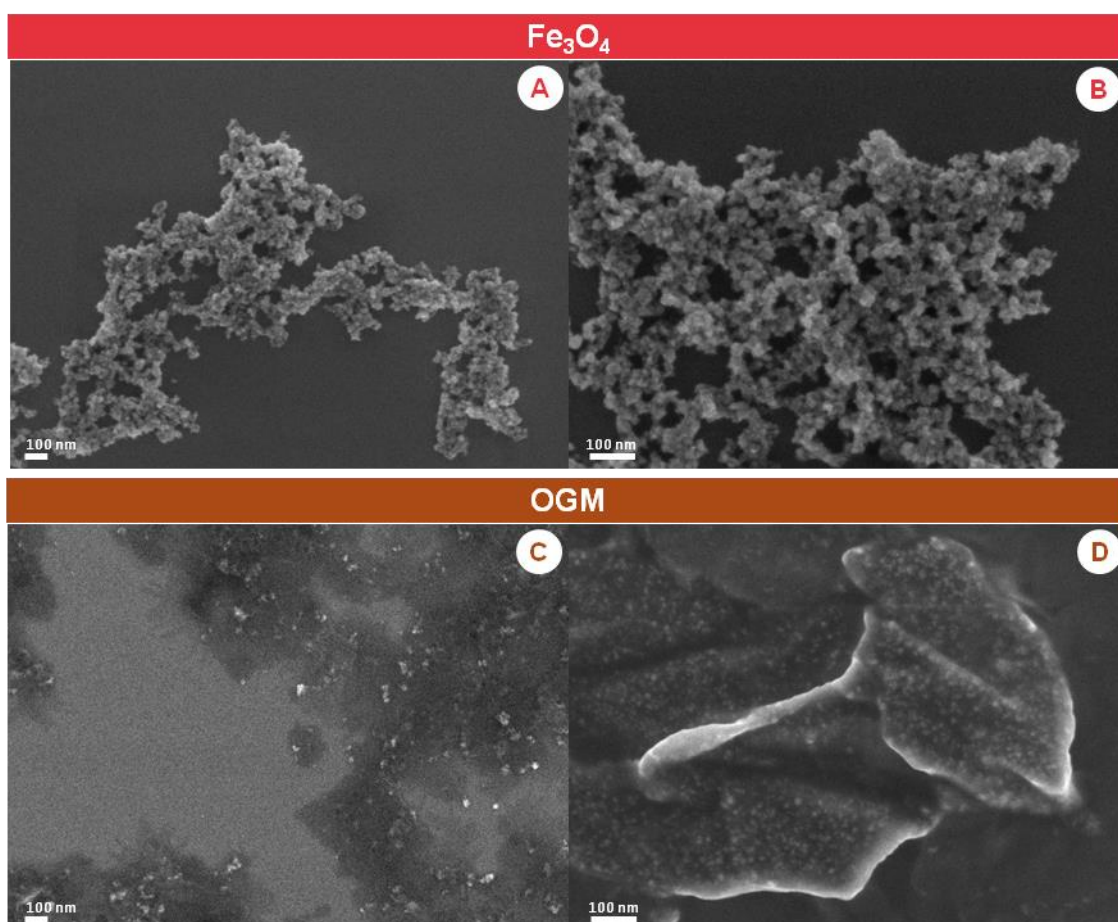


Fonte: Autor

4.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

Tendo em vista um estudo sistemático da morfologia das nanoestruturas de óxido de grafeno decoradas com óxido de ferro magnético, foram feitas micrografias do Fe₃O₄, sintetizado por coprecipitação, e do OGM, pela coprecipitação modificada. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Micrografias do Fe_3O_4 A) magnificação 50 mil e B) 100 mil vezes e OGM C) magnificação 50 mil e D) 100 mil vezes.



Fonte: Autor

As Figura 18A e B mostram as micrografias das nanopartículas de Fe_3O_4 , as quais estão dispostas em grandes aglomerados. Segundo a literatura isso ocorre pelas fortes interações das ligações de hidrogênio, dipolos e interações de campo magnético das nanopartículas em fase aquosa.^{50,51}

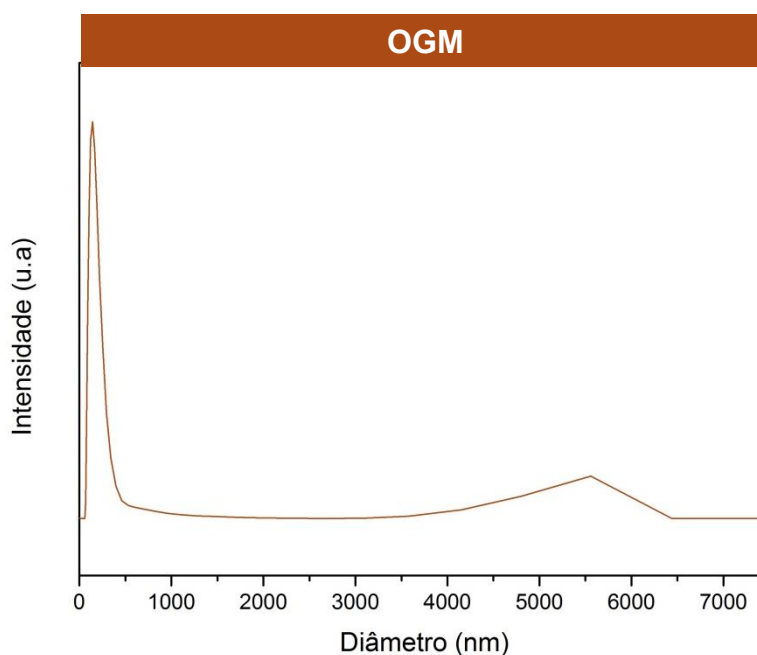
Em comparação, nas Figura 18C e D, mesmo após as lavagens do material, as nanopartículas foram observadas apenas dispersas nas folhas do OGM, não apresentando um processo de forte agregação e sugerindo uma forte interação entre elas.^{50,51}

Atribui-se estes resultados aos grupos funcionais oxigenados na superfície do OGM, que através de ligações Fe-O-C, tendem propiciar a nucleação e o crescimento do óxido de ferro magnético.^{29,50,51}

4.2.2 Diâmetro hidrodinâmico

Analogamente a seção 4.2.1 foi obtida a distribuição de tamanho médio de OGM sintetizado, a qual pode ser observada na Figura 19.

Figura 19 - Distribuição do tamanho médio do OGM



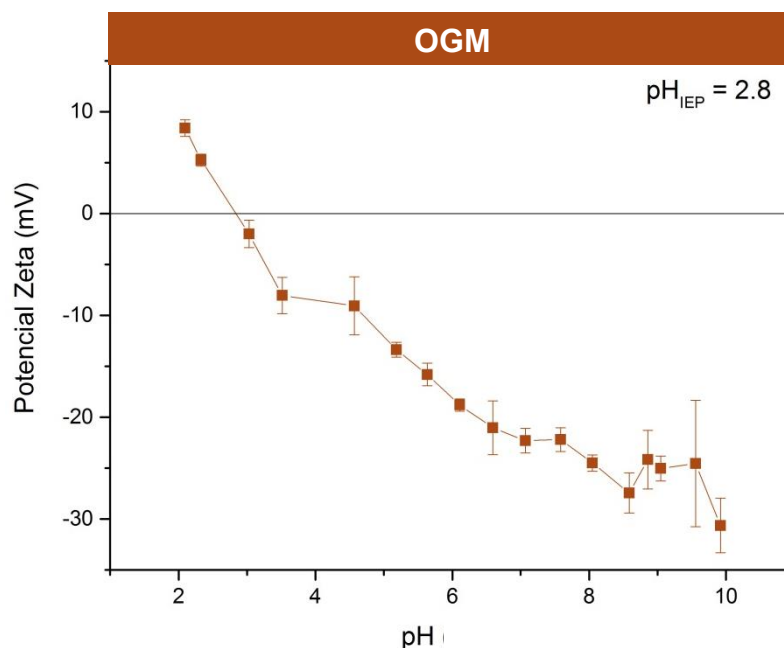
Fonte: Autor

Os tamanhos médios do OGM obtidos foram de 142 e 5560 nm. Estes valores mostram uma possível diminuição das folhas grandes, não observadas anteriormente no OG, pelo processo de síntese de coprecipitação e suspensão da amostra por ultrassom.⁵²

4.2.3 Potencial zeta

Semelhante a sessão 4.1.3 o potencial zeta da dispersão aquosa de OGM a diferentes valores de pH foi feito e pode ser observado na Figura 20.

Figura 20 - Curva de potencial Zeta versus pH para amostra OGM

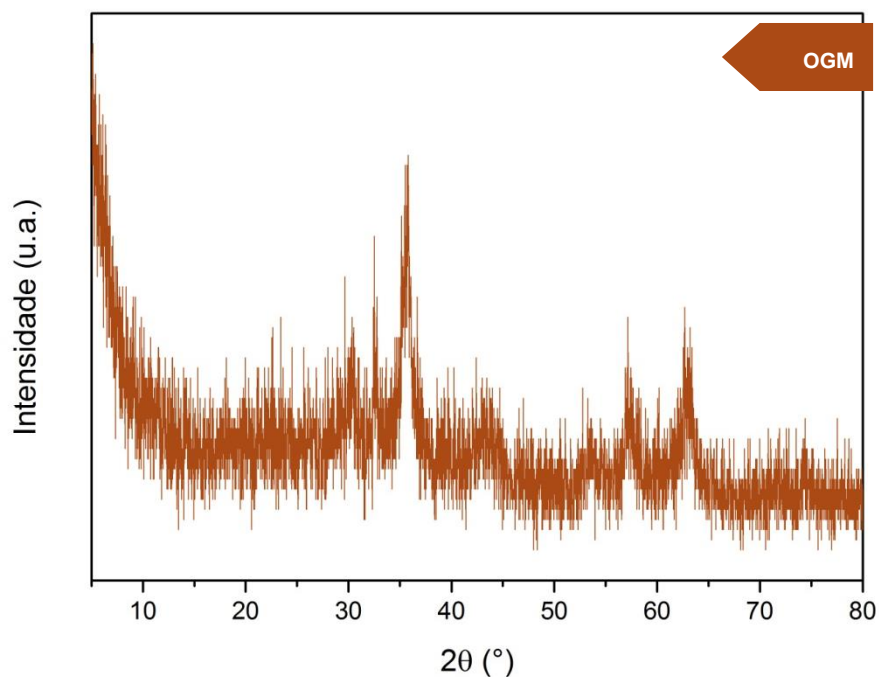


Fonte: Autor

A presença de nanopartículas de óxido de ferro magnéticas na superfície do OG alterou a distribuição dos íons na região interfacial. Quando em meio aquoso, sobre estas partículas, encontram-se hidroxilas, as quais dependendo do valor de pH podem formar íons H^+ ou OH^- . No pH 2,8 o potencial zeta é zero, ou seja, há um equilíbrio entre essas cargas. Este ponto é chamado de ponto isoelétrico. Em pH 10 a dispersão continuou estável, com valor em 10 de $-30,63$ mV. Este resultado sugere uma forte interação das nanopartículas magnéticas com a superfície do OG. Se comparado à curva de potencial Zeta versus pH da amostra OG, observa-se que as cargas de superfície são completamente diferentes entre os dois sistemas.

4.2.4 Difractometria de raios X

A caracterização microestrutural do OGM foi conduzida analogamente a seção 4.1.2. O difratograma de raios X obtido para esta amostra está ilustrado na Figura 21.

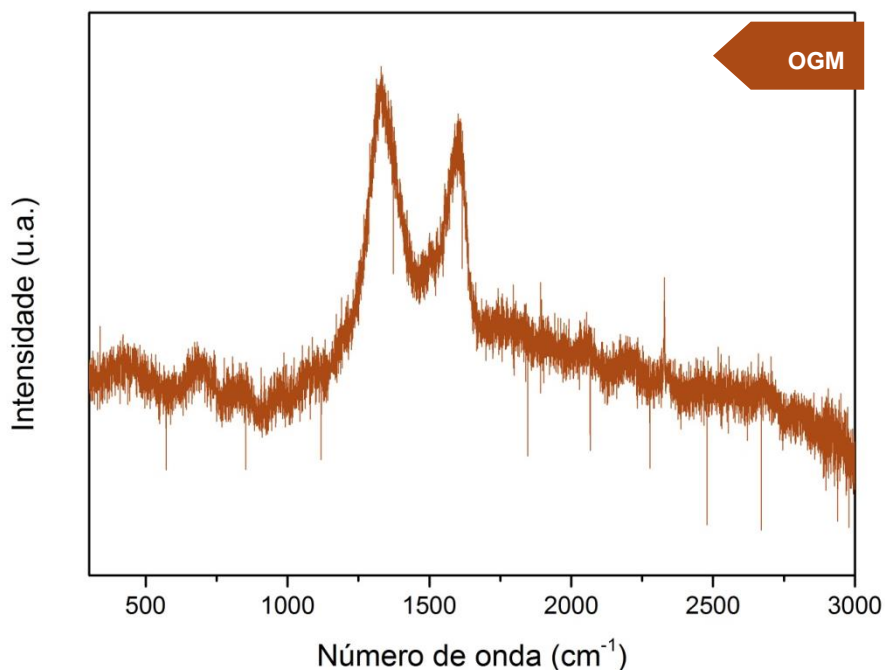
Figura 21 - Difratoograma de raios-x do OGM.

Fonte: Autor

Os picos de difração em $30,2^\circ$, $35,7^\circ$, $43,4^\circ$, $53,7^\circ$, $57,2^\circ$ e $63,4^\circ$ podem ser atribuídos aos planos cristalinos de Fe_3O_4 (220), (311), (400), (422), (511) e (440), coincidentes com a literatura. Porém não há como identificar com precisão se há formação de maghemita ou magnetita, pois ambas apresentam picos de difração com ângulos próximos devido à semelhança de sua estrutura cristalina. Contudo ambas podem ser utilizadas para a aplicação como agentes de contraste em ressonância magnética nuclear.^{29,51}

4.2.5 Espectroscopia Raman

A suspensão coloidal foi submetida à espectroscopia Raman visando à verificação do óxido de grafeno, seus parâmetros (I_D/I_G e ω_D/ω_G) e a espécie de fase do óxido de ferro. O espectro de Raman da amostra OGM sintetizada é apresentado na Figura 22 abaixo.

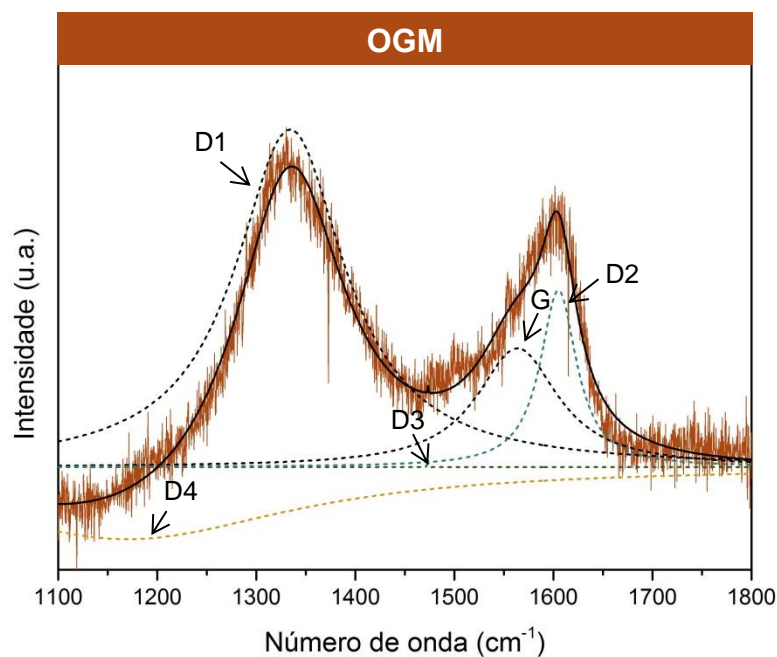
Figura 22 - Espectro Raman do OGM.

Fonte: Autor

Apesar da vantagem de identificação dos compostos através do espectro Raman, não foi possível detectar a fase de óxido de ferro (na região de 300 a 700 cm^{-1}) devido ao ruído inerente dos espectros dificultando sua interpretação. Sendo assim, apenas as bandas correspondentes ao óxido de grafeno, D (1200 a 1400 cm^{-1}) e G (1500 a 1600 cm^{-1}) puderam ser observadas.

Para o cálculo dos parâmetros I_D/I_G e ω_D/ω_G as bandas foram deconvoluidas. O resultado obtido está ilustrado na Figura 23.

Figura 23 - Deconvolução dos espectros de Raman do OGM.



Fonte: Autor

A deconvolução aplicada nos espectros Raman originou as bandas D1 e G observadas na Figura 23. Os valores obtidos nos parâmetros para o OGM estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de I_D/I_G e ω_D/ω_G do OG e OGM.

Amostra	I_D/I_G	ω_D/ω_G
OG	2,03	2,72
OGM	2,83	1,34

Fonte: Autor

O OGM apresentou valor de I_D/I_G maiores ao OG e ω_D/ω_G menores que o OG indicando um aumento no grau de desordem e diminuição dos defeitos na estrutura. Isso pode ocorrer, pois a presença das nanopartículas de óxido de ferro magnéticas

aumentaram a desordem do material, mas também interagiram com os grupos o hidroxilo, epóxi e carboxílicos diminuindo a quantidade de defeitos das folhas.⁵³

4.2.6 Espectroscopia na região do infravermelho

Através da energia vibracional das moléculas que compõe o material foi empregada espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier para identificar os compostos presentes.

A Figura 24 apresenta os espectros de infravermelho do OGM e OG, os quais são comparados com a Tabela 5, em que suas principais bandas e respectivas atribuições são indicadas.

Figura 24 - Espectros na região do Infravermelho do OGM e OG.

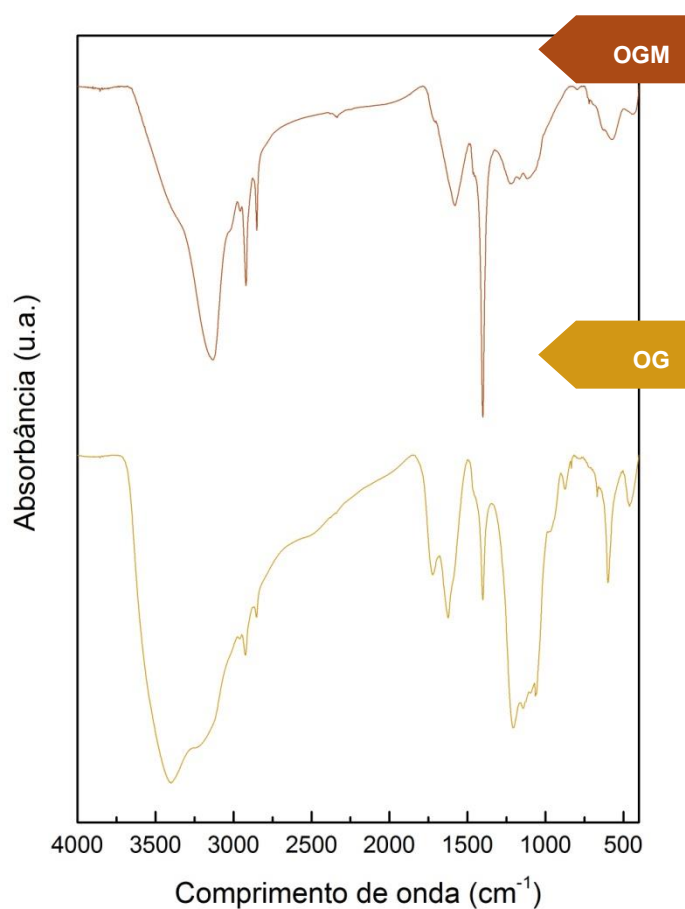


Tabela 5 - Atribuição das principais bandas de transmissão dos espectros na região do infravermelho do OG e OGM.

Grupo	Atribuição	Bandas de absorção (cm ⁻¹)	Amostras
-OH (água)	v	3700-3000	OG, OGM
-C-H (Aromático)	V _{as}		
-C-H	V _s	~2920	OG, OGM
-C-H	V _{as}	~2850	OG, OGM
-C=O (carbonil)	v	1800-1670	OG, OGM
-C=C (aromático)	v	~1590	OG, OGM
-COOH	v(C-O)/ δ(O-H)	1480-1352	OG, OGM
-CH ₂ CO	v		
-C-O-C- (epóxi)	v	1352-1093	OG, OGM
Fe-O	v	~650	OGM
Fe-O	v	~580	OGM
-C-O-C	γ	~580	OG, OGM

v : estiramento; δ: deformação no plano; γ: deformação fora do plano; s: simétrica; as: assimétrica

Fonte: Socrates⁴⁹

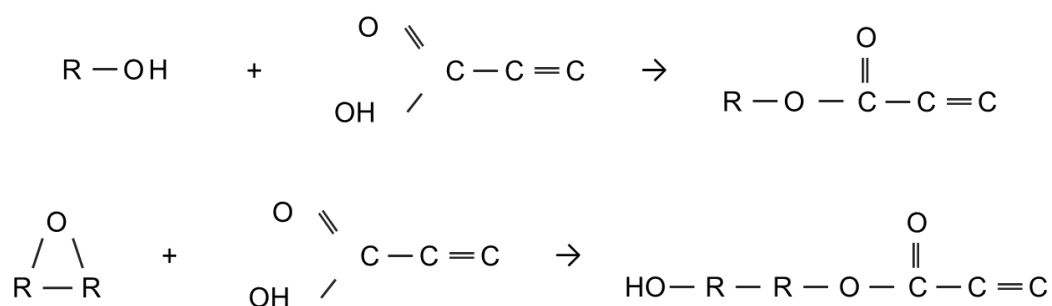
Analisando a indicadas, na Figura 24 observa-se uma correspondência entre as bandas do OG e o OGM, como as bandas 3700-3000, 2920, 2850, 1800-1670, 1590, 1480-1352 e 1352-1093 cm⁻¹. Já as bandas 650 e 580 cm⁻¹ são notadas apenas para o OGM.

Relacionando as bandas vibracionais com Tabela 5, é possível concluir que as bandas vibracionais em 650 e 580 cm^{-1} , correspondem ao Fe-O, indicando que a síntese foi satisfatória. A diminuição da intensidade da banda em 1352-1093 sugere que a ligação do óxido de ferro com a superfície do OG possa estar ocorrendo via interações com os grupos epóxi.

4.3 Caracterizações da síntese do óxido de grafeno magnético fluorescente (OGMF)

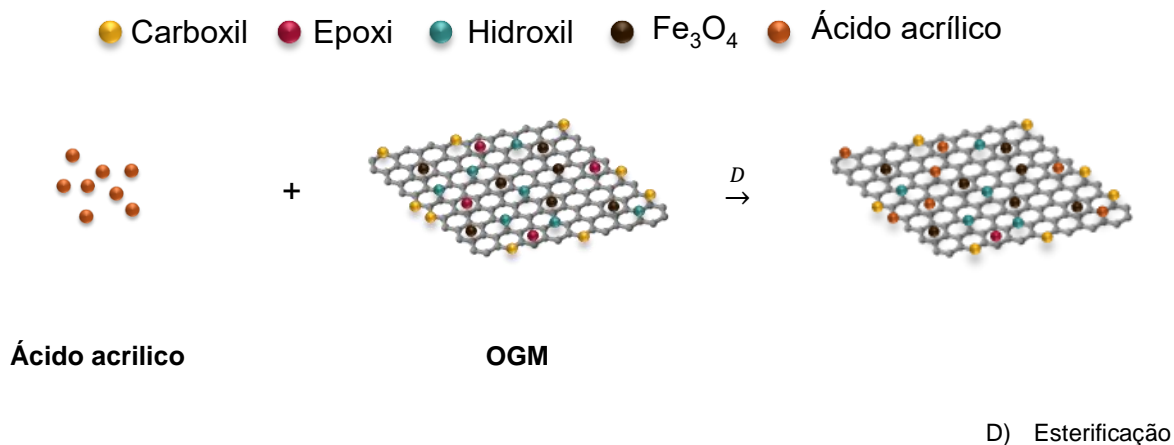
Sabendo que o óxido de grafeno pode ser facilmente funcionalizado, introduziu-se a propriedade de fluorescência no OGM ancorando a fluoresceína *o*-metacrilato (FMA) na superfície, pelo processo de polimerização na presença de radicais livres. Para isso, foi utilizado o ácido acrílico (AA), bissulfito de sódio e o persulfato de amônio.^{30,35}

O ácido acrílico foi adicionado a dispersão coloidal de OGM em $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$, com pH próximo a 9, proporcionando reações de esterificação do grupo ácido carboxílico do AA com os grupos hidroxil e epóxi presentes no OGM, representadas pelas equações químicas abaixo.



Uma representação ilustrativa das fases do produto durante a síntese é apresentada na Figura 25.

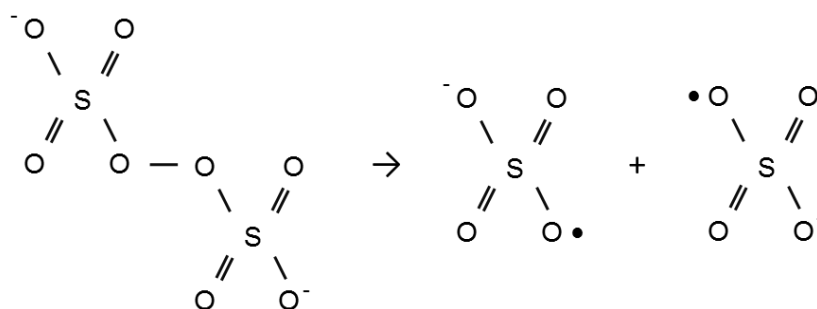
Figura 25 - Representação da síntese da funcionalização do OGM com ácido acrílico.

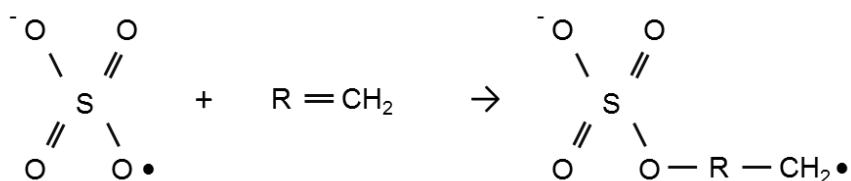


Fonte: Autor

O persulfato de amônio é utilizado como iniciador de polimerização. Em pH neutro e alcalino ele produz dois radicais livres por molécula. Contudo, para ocorrer a cisão homolítica das ligações entre os átomos é necessária energia térmica. O bissulfito de sódio foi empregado como catalisador, pois ele rompe as ligações pela transferência de elétrons, diminuindo a energia de ativação permitindo trabalhar com faixa de temperatura menores.^{30,35}

Ao adicionar o persulfato de amônio e o bissulfito de sódio no meio inicia-se o processo de polimerização da fluoresceína e também sua ligação com o óxido de grafeno pela dupla ligação do AA presente em sua superfície. As reações da formação do radical e polimerização radicalar podem ser observadas abaixo.

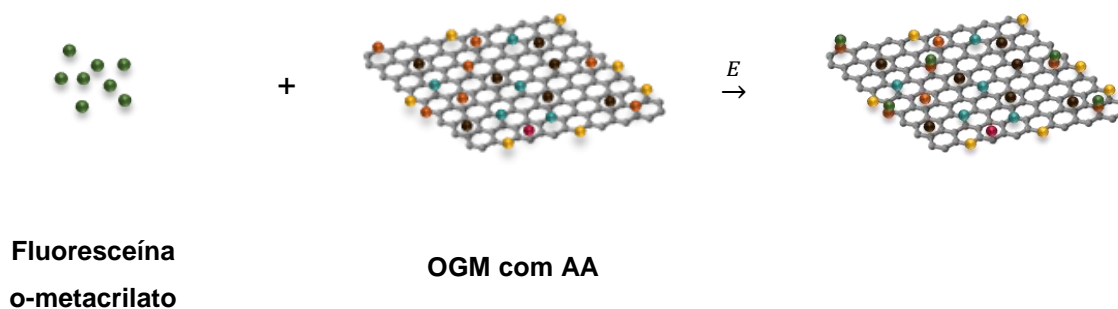




Uma representação ilustrativa do processo de síntese pode ser observada na Figura 26.

Figura 26 - Representação do processo de síntese do OGMF pela funcionalização com a fluoresceína

● Carboxil ● Epoxi ● Hidroxil ● Fe₃O₄ ● Ácido acrílico ● Fluoresceína



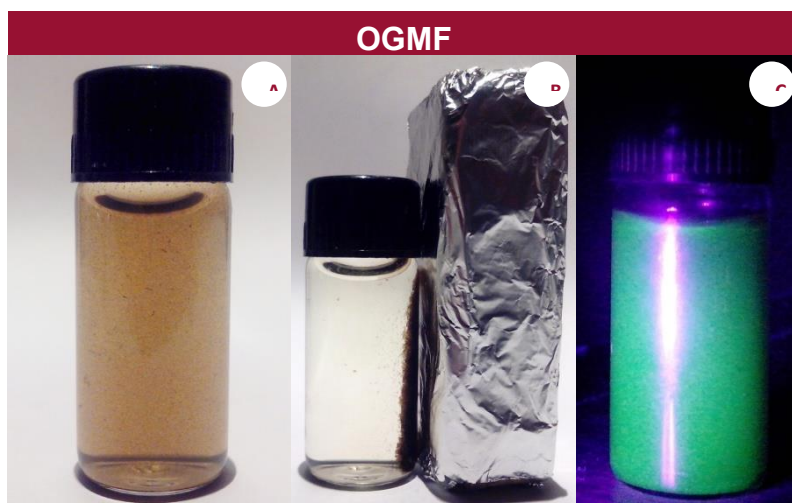
E) Polimerização radicalar

Fonte: Autor

Para verificar o seu caráter magnético, um campo magnético com indução de 0,3 Tesla foi aplicado. Observou-se que houve separação do OGMF, porém mais lentamente se comparado ao OGM. Em seguida, visando à fluorescência, uma radiação na região do ultravioleta/visível (UV/Vis), foi incidida na amostra, e o fenômeno de fluorescência na região do verde foi observado.

Tendo em vista a essas etapas, as Figura 27 A, B e C ilustram a dispersão de OGMF, OGMF sobre o efeito de um campo magnético e o OGMF sendo incidido por radiação UV, respectivamente.

Figura 27 - Dispersão coloidal de OGMF em H₂O/NH₄OH (pH=9) A) sem, B) com campo magnético e C) sob luz UV.

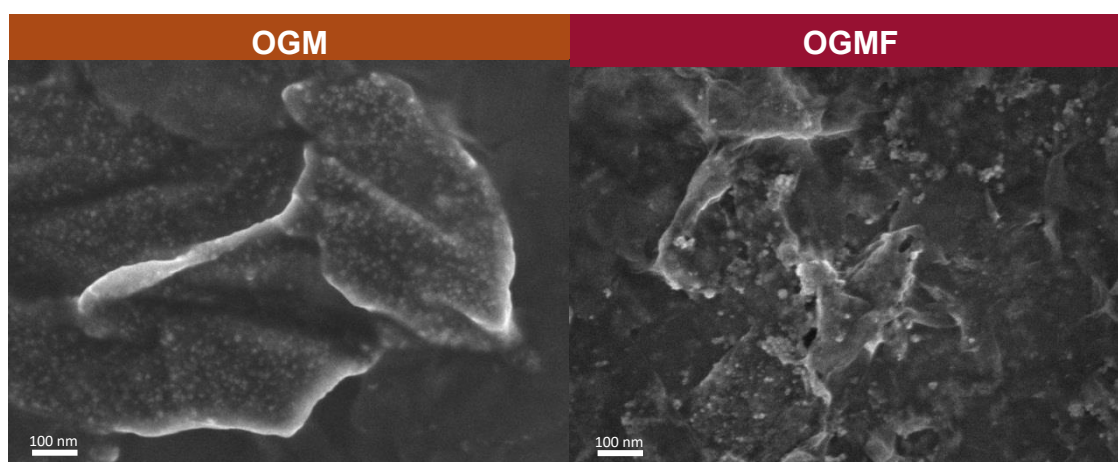


Fonte: Autor

4.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

A amostra de OGMF foi caracterizada morfologicamente por FEG-MEV. As micrografias comparativas de OGM e OGMF estão apresentadas na Figura 28 - Micrografias tratadas do OGM e OGMF. Figura 28.

Figura 28 - Micrografias tratadas do OGM e OGMF.



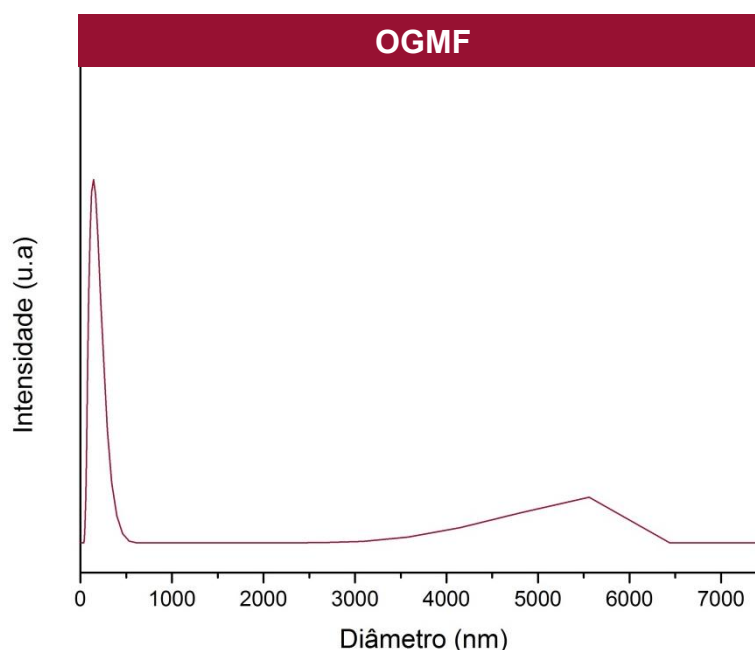
Fonte: Autor

Comparando as Figura 28 A e B correspondentes ao OGM e OGMF, não foi possível notar grandes diferenças na morfologia da amostra. Ambas apresentaram pequenas esferas, relacionadas às nanopartículas de óxido de ferro, dispersas nas folhas do OGP.^{50,51}

4.3.2 Diâmetro hidrodinâmico

Na Figura 29 observa-se a distribuição de tamanho médio de OGMF sintetizado, a qual foi obtida analogamente a seção 4.2.1.

Figura 29 - Distribuição do tamanho médio do OGMF



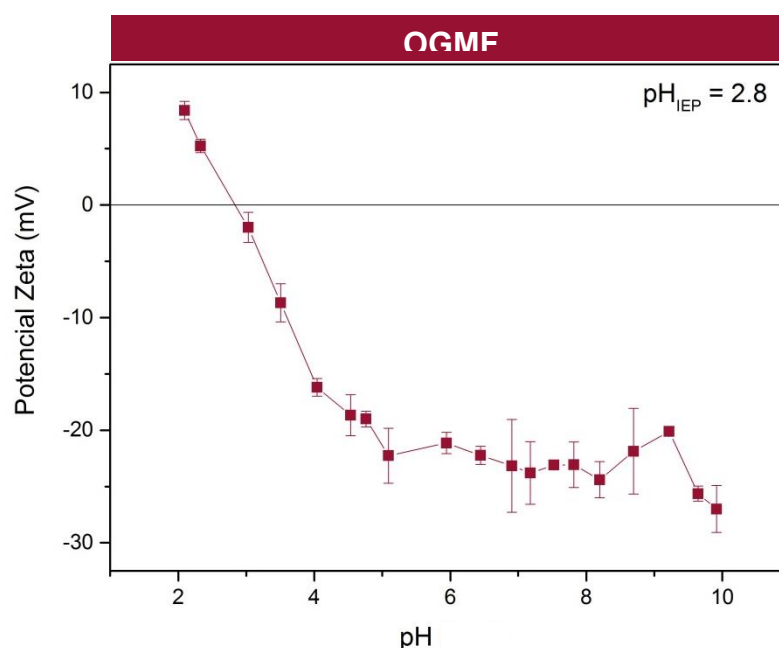
Fonte: Autor

Os tamanhos médios do OGMF obtidos foram de 142 e 5560 nm. Ao comparar estes valores ao OGM percebe-se que são semelhantes, sugerindo que a modificação da superfície de OGM com FMA não alterou a morfologia e tamanho de partículas e folhas de grafeno.

4.3.3 Potencial zeta

Na Figura 30 observa-se a curva de potencial Zeta versus pH para amostra OGMF, a qual foi obtida de forma análoga seção 4.1.3.

Figura 30 - Curva de potencial Zeta versus pH para amostra OGMF



Fonte: Autor

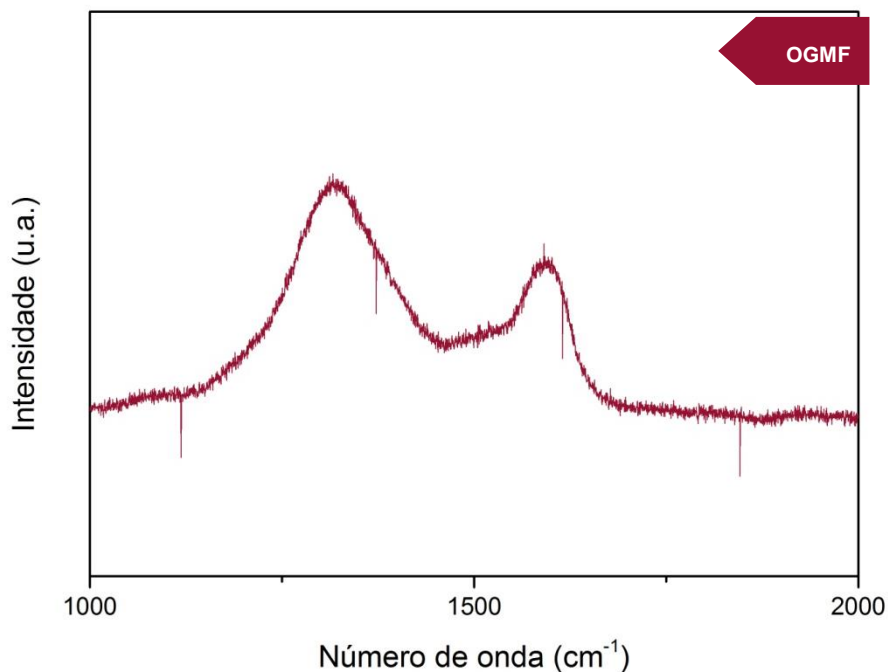
Esperava-se que com a presença do ácido acrílico e da fluoresceína e, conseqüentemente, o aumento de grupos carboxílicos, houvesse maior variação do potencial zeta.⁵³ Contudo o perfil continuou o mesmo do OGM, com ponto isoelétrico em pH 2,8, provavelmente por quantidade maior de nanopartículas a estas substâncias, fazendo com que elas causem maior influência na região interfacial.

4.3.4 Espectroscopia Raman

Assim como feitos para as outras amostras, o mapeamento estrutural do OGMF foi feito empregando a espectroscopia Raman. Através dessa técnica e aplicando o tratamento espectral denominado deconvolução, foi possível calcular os

parâmetros I_D/I_G e ω_D/ω_G que denotam o grau de desordem e quantidade de defeitos estruturais, respectivamente. Tendo em vista isso, a Figura 31 apresenta o espectro Raman obtido para o OGMF.

Figura 31 - Espectro Raman do OGMF.

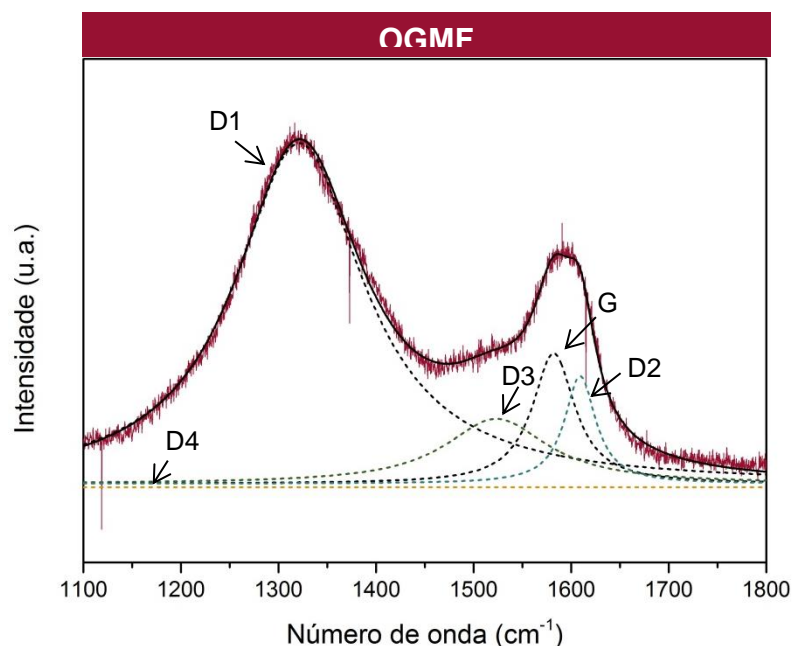


Fonte: Autor

Assim como anteriormente, foram observadas as bandas D e G dos materiais carbônicos, referentes ao óxido de grafeno presente.

Visando obter as relações de I_D/I_G e ω_D/ω_G foi utilizada o tratamento espectral de deconvolução, o qual está ilustrado na Figura 32.

Figura 32 - Deconvolução do espectro de Raman do OGMF.



Fonte: Autor

A deconvolução aplicada nos espectros Raman originou as bandas D1 e G observadas na Figura 32. Os valores obtidos nos parâmetros para o OGM estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de I_D/I_G e ω_D/ω_G do OGM e OGP.

Amostra	I_D/I_G	ω_D/ω_G
OGM	2,83	1,34
OGMF	2,61	3,01

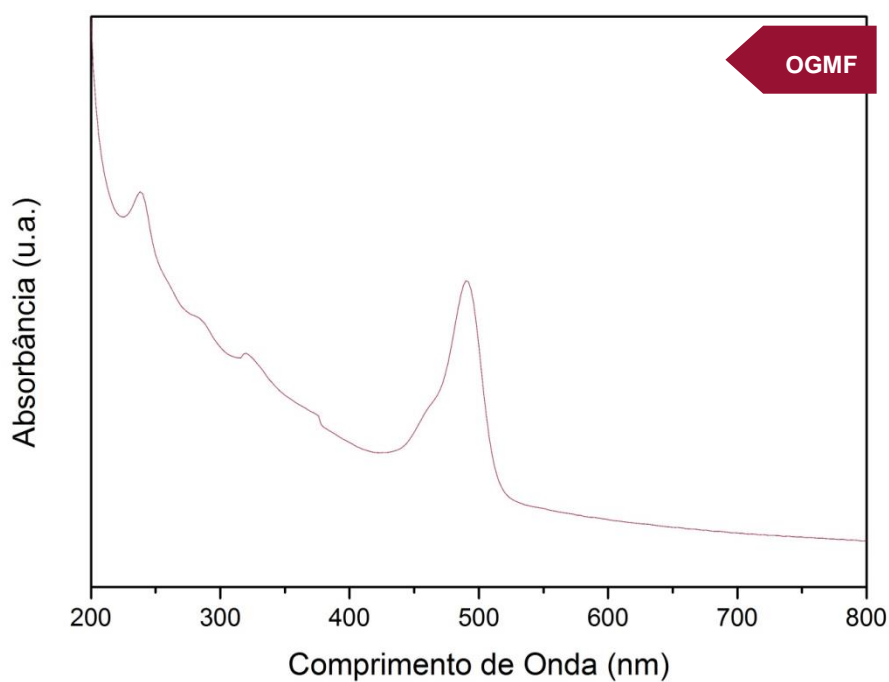
O OGMF apresentou valores de I_D/I_G próximos ao OGM indicando que ambos possuem defeitos estruturais semelhantes, contudo pelos valores de ω_D/ω_G , o OGMF apresentou aumento no grau de desordem no interior da estrutura provavelmente causado pela inserção do AA e da FMA.

4.3.5 Espectroscopia na região UV-Vis e fluorescência

Para melhor entendimento e visualização do fenômeno de fluorescência, os resultados obtidos para a técnica de UV-Vis bem como a técnica de fluorimetria, foram condensados. É importante ressaltar, que ambas apresentam como princípio da técnica a absorção da energia radiante e posterior emissão de parte dessa radiação.⁵⁴

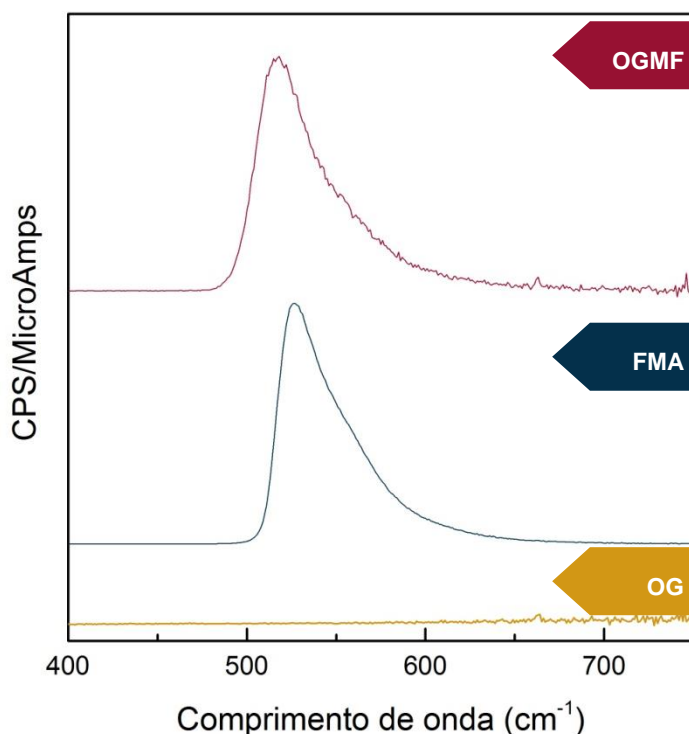
Sendo assim, os resultados obtidos para o UV-Vis e Fluorimetria estão apresentados nas Figura 33 e 34 respectivamente.

Figura 33 - Espectro de UV-Vis da amostra OGMF.



Fonte: Autor

Figura 34 - Fluorescência espectros ($\lambda_{\text{ex}} = 475 \text{ nm}$) do OG, FMA e OGMF



Fonte: Autor

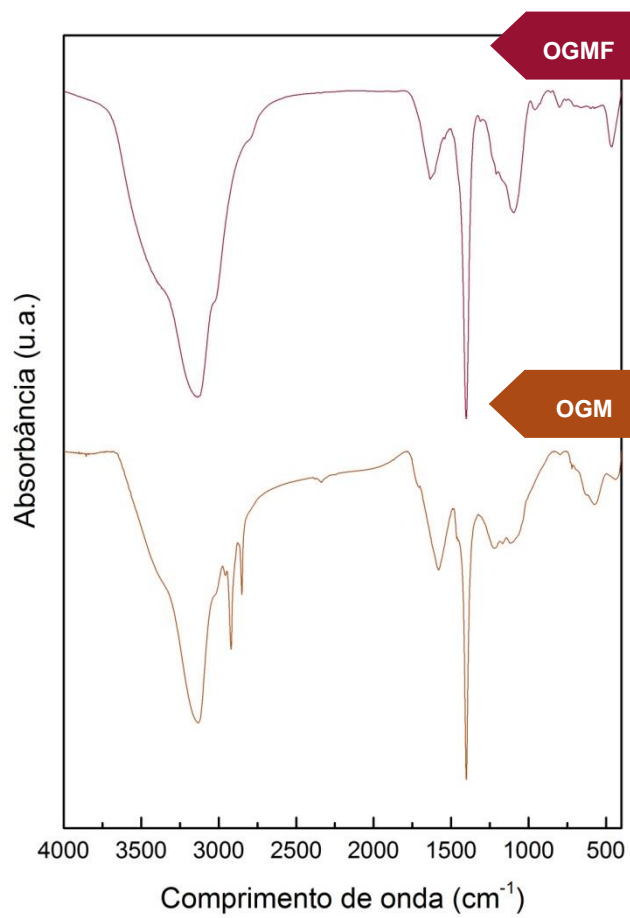
Segundo a Figura 33, o OGMF exibe uma banda distinta de absorção a 486 nm, típica da FMA e conseqüentemente uma forte emissão na região do verde em 514 nm. Essa emissão é originada da transição $\pi \rightarrow \pi^*$.⁵⁴

Porém, de acordo com a Figura 34, através de uma excitação em 475 nm, uma banda relativa à fluorescência para FMA e OGMF é observado em 527 nm⁻¹. Dessa forma, compreende-se que mesmo após a funcionalização de OGM com FMA, a fluorescência não é prejudicada.

4.3.6 Espectroscopia na região do infravermelho

Para avaliar a presença de moléculas na superfície do OGMF e paralelamente, comparar com as moléculas presentes em OGM, empregou-se a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier. A Figura 35 ilustra os resultados adquiridos para as amostras de OGM e OGMF.

Figura 35 - Espectros na região do Infravermelho do OGMF e OGM.



Fonte: Autor

Tabela 7 - Atribuição das principais bandas de transmissão dos espectros na região do infravermelho do OGM e OGMF

Grupo	Atribuição	Bandas de absorção (cm ⁻¹)	Amostras
-OH (água)	v	3700-3000	OGM, OGMF
-C-H (Aromático)	V _{as}		
-C-H	V _s	~2920	OGM
-C-H	V _{as}	~2850	OGM
-C=O (carbonil)	v	1800-1670	OGM
-C-O (íon caboxilato)	V _{as}	1635	OGMF
-C=C (aromático)	v	~1590	OGM, OGMF
-C-O (íon caboxilato)	V _s	1404	OGM, OGMF
-C-O-C- (epóxi)	v	1352-1093	OGM, OGMF
-C-H (substituído aromático)	γ _s	900-730	OGM
Fe-O	v	680-516	OGM
-C-O-C	γ	~580	OGM, OGMF

v : estiramento; δ: deformação no plano; γ: deformação fora do plano; s: simétrica; as: assimétrica

Fonte: Socrates^[49]

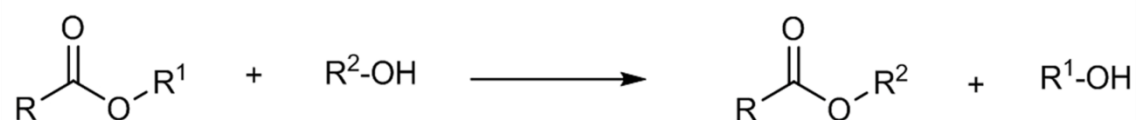
Analisando a Figura 35, as bandas 3700-3000, 1590, 1404 e 1352-1093 cm⁻¹, são observadas para o OGM e o OGMF. Já as bandas 2920, 2850, 1800-1670, 900-730, 680-516 cm⁻¹ são notadas apenas para o OGM, e a bandas 1635 cm⁻¹ para o OGMF.

A partir disso, correlacionando com as atribuições dadas na Tabela 7, é possível notar a presença do estiramento assimétrico do íon carboxilato, proveniente do AA na amostra de OGMF, demonstrando sua funcionalização.

Apesar da existência da FMA e das nanopartículas de óxido de ferro na superfície no OGMF, já observados por outros métodos, não foram presenciados nesta caracterização.

4.4 Caracterizações da síntese do óxido de grafeno magnético fluorescente com fotossensibilizador (OGMFV)

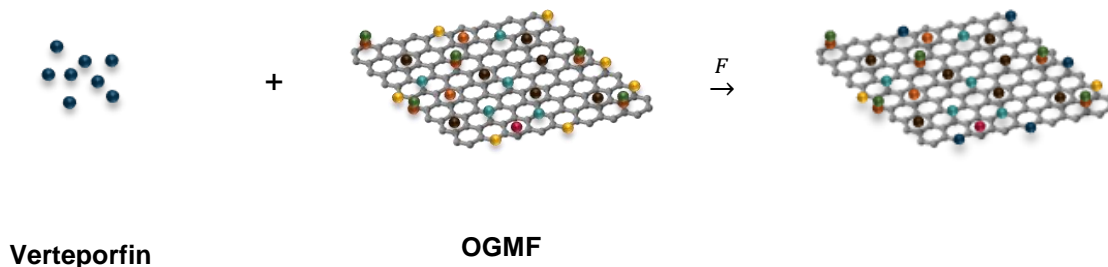
O óxido de grafeno possui grupos hidroxil em sua superfície e o Verteporfin um grupo éster, dessa forma para funcionalizar o OGMF foi feita uma reação de transesterificação, a qual pode ser observada abaixo.³¹⁻³³



A Figura 36 apresenta uma representação da transesterificação do OGMF com o verteporfin. O produto desta reação é a representação da folha do óxido de grafeno final.

Figura 36 - Representação da síntese por transesterificação do OGMF com o verteporfin

● Carboxil ● Epoxi ● Hidroxil ● Fe_3O_4 ● Ácido acrílico ● Fluoresceína ● Verteporfin



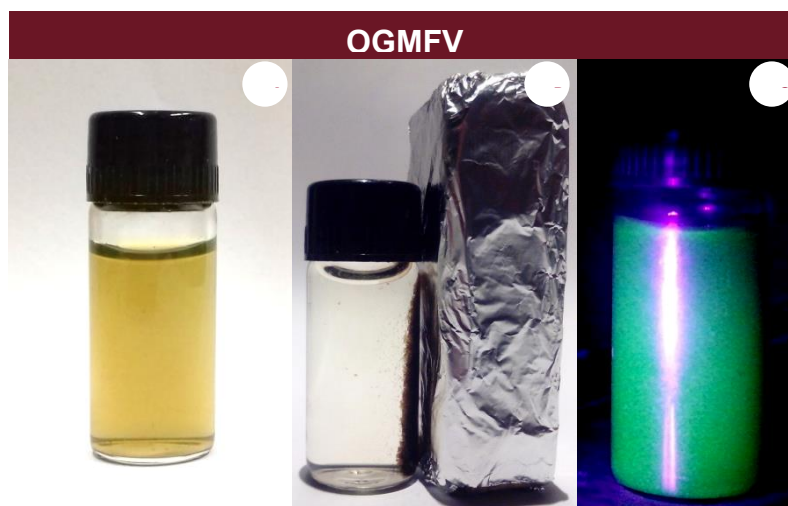
F) Transesterificação

Fonte: Autor

O caráter magnético do OGMFV foi verificado, aplicando um campo magnético com indução de 0,3 Tesla. A separação do material ocorreu de forma semelhante ao OGMF, e pode ser observada na Figura 37B.

Para certificar que o fenômeno de fluorescência se manteve, foi incidida uma radiação na região do ultravioleta/visível (UV/Vis) na amostra, e esta apresentou a coloração verde característica da fluoresceína *o*-metacrilato, conforme ilustrado na Figura 37C.

Figura 37 - Dispersão coloidal de OGMFV em $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$ (pH=9) A) sem, B) com campo magnético e C) sob luz UV

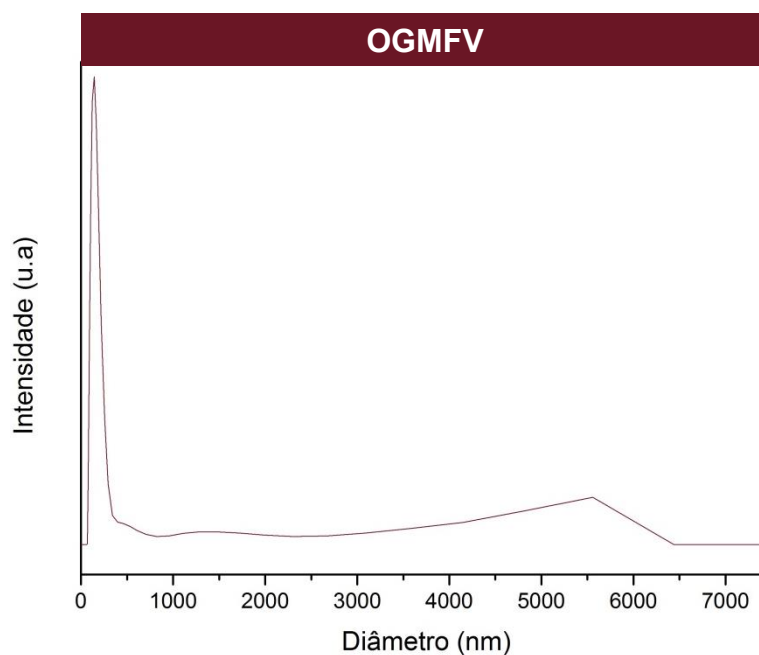


Fonte: Autor

4.4.1 Diâmetro hidrodinâmico

O OGMFV sintetizado também foi caracterizado por espalhamento dinâmico de luz, para analisar sua distribuição de tamanho médio aproximado conforme a seção 4.2.1. Os valores obtidos podem ser observados na Figura 38.

Figura 38 - Distribuição do tamanho médio do OGMFV

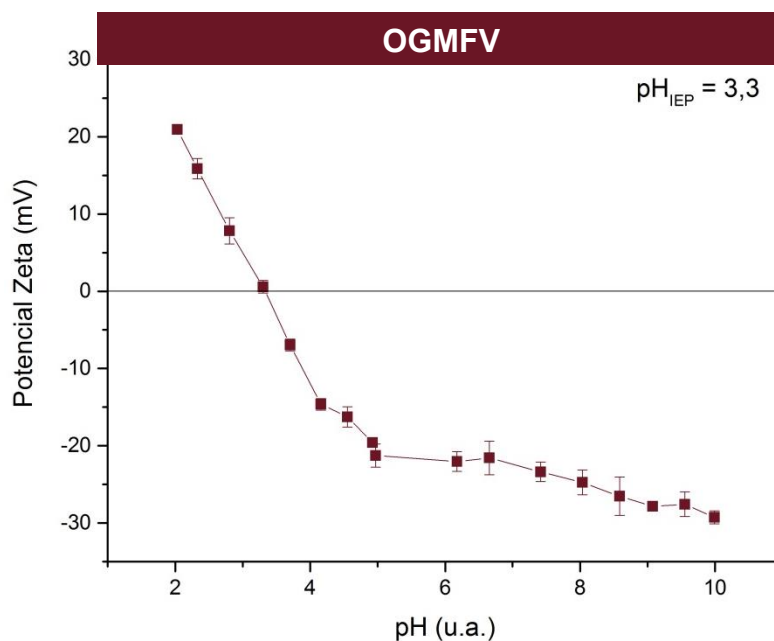


Fonte: Autor

Os tamanhos médios do OGMFV obtidos foram semelhantes ao OGM e ao OGMF com valores de 142 e 5560 nm.

4.4.2 Potencial zeta

O OGMFV, conforme descrito na seção 4.2.1, também foi caracterizado por Potencial Zeta. Na Figura 39 observa-se os valores obtidos.

Figura 39 - Curva de potencial Zeta versus pH para amostra OGMFV

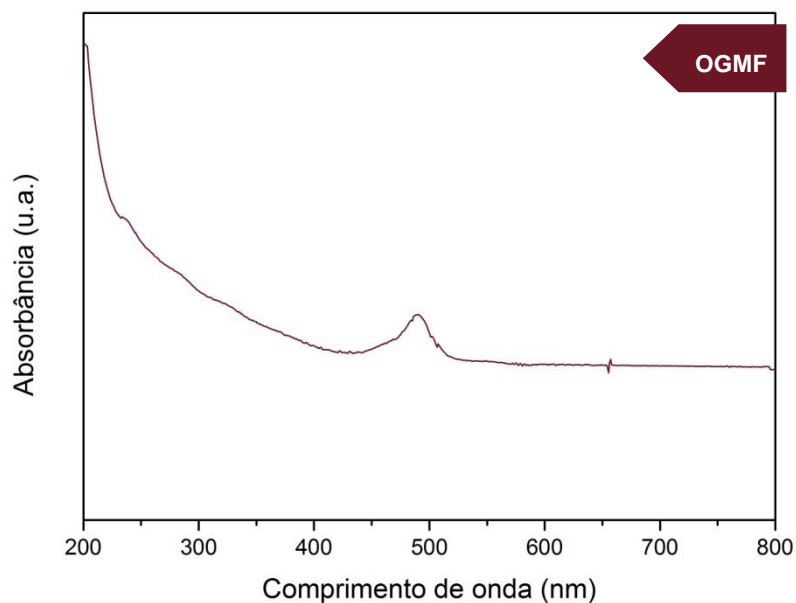
Fonte: Autor

A presença do verteporfin alterou o perfil da curva de potencial zeta do material, aumentando o pH do ponto isoelétrico de 2,8 para 3,3. Isso se deve a diminuição de grupos carboxílicos com a funcionalização do OGMF com esta substância, o qual alterou a carga de superfície do OGMF.

4.4.3 Espectroscopia na região UV-Vis

A técnica de UV-Vis foi utilizada para certificar que a fluorescência do material se manteve. Sendo assim, os resultados obtidos para o UV-Vis está apresentado na Figura 40.

Figura 40 - Espectro de UV-Vis da amostra OGMFV.



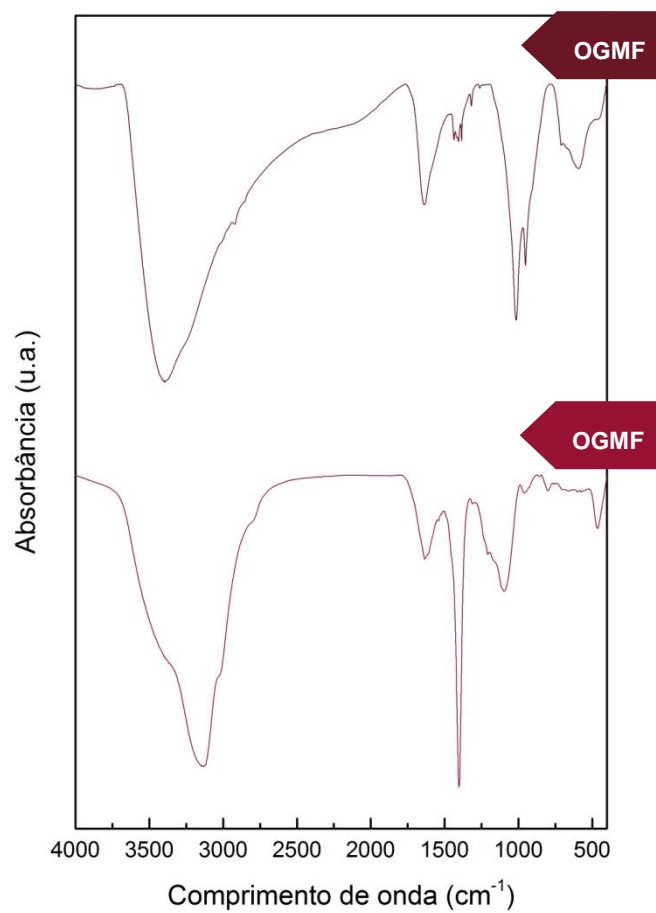
Fonte: Autor

O perfil do espectro UV-Vis obtido anteriormente na amostra OGMF permaneceu semelhante no OGMFV, com as bandas do óxido de grafeno e FMA presentes.^{48,54}

4.4.4 Espectroscopia na região do infravermelho

Para avaliar a presença do verteporfin na superfície do material empregou-se a técnica de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier e foram comparados os espectros da amostra OGMF e OGMFV. A Figura 41 ilustra os resultados adquiridos para ambas as amostras.

Figura 41 - Espectros na região do Infravermelho do OGMFV e OGMF.



Fonte: Autor

Tabela 8 - Atribuição das principais bandas de transmissão dos espectros na região do infravermelho do OGMF e OGMFV

Grupo	Atribuição	Bandas de absorção (cm ⁻¹)	Amostras
-OH (água)	v	3700-3000	OGMF, OGMFV
-C-H (Aromático)	V _{as}		
-C-H	V _s	~2920	OGMF, OGMFV
-C=N	v	~2130	OGMFV
-C=O (carbonil)	v	1800-1670	OGMF, OGMFV
-C-O (íon caboxilato)	V _{as}	1635	OGMF, OGMFV
-C=C (aromático)	v	~1590	OGMF, OGMFV
-C-O (íon caboxilato)	V _s	1404	OGMF, OGMFV
-C-O-C- (epóxi)	v	1352-1093	OGMF, OGMFV
-C-H(substituído aromático)	γ _s	900-730	OGMF, OGMFV
Fe-O	v	680-516	OGMF, OGMFV
-C-O-C	γ	~580	OGMF, OGMFV

v : estiramento; δ: deformação no plano; γ: deformação fora do plano; s: simétrica; as: assimétrica

Fonte: Socrates^[49]

Analisando a Figura 41, as bandas 3700-3000, 2920, 1800-1670, 1635,1590, 1404, 1352-1093, 900-730 e 680-516 cm⁻¹, são observadas em ambas as amostras, porém com diferenças nas intensidades. A diferença entre as amostras apareceu na banda em 2130 cm⁻¹ presente apenas na amostra OGMFV.

A partir da correlação da banda em 2130 cm^{-1} com Tabela 8, é possível notar a presença do estiramento C=N proveniente do verteporfin na amostra de OGMF, demonstrando sua funcionalização.

5 CONCLUSÕES

As rotas propostas, com base no estudo da literatura de métodos de síntese do óxido de grafeno, nanopartículas de óxido de ferro magnéticas, ancoragem de polímeros e transesterificação, possibilitaram a obtenção de nano estruturas de óxido de grafeno magnético fluorescente com fotossensibilizador.

O processo de síntese de Hummers modificado removendo NaNO_3 da reação se mostrou possível através dos perfis dos espectros de Raman e UV/Vis. Na região do infravermelho, a oxidação da amostra foi observada pela presença dos grupos carbonil, epóxi e hidroxil, evidenciados também nas curvas termogravimétricas. A interação entre os grupos funcionais pode ser observada na micrografia eletrônica de varredura através das rugas e dobras em sua superfície. Sua estrutura foi confirmada pelo difratograma de raios X com um pico próximo a 11° .

O método de coprecipitação para inserir as nanopartículas no óxido de grafeno também se mostrou satisfatória. Nas micrografias feitas por FEG-MEV, a presença de OGP juntamente com o Fe_3O_4 foi observada. Para confirmar esse dado, caracterizações por DRX, espectroscopia de IV mostraram perfis da presença do óxido de ferro magnético. Contudo, ainda através da técnica de IV, juntamente com os espectros Raman, OG foi identificado de acordo com as bandas atribuídas.

A funcionalização com a FMA no OGM, para formar o OGMF, foi observada pela detecção de fluorescência nas técnicas de UV/Vis e fluorimetria. Na técnica de IV apenas foi possível observar a presença do AA.

Ao final, por espectroscopia na região do IV pode-se verificar a funcionalização do OGMF com o verteporfin pela presença da banda de C-N em 2130 cm^{-1} .

A sequência de sínteses desenvolvidas neste trabalho possibilitou a obtenção de um material com potencialidade teranóstica multifuncional com propriedades advindas do óxido de grafeno magnético modificado para aplicações em TFT e TFD.

PERSPECTIVAS

A fim de aprimorar o trabalho tem-se como perspectiva realizar estudos de fotoluminescência, fotoaquecimento e formação de singletos e tripletos de oxigênio. Realizar ensaios para verificar a citotoxicidade dos produtos obtidos, além de testes in vitro e in vivo para validação dos sistemas obtidos.

REFERÊNCIAS

- 1 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasi. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf>. Acesso em: 19 out. 2014.
- 2 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report**: on noncommunicable diseases 2014. Geneva, c2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2016.
- 3 BRASIL. Ministério da Saúde. **SI/SUS sistema de informações ambulatoriais: oncologia: manual de bases técnicas**. 22. ed. Brasília, DF, 2016.
- 4 YUAN, A. et al. Application of near-infrared dyes for tumor imaging, photothermal, and photodynamic therapies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, p. 6-28, 2013.
- 5 TRIBUNAL DE CONTAS DA UNIÃO. **Política nacional de atenção oncológica**. Brasília, 2011. (Relatório de auditoria operacional). Disponível em: <<http://www.sbradioterapia.com.br/pdfs/relatorio-tribuna-contas-uniao.pdf>> Acesso em: 13 dez. 2016.
- 6 HUANG, P. et al. Folic acid-conjugated graphene oxide loaded with photosensitizers for targeting photodynamic therapy. **Theranostics**, v. 1, p. 240-250, 2011.
- 7 SHIBUA, E. S. et al. Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 15, p. 53-72, 2013.
- 8 GAO, L. et al. Hypocrellin-loaded gold nanocages with high two-photon efficiency for photothermal/photodynamic cancer therapy in vitro. **ACS Nano**, v. 6, p. 8030-8040, 2012.
- 9 MacDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, p. 105-129, 2001.
- 10 SHAO, G. et al. Graphene oxide: the mechanisms of oxidation and exfoliation. **Journal of Materials Science**, v. 47, p. 4400-4409, 2012.
- 11 WISSLE, M. Graphite and carbon powders for electrochemical applications. **Journal of Power Sources**, v. 156, p. 142-150, 2006.

12 BRODIE, B. C. On the atomic weight of graphite. **Philosophical Transactions**, v. 149, p. 249-259, 1859.

13 STAUDENMAIER, L. Verfahren zur darstellung der graphitsäure. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v. 31, p. 1481-1487, 1898.

14 HUMMERS, W. S. Jr.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 1339, 1958.

15 AKHAVAN, O.; GHADERI, E. Graphene nanomesh promises extremely efficient in vivo photothermal therapy. **Nano Micro Small Journal**, v. 9, n. 21, p. 3593-3601, 2013.

16 PANKHURST, Q. A. et al. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, p. 1-15, 2009.

17 PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. 167-181, 2003.

18 YANG, J. et al. Preparation of polycaprolactone nanoparticles containing magnetite for magnetic drug carrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, p. 185-190, 2006.

19 GUPTA; R. B.; KOMPELLA, U. B. **Nanoparticle technology for drug delivery**. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 416 p.

20 LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHUTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, p. 1222-1244, 2007.

21 BLACKWELL, W. **Fluorescence microscopy: from principles to biological applications**. Bonn: Ulrich Kubitscheck, 2013. 539 p.

22 GONÇALVES, M. S. T. Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 190-212, 2009.

23 GOVINDAIAH, P. et al. Synthesis and characterization of multifunctional Fe₃O₄/poly(fluorescein O-methacrylate) core/shell nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 379, p. 27-32, 2012.

24 DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233/234, p. 351-371, 2002.

25 JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. **Metal-Based Drugs**, 2008. doi:10.155/2008/276109.

26 SLIWINSKA, P. N. et al. Verteporfin, photofrin II, and merocyanine 540 as PDT photosensitizers against melanoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 349, p. 549-555, 2006.

27 BUSETTI, A. et al. High efficiency of benzoporphyrin derivative in the photodynamic therapy of pigmented malignant melanoma. **British Journal of Cancer** , v. 79, p. 821-824, 1999.

28 GOLLAVELLI, G.; LING, Y. C. Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe. **Biomaterials** , v. 33, p. 2532-2545, 2012.

29 XUE, Y. et al. Oxidizing metal ions with graphene oxide: the in situ formation of magnetic nanoparticles on self-reduced graphene sheets for multifunctional applications. **Chemical Communications** , v. 47, p. 11689-11691, 2011.

30 POHL, K.; RODRIGUES, F. Adiabatic polymerization of acrylamide using a persulfate-bisulfite redox couple. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 26, p. 611-618, 1981.

31 SHEN, B. et al. Chemical functionalization of graphene oxide toward the tailoring of the interface in polymer composites. **Composites Science and Technology**, v. 77 , p. 87-94, 2013.

32 BRUICE, P. Y. **Química orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson, 2006. v. 2, 704 p.

33 MITTAL, V. Functional polymer nanocomposites with graphene: a review. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 299, p. 906-931, 2014.

34 LAURENT, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2064-2110, 2007.

35 BOKIAS, G.; DURAND, A.; HOURDET, D. Molar mass control of poly(N-isopropylacrylamide) and poly(acrylic acid) in aqueous polymerizations initiated by redox initiators based on persulfates. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 199, p. 1387-1392, 1998.

36 WARREN, B. E. **X-ray diffraction**. London: Addison-Wesley, 1969. v. 1, 381 p.

37 STANKOVICH, S. et al. Synthesis and exfoliation of isocyanate-treated graphene oxide nanoplatelets. **Carbon** , v. 44, p. 3342-3347, 2006.

38 CHEN, J. et al. High-yield preparation of graphene oxide from small graphite flakes via an improved Hummers method with a simple purification process. **Carbon**, v. 81 , p. 826-834, 2015.

39 CHEN, J. et al. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. **Carbon**, v. 64, p. 225-229, 2013.

40 ROBERT, F. S. **Thermal analysis of materials**. New York: Marcel Dekker, 1994. 298 p.

41 LEE, S. et al. Graphene oxide/poly(acrylic acid) hydrogel by γ -ray pre-irradiation on graphene oxide surface. **Macromolecular Research**, v. 22, p. 165-172, 2014.

42 HOSSEINZADEH, H.; RAMIN, S. Magnetic and pH-responsive starch-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide)/graphene oxide superabsorbent nanocomposites: one-pot synthesis, characterization, and swelling behavior. **Starch**, v. 68, p. 200-212, 2016.

43 GENG, Y.; WANG, S. J.; KIM, J. K. Preparation of graphite nanoplatelets and graphene sheets. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 336, p. 592-598, 2009.

44 DU, Q. et al. Preparation of functionalized graphene sheets by a low-temperature thermal. **Electrochimica Acta**, v. 55, p. 3897-3903, 2010.

45 KONKENA, B.; VASUDEVAN, S. Understanding aqueous dispersibility of graphene oxide and reduced graphene oxide through pKa measurements. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 3, p. 867-872, 2012.

46 COTE, L. J.; SILVA, R. C.; HUANG, J. Flash reduction and patterning of graphite oxide and its polymer composite. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, p. 11027-11032, 2009.

47 SHEN, J. et al. One step synthesis of graphene oxide-magnetic nanoparticle composite. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, p. 1498-1503, 2010.

48 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principle of instrumental analysis**. 5th ed. Philadelphia: Hartcourt Brace & Compancy, 1997. 849 p.

49 SOCRATES, G. **Infrared characteristic group frequencies: tables and charts**. 3rd ed. New York: Wiley, 2004. 366 p.

50 ZUBIR, N. A. et al. Structural and functional investigation of graphene oxide-Fe₃O₄ nanocomposites for the heterogeneous Fenton-like reaction. **Scientific Reports**, v. 4, 2014. doi:10.1038/srep04594.

51 WU, H. et al. Control on the formation of Fe₃O₄ nanoparticles on chemically reduced graphene oxide surfaces. **CrystEngComm**, v. 14, p. 499-504, 2012.

52 DENG, J. H.; ZHANG, X. R.; ZENG, G. M. Simultaneous removal of Cd(II) and ionic dyes from aqueous solution using magnetic graphene oxide nanocomposite as an adsorbent. **Chemical Engineering Journal**, v. 226, p. 189-200, 2013.

53 ZHANG, J. et al. Poly(acrylic acid) functionalized magnetic graphene oxide nanocomposite for removal of methylene blue. **RSC Advances**, v. 5, p. 32272-32282, 2015.

54 GOVINDAIAH, P. et al. Synthesis and characterization of multifunctional Fe₃O₄/poly(fluorescein O-methacrylate) core/shell nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 379, p. 27-32, 2012.

55 HUANG, C. et al. A graphene oxide/hemoglobin composite hydrogel for enzymatic catalysis in organic solvents. **Chemical Communications**, v. 47, p. 4962-4964, 2011.

56 WAN, S. et al. Nacre-inspired integrated strong and tough reduced graphene oxide–poly(acrylic acid) nanocomposites. **Nanoscale**, v. 8, p. 5649-5656, 2016.

57 HA, H.; SHANMUGANATHAN, K.; ELLISON, C. J. Mechanically stable thermally crosslinked poly(acrylic acid)/reduced graphene oxide aerogels. **Applied Materials & Interfaces**, v. 7, p. 6220-6229, 2015.