



# Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

**Interação de ftalocianinas de zinco com óxido de grafeno: estudo das  
propriedades fotoquímicas**

Fellipy Samuel Rocha

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília – DF

Janeiro – 2018



# Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

**Interação de ftalocianinas de zinco com óxido de grafeno: estudo das  
propriedades fotoquímicas**

Fellipy Samuel Rocha

Orientadora: Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília – DF

Janeiro – 2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho. Aos membros do Laboratório de Fotoquímica e Nanobiotecnologia, que sempre estiveram dispostos a colaborar quando necessário.

Agradeço aos meus orientadores, profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes e ao Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e a atenção fornecida durante o desenvolvimento.

Gostaria de agradecer especialmente, à minha família pelo apoio, pois sem eles a execução deste trabalho se tornaria mais árdua.

Agradeço aos membros da banca, por aceitarem o convite e proporcionar sua colaboração ao trabalho.

Por fim, agradeço aos órgãos de fomento (FAPDF, CAPES e CNPq), pelo auxílio financeiro prestado para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

O óxido de grafeno (GO) é um nanomaterial promissor para ser empregado como sistema de entrega de fármacos hidrofóbicos devido a sua superfície planar em duas dimensões, e as ftalocianinas também apresentam estruturas planares, e são ótimas candidatas para a utilização em terapia fotodinâmica. A conjugação não covalente entre estes compostos pode levar a formação de um nanossistema eficaz no tratamento do câncer. Neste trabalho, buscamos elucidar a interação da ftalocianina de zinco (ZnPc) e sua forma tetra substituída (ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>) com o óxido de grafeno. As ftalocianinas apresentam fluorescência, mas interações de Van Der Waals  $\pi - \pi$  fortes com o GO proporcionam supressão deste fenômeno, conseqüentemente sendo um indicativo de ligação. A eficácia da interação de GO com a ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> foi claramente demonstrada, enquanto a interação com a ZnPc é mais difícil de ser interpretada. Estudos aplicando os modelos matemáticos de Stern-Volmer e Hill foram realizados com os dados de fluorescência das ftalocianinas para tentar elucidar o processo de formação do nanossistema. A capacidade dos fluoróforos de produzirem espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada empregando o método indireto de análise do consumo de 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) causado pela formação de ROS, através da excitação das ftalocianinas com laser. A presença do GO proporcionou um aumento no rendimento quântico de oxigênio singlete para ambas as ftalocianinas.

**Palavras-chave:** Óxido de grafeno, ftalocianinas de zinco, fluorescência, fotoquímica, supressão, rendimento quântico de oxigênio singlete.

## ABSTRACT

Graphene oxide (GO) is a promising nanomaterial to be employed as a hydrophobic drug delivery system due to the two dimension planar surface, phthalocyanines also presents planar surface, and are great candidates for Photodynamic Therapy. Non-covalently conjugation of those compounds may lead to the formation of a nanosystem effective in the cancer treatment. At this work, we aim to clarify the interaction of zinc phthalocyanine and its tetra substituted form ( $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$ ) with graphene oxide. Phthalocyanines presents fluorescence, but strong  $\pi - \pi$  Van Der Waals interactions with GO suppress the fluorescence, consequently being evidence of a bond formation. The efficacy of the interaction of GO with  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  has been clearly demonstrated, while the interaction with ZnPC is harder to interpret. Studies applying mathematical model of Stern-Volmer and Hill were performed with the fluorescence data to try to elucidate the formation process of the nanosystem. The fluorophore capacity to yield reactive oxygen species (ROS) were evaluated applying an indirect analysis method quantifying the 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) consume caused by ROS formation induced by phthalocyanines laser excitation. GO presence enhanced singlet oxygen quantum yield for both phthalocyanines.

**Keywords:** Graphene oxide, zinc phthalocyanines, fluorescence, photochemistry, quenching, singlet oxygen quantum yield.

# Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>1.1. Grafeno</b> .....	1
<b>1.2. Ftalocianinas</b> .....	4
<b>1.3. Formação de Agregados</b> .....	6
<b>1.4. Supressão de Emissão de Fluorescência Provocado por GO</b> .....	8
<b>1.5. Funcionalização</b> .....	10
<b>1.6. Técnicas Espectroscópicas de UV-vis e Fluorescência</b> .....	13
<b>1.7. Oxigênio Singlete</b> .....	18
<b>1.8. Geração de Oxigênio Singlete</b> .....	20
<b>1.8.1. Mecanismo do Tipo I</b> .....	21
<b>1.8.2. Mecanismo do Tipo II</b> .....	21
<b>1.9. Detecção da Formação de Oxigênio Singlete por Fotossensibilização</b> .....	22
<b>2. Jutificativa</b> .....	23
<b>3. Objetivos</b> .....	24
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	25
<b>4.1. Síntese</b> .....	26
<b>4.2. Preparo de Soluções</b> .....	27
<b>4.2.1. Solução de Óxido de Grafeno</b> .....	27
<b>4.2.2. Solução de ZnPc e ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub></b> .....	27
<b>4.3. Análises Espectroscópicas de UV-vis e Fluorescência</b> .....	28
<b>4.3.1. Tratamento dos Dados Espectroscópicos</b> .....	28

4.3.2. Análises de Supressão de Fluorescência .....	29
4.3.3. Rendimento Quântico de Oxigênio Singlete .....	30
5. Resultados e Discussão .....	31
5.1. Estabilidade com o Tempo das Soluções de Ftalocianinas Livres .....	33
5.2. Resposta de Absorbância (UV-vis) Decorrente da Adição de GO.....	39
5.3. Resposta de Fluorescência Decorrente da Adição de GO .....	43
5.4. Modelo Matemático de Stern-Volmer .....	47
5.5. Modelo Matemático de Hill.....	50
5.6. Produção de Oxigênio Singlete .....	52
6. Conclusão .....	62
7. Referências bibliográficas .....	63

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química do grafeno e derivados. (a) Grafeno; (b) óxido de grafeno reduzido (rGO); (c) óxido de grafeno (GO). Fonte: SUVARNAPHAET, P. e PECHPRASARN, S. **Sensors**, 2017..... 3
- Figura 2.** Estrutura química básica de derivados de ftalocianinas e algumas de suas aplicações. Fonte: SAKAMOTO, K. e OHNO-OKUMURA, E. **Materials**, 2009. .... 6
- Figura 3.** Interação do óxido de grafeno com corantes orgânico vermelho ácido 1 (acima) e azul de metileno (abaixo). Interações  $\pi - \pi$  são predominantes, podendo ocorrer ligação de hidrogênio e interação eletrostática. As interações são representadas pela formação de agregados do tipo H e J. Fonte: PÉREZ-RAMÍRES, *et al.* **Semiconductor Photocatalysis – Materials, Mechanisms and Applications**, 2016. PEYRATOUT e DAEHNE. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2002. .... 7
- Figura 4.** Esquema típico de funcionamento de um espectrofotômetro de UV-vis de duplo feixe. É mostrado o caminho percorrido pela luz desde a fonte luminosa até os fotodetectores. .... 14
- Figura 5.** Representação típica do resultado da análise de amostras por técnicas espectroscópicas de UV-vis e fluorescência; exibindo o  $\lambda_{\max}$  (comprimento de onda no ponto de intensidade máxima) como ponto de interesse; os efeitos de aumento e decréscimo de intensidade; e os deslocamentos laterais do  $\lambda_{\max}$ ..... 15
- Figura 6.** Diagrama de Jablonski;  $h\nu$  representa a energia eletromagnética absorvida,  $S_0$  o estado singlete fundamental,  $S_1$  o primeiro estado singlete excitado,  $S_n$  os diferentes estados singlete excitado,  $T_n$  os diferentes estados triplete excitado,  $T_1$  o primeiro estado triplete excitado, CI conversão interna, CIS cruzamento intersistemas,  $K_f$  emissão de fluorescência,  $K_p$  emissão de fosforescência. A seta roxa representa a interação de elétron no estado triplete excitado com o oxigênio molecular produzindo ROS. Fonte: LUNARDI, C. N. **Tese Doutorado**, 2004. .... 16



<b>Figura 7.</b> Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares ( $\pi^*$ ) dos estados singlete fundamental e excitado e do estado triplete fundamental. ....	19
<b>Figura 8.</b> Estrutura química da tetranitro ftalocianina de zinco. Fonte: LUNARDI, ROTTA e TEDESCO, <i>Journal of Porphyrins and Phthalocyanines</i> , 2003 // LUNARDI, C. N. Tese Doutorado, 2004. ....	26
<b>Figura 9.</b> Espectro de absorvância de ZnPc livre (10 $\mu$ M) e a estabilidade da amostra. Linha em preto representa a solução recém diluída e em vermelho após esperar 5 horas. (a) Acetona (330 – 725 nm); (b) MeCN (285 – 725 nm); (c) DMF (290 – 725 nm). ....	34
<b>Figura 10.</b> Espectro de absorvância de ZnPc(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> livre (10 $\mu$ M) e sua estabilidade. Linha em preto representa a solução recém diluída e em vermelho após esperar 5 horas. (a) Acetona (330 – 800 nm); (b) MeCN (285 – 800 nm); (c) DMF (290 – 800 nm). ....	35
<b>Figura 11.</b> Espectro de fluorescência de ZnPc livre (10 $\mu$ M) e a estabilidade da amostra ( $\lambda_{ex}$ = 670 nm). Linha em preto representa a solução recém diluída e em vermelho após esperar 5 horas. (a) Acetona (670 – 710 nm); (b) MeCN (670 – 710 nm); (c) DMF (675 – 715 nm). ....	37
<b>Figura 12.</b> Espectro de fluorescência de ZnPc(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> livre (10 $\mu$ M) e a estabilidade da amostra ( $\lambda_{ex}$ = 685 nm). Linha em preto representa a solução recém diluída e em vermelho após esperar 5 horas. (a) Acetona (685 – 745 nm); (b) MeCN (685 – 745 nm); (c) DMF (690 – 745 nm). ....	38
<b>Figura 13.</b> Espectro de absorvância normalizado (UV-vis) da solução de ZnPc (10 $\mu$ M) com adições consecutivas de GO, variando sua concentração no sistema. (a) Acetona (330 – 725 nm); (b) MeCN (285 – 725 nm); (c) DMF (290 – 725 nm). ....	40
<b>Figura 14.</b> Espectro de absorvância normalizado (UV-vis) da solução de ZnPc(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> (10 $\mu$ M) com adições consecutivas de GO, variando sua concentração no sistema. (a) Acetona (330 – 800 nm); (b) MeCN (285 – 800 nm); (c) DMF (290 – 800 nm). ....	42

**Figura 15.** Espectro de fluorescência normalizado da solução de ZnPc (10  $\mu$ M) com adições consecutivas de GO, variando sua concentração no sistema ( $\lambda_{ex}$  = 670 nm). (a) Acetona (670 – 720 nm); (b) MeCN (675 – 720 nm); (c) DMF (675 – 720 nm). ..... 44

**Figura 16.** Espectro de fluorescência normalizado da solução de ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> (10  $\mu$ M) com adições consecutivas de GO, variando sua concentração no sistema ( $\lambda_{ex}$  = 685 nm). (a) Acetona (685 – 750 nm); (b) MeCN (690 – 750 nm); (c) DMF (690 – 750 nm)..... 46

**Figura 17.** Gráfico de Stern-Volmer da eficiência de supressão de fluorescência das ftalocianinas; (a) ZnPc ( $\lambda_{ex}$  = 670 nm); (b) ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> ( $\lambda_{ex}$  = 685 nm)..... 49

**Figura 18.** Propriedades da supressão de fluorescência das ftalocianinas em GO. Ligação específica da análise de Hill em ZnPc e ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>. Relação da saturação de ligação Q (eixo y), com a concentração de GO (eixo x). ..... 50

**Figura 19.** Perfil da fotodegradação de DPBF (417 nm) pela irradiação de laser vermelho (637 nm) na presença de ZnPc livre e interagindo com GO; (a) ZnPc livre em DMF; (b) ZnPc livre em MeCN; (c) ZnPc + GO em DMF; (d) ZnPc + GO em MeCN..... 54

**Figura 20.** Perfil da fotodegradação de DPBF (417 nm) pela irradiação de laser vermelho (637 nm) na presença de ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> livre e interagindo com GO; (a) ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> livre em DMF; (b) ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> livre em MeCN; (c) ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> + GO em DMF; (d) ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> + GO em MeCN. .... 56

**Figura 21.** Perfil da cinética de primeira ordem da fotodegradação de DPBF (417 nm); (a) ZnPc em DMF; (b) ZnPc em MeCN; (c) ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> em DMF; (d) ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> em MeCN..... 59

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Constante de fotodegradação do DPBF ( $K_{DPBF}$ ) monitorada em 417 nm e o rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ) calculado com base na $K_{DPBF}$ para as soluções de ZnPc e ZnPc(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> , livres e na presença de GO, irradiadas por laser de diodo no comprimento de onda de 637 nm. ....	60
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**CI**, Conversão Interna;

**CIS**, Cruzamento Intersistemas;

**DBU**, 1,8- diazabicyclo [5,4,0]undec-7-ene;

**DMSO**, Dimetilsufóxido;

**DPBF**, 1,3-Difenilisobenzofurano;

**GO**, Óxido de Grafeno;

**HOMO**, *Highest Occupied Molecular Orbital*;

**K<sub>f</sub>**, Fluorescência;

**K<sub>p</sub>**, Fosforescência;

**LUMO**, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*;

**MeCN**, Acetonitrila;

**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>**, Oxigênio Singlete;

**<sup>3</sup>O<sub>2</sub>**, Oxigênio Triplete Molecular;

**Pc**, Ftalocianina;

**rGO**, Óxido de Grafeno Reduzido;

**ROS**, Espécies Reativas de Oxigênio;

**TEF**, Transferência de Elétrons Fotoinduzida;

**TE**, Transferência de Energia;

**TFD**, Terapia Fotodinâmica;

**TFT**, Terapia Fototérmica;

**ZnPc**, Ftalocianina de Zinco;

**ZNPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>**, Tetranitro Ftalocianina de Zinco;

**Φ<sub>Δ</sub>**, Rendimento Quântico de Geração de Oxigênio *Singlet*;

**Φ<sub>CI</sub>**, Rendimento Quântico de Conversão Interna;

**Φ<sub>CIS</sub>**, Rendimento Quântico de Cruzamento Intersistemas;

# 1. Introdução

## 1.1. Grafeno

Nanomateriais a base de carbono como nanotubos e grafeno têm atraído atenção científica significativa nas últimas décadas devido suas propriedades estruturais e mecânicas possibilitando uma vasta gama de aplicações. (WAN *et al.*, 2015). Grafeno é composto por folhas em duas dimensões, planares, com espessura de um átomo, formadas por carbonos ligados em hibridização  $sp^2$ , com retículo cristalino arranjado em forma hexagonal e podem apresentar empilhamento destas folhas devido a interações de Van Der Walls  $\pi$ - $\pi$  fortes (WANG, A. *et al.*, 2016).

O grafeno em sua forma pura não é muito utilizado em aplicações biológicas, uma vez que as interações do grafeno nesta forma resultam em uma grande tendência de aglomeração devido as fortes interações  $\pi$ - $\pi$ , que pode alterar as propriedades do material (KUILLA, *et al.*, 2010). Muito esforço vem sendo empregado para melhorar a dispersão e a compatibilidade do grafeno com o intuito de obter novos derivados de grafeno para aplicações específicas (JANG, *et al.*, 2011; YE, *et al.*, 2012; FANG, *et al.*, 2013). Assim, o óxido de grafeno (GO) é um análogo funcional de grafeno importante para aplicações, pois é possível moldar as propriedades ópticas, elétricas e químicas do GO com base no seu nível de oxidação, o qual controla a presença de nanoilhas de grafeno puro, isoladas por carbonos em hibridização  $sp^3$  em sua matriz, devido a presença da oxidação (WANG, Z. *et al.*, 2015).

GO apresenta muitos grupamentos funcionais, tais como: hidroxilas, carboxilas, carbonilas e grupos epóxi. Os estudos teóricos e espectroscópicos da estrutura química do GO indicam que as carboxilas e carbonilas estão localizadas nas bordas, enquanto os grupamentos epóxi e hidroxilas existem majoritariamente no plano basal das folhas (DREYER, *et al.*, 2010). Os grupamentos funcionais do GO fornecem excelente

solubilidade em água e possibilitam fácil modificação das folhas de GO (PARK, *et al.*, 2009). Óxido de grafeno é um sistema conjugado que propicia uma plataforma apropriada para interações de moléculas orgânicas, inorgânicas e biomoléculas através de interação  $\pi$ - $\pi$  e eletrostáticas (BOZKURT, *et al.*, 2014).

As propriedades térmicas de infravermelho do GO o tornam por si só atrativo como agente terapêutico para o combate ao câncer, através da terapia fototérmica (TFT). Além disto, muitos fármacos e nanomateriais podem ser atrelados as folhas de GO devido a presença dos grupamentos funcionais, assim o GO está sendo utilizado com frequência como sistema de entrega de fármacos recentemente. A biocompatibilidade do GO foi reportada por diversos grupos de pesquisa (LIU, *et al.*, 2008). Entretanto, estudos recentes demonstram que a toxicidade do óxido de grafeno é dependente de sua concentração, do grau de agregação e do modo de interação com as células (KUNDU, *et al.*, 2015).

A superfície planar em duas dimensões característica do grafeno é o que lhe confere uma alta capacidade de carregamento de fármacos, melhor do que outros sistemas de entrega de fármacos (MCALLISTER, *et al.*, 2007) O que faz o GO ser mais atrativo do que outras espécies de grafeno, como o óxido de grafeno reduzido (rGO) ou o grafeno puro, é justamente a presença dos grupamentos funcionais (Figura 1), que podem ser facilmente modificados e permitir sua exploração para aumentar a biocompatibilidade do GO ou atracar marcadores de alvos específicos. Além de ser claramente mais adequado para utilização em meio aquoso e conseqüentemente em possíveis abordagens *in vivo* (BOZKURT, *et al.*, 2014).



Figura 1. Estrutura química do grafeno e derivados. (a) Grafeno; (b) óxido de grafeno reduzido (rGO); (c) óxido de grafeno (GO). Fonte: SUVARNAPHAET, P. e PECHPRASARN, S. **Sensors**, 2017.

Apesar do GO e o rGO estarem sendo vastamente estudados como sistema de entrega de fármacos anticâncer, as diferenças em suas propriedades físico-químicas podem afetar os padrões de interação e a capacidade de carregamento de fármacos. O rGO que é uma forma reduzida de GO apresenta uma menor quantidade de grupamentos funcionais e por consequência é mais hidrofóbico. Deste modo, as interações hidrofóbicas e o empilhamento  $\pi$  - $\pi$  são mais dominantes para o rGO, uma vez que o GO apresenta uma maior quantidade de grupamento oxigenados permitindo interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Assim, o rGO é mais hidrofóbico que o GO, mas é menos do que o grafeno puro (ZHANG, WANG e ZHAI, 2016).

Nanofolhas de grafeno, com tamanho lateral em nano escala, estão sendo bastante exploradas como nanocarreadores para uma grande variedade de fármacos, incluídos fármacos químicos e biológicos. Desta forma, as nanofolhas de grafeno são vistas como um potencial nanocarreador de quimioterápicos insolúveis para o tratamento de câncer. Até mesmo pequenas biomoléculas como: proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos podem ser entregues utilizando GO, rGO e nanofolhas de grafeno. Apesar dos ácidos nucleicos serem macromoléculas bastante hidrofílicas é reportado que eles interagem

através de interações de empilhamento  $\pi - \pi$  entre o anel estrutural da base nitrogenada e a porção basal do GO (SHIM, *et al.*, 2016).

A introdução de moléculas orgânicas  $\pi$ -conjugadas como porfirinas, ftalocianinas e outras moléculas aromáticas a folhas de GO pode incrementar a performance de seu limite óptico e aumentar suas propriedades ópticas não lineares (NLO). (WANG, Z. *et al.*, 2015). Por exemplo, corantes cationicamente carregados podem se adsorverem fisicamente em folhas de GO e nanopartículas de óxido de ferro podem ser facilmente imobilizadas na sua superfície (SINOFOROGLU, *et al.*, 2013; METIN, AYDOGAN e MERAL, 2014). Como resultado, compósitos entre corantes e GO são facilmente produzidos para serem utilizados por diferentes propósitos, uma vez que o campo atrativo presente na folha de GO resulta na adsorção de corantes catiônicos (SINOFOROGLU, *et al.*, 2013).

Alguns autores propuseram uma nanoplataforma de grafeno carregado de ftalocianina como uma forma de nanossistema teranóstico. Esta técnica visa a combinação da fototerapia devido as propriedades de produção de calor do grafeno sob efeito de irradiação próxima ao infravermelho e a terapia fotodinâmica (TFD) pela produção de espécie reativa de oxigênio característica das ftalocianinas. A combinação destas técnicas resultou em um aumento na eficácia de mortalidade de células cancerígenas de ovário em 90% (CHEN, *et al.*, 2016).

## **1.2. Ftalocianinas**

Ftalocianinas são estruturas aromáticas bidimensionais, constituídas de quatro subunidades isoindol ligadas através de átomos de nitrogênio. Apresentam flexibilidade química, permitindo a modulação de suas propriedades físicas, ópticas e eletrônicas. Sua deslocalização eletrônica é responsável por inúmeras propriedades, tornando-as valiosas para aplicação em diversos campos da ciência e tecnologia (LUNARDI e TEDESCO 2005; CLAESSENS, HAHN e TORRES, 2008). Ftalocianinas estão sendo



extensivamente estudadas como sensores, células solares, transistores, dispositivos emissores de luz, fotocatalise e como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica, dentre outros, como pode ser visualizado na Figura 2 (GUREL, *et al.*, 2015).

Metalofalocianinas são complexos de metais de transição que exibem várias propriedades características, incluindo uma intensa e ampla resposta no comprimento de onda visível. Sua fotoatividade se origina da extinção do oxigênio triplete excitado formando oxigênio *singlet* (WAN, *et al.*, 2015). Zinco, alumínio e silício podem ser usados como metais diamagnéticos, apresentando propriedades fluorescentes eficientes para várias aplicações. Além disso, metalofalocianinas apresentam alta estabilidade termal, boa estabilidade molecular (POP e ION, 2010) e toxicidade negligenciável (JOSEFSEN e BOYLE, 2008). A conjugação de ftalocianinas com materiais em nano escala pode aumentar seu rendimento na produção de oxigênio *singlet* (WIEDER, *et al.*, 2006).

Complexos de ftalocianina de zinco(II) (ZnPc), estão sendo estudados intensivamente por virtude de suas propriedades fotossensibilizadoras, apresentando alta fluorescência (MARTIN, *et al.*, 1991; TABATA, *et al.*, 2000). Além disso, os grupos químicos periféricos de ftalocianinas de zinco podem ser seletivamente preferíveis para interagir com alguns tipos de células cancerígenas. As ftalocianinas com essas estruturas são chamadas de fotossensibilizadores de terceira geração (OGUNSIPE, MAREE e NYOKONG, 2003). Ftalocianinas funcionais podem apresentar características diferenciadas, assim como as tetra substituídas que são preferíveis para o uso biológico ao considerar sua capacidade de funcionalização, solubilidade e estabilidade.

Atualmente, ainda são poucos os estudos sobre a interação molecular de GO e ftalocianinas (Pc). A natureza, especificidade e mecanismos desta interação ainda precisam ser elucidados. Deste modo, a investigação desta interação em diferentes

soluções e concentrações pode revelar a acessibilidade da Pc no GO, ajudando a explicar os mecanismos de ligação, revelando dicas sobre a natureza do fenômeno.

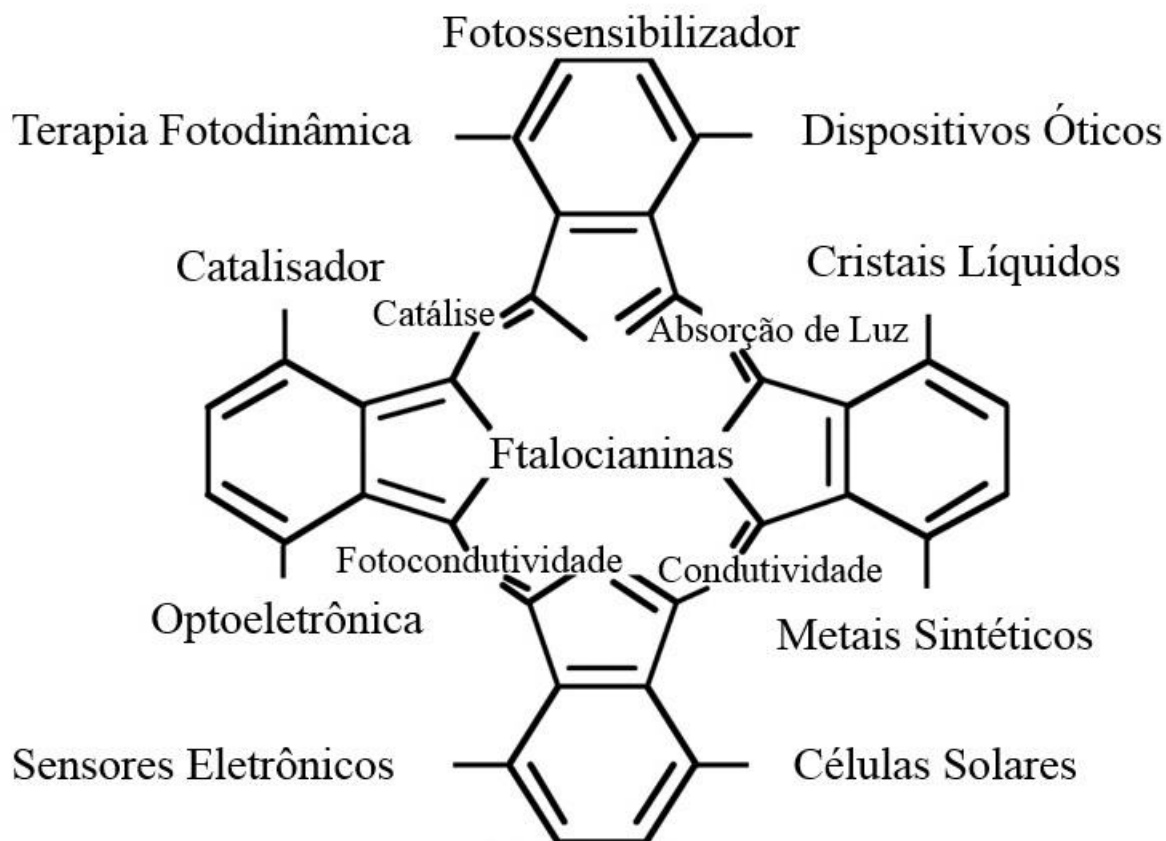


Figura 2. Estrutura química básica de derivados de ftalocianinas e algumas de suas aplicações. Fonte: SAKAMOTO, K. e OHNO-OKUMURA, E. **Materials**, 2009.

### 1.3. Formação de Agregados

Dependendo do tipo de associação intermolecular dos monômeros, as estruturas e propriedades ópticas dos agregados são classificados em dois grandes grupos nomeados como tipo-H (arranjo cara-cara) e tipo-J (arranjo cabeça-calda). A simples utilização da técnica de espectroscopia de absorção em UV-vis é possível caracterizar o tipo de interação presente ao se ligarem ao GO (HANSDA, *et al.*, 2016). A Figura 3 representa a interação de moléculas planares com derivados de grafeno.

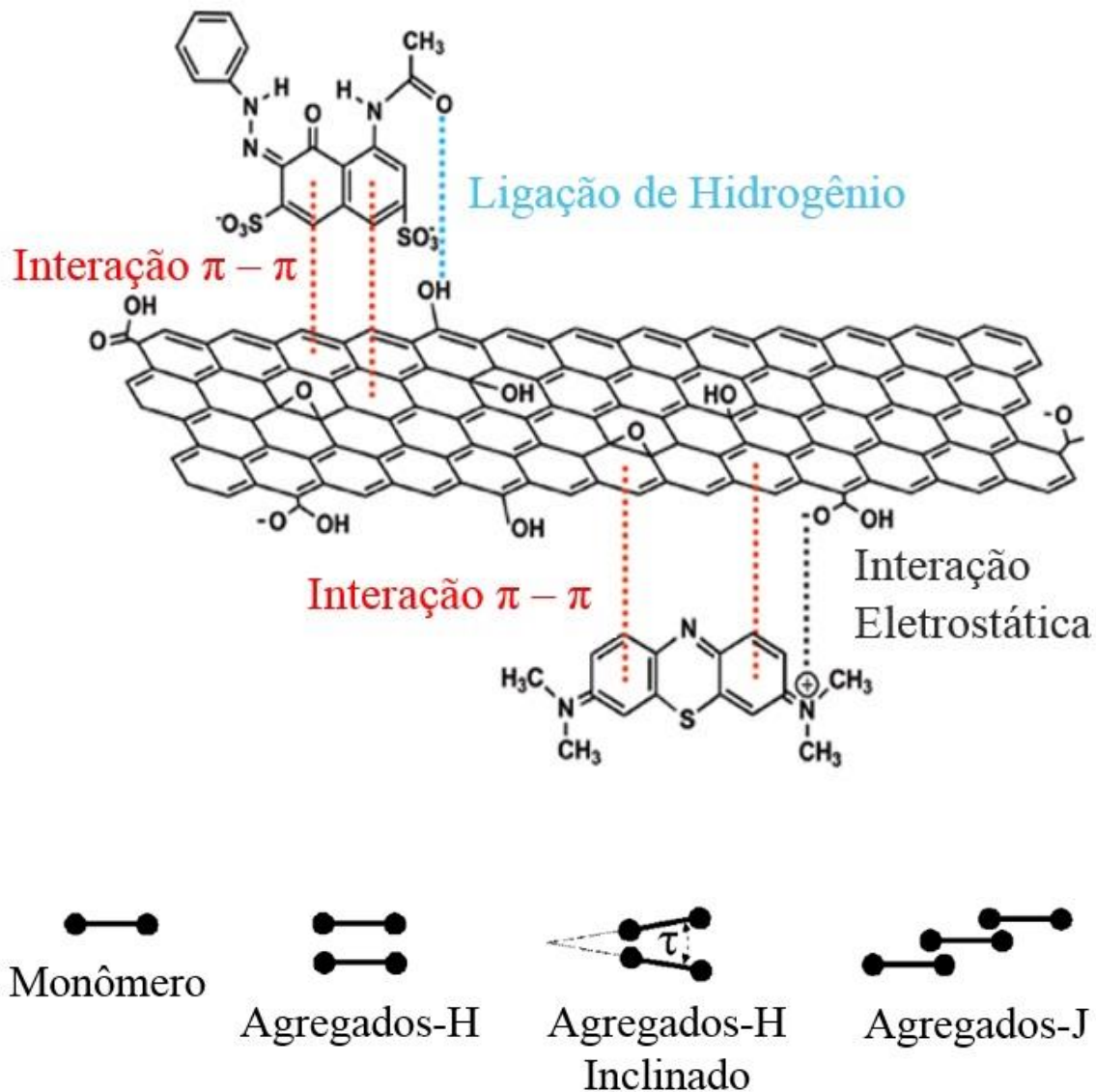


Figura 3. Interação do óxido de grafeno com corantes orgânico vermelho ácido 1 (acima) e azul de metileno (abaixo). Interações  $\pi - \pi$  são predominantes, podendo ocorrer ligação de hidrogênio e interação eletrostática. As interações são representadas pela formação de agregados do tipo H e J. Fonte: PÉREZ-RAMÍRES, *et al.* **Semiconductor Photocatalysis – Materials, Mechanisms and Applications**, 2016. PEYRATOUT e DAEHNE. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2002.

Os agregados do tipo J geralmente mostram um deslocamento para comprimentos de ondas mais longos em relação ao perfil do seu monômero. Estes agregados demonstram bandas de absorção bem definidas e estreitas, cuja as posições são

facilmente previstas teoricamente ignorando vibrações intramoleculares. Em contraste, os agregados do tipo H geralmente demonstram deslocamento para comprimentos de onda mais curtos, apresentando um deslocamento de banda com uma estrutura vibracional rica e larga.

Quando o deslocamento ocorre para comprimento de onda mais energéticos, os agregados absorvem luz em uma região a qual o próprio monômero deve absorver, causando interferência. Algumas substâncias, exibem tanto agregação do tipo J quanto agregação do tipo H, exibindo uma estrutura vibracional complicada. Entretanto, apesar de existirem vários estudos sobre os casos mais simples de formação de J-agregados, ainda existem muito pouco estudo sobre a formação dos H-agregados (EISFELD e BRIGGS, 2006).

#### **1.4. Supressão de Emissão de Fluorescência Provocado por GO**

A perda de fluorescência de um fluoróforo pela interação com um supressor é denominado de supressão de emissão de fluorescência. O processo de supressão de emissão de fluorescência requer contato molecular entre o fluoróforo e o supressor. Para explicar o processo de supressão de emissão de fluorescência, dois mecanismos são tidos como os principais, os processos de supressão de emissão dinâmico e estático. O mecanismo que descreve essa supressão de fluorescência é descrito pela equação de Stern-Volmer (SV) (BOZKURT, et al., 2012). A determinação do tempo de vida de fluorescência do fluoróforo é o melhor método de distinguir entre o processo de supressão de emissão estático ou dinâmico. Quando o tempo de vida do fluoróforo excitado permanece o mesmo o fenômeno característico é o de supressão de emissão estático, se o tempo de vida diminui é característica da supressão de emissão dinâmica (HANSDA, et al., 2016).

O efeito de supressão de emissão da fluorescência indica o processo o qual a intensidade da fluorescência de um corante fluorescente diminui. Controlando a

interação entre o corante e o GO é possível ajustar a intensidade de fluorescência do corante. Devido a este fenômeno, o compósito GO-corante tem sido utilizado para a detecção seletiva de biomoléculas. Conseqüentemente, é importante dizer que o compósito GO-corante, pode ser preparado por técnicas de baixo custo e é otimizado para utilização em sensores a base de GO, assim como outras aplicações (BOZKURT, *et al.*, 2014).

Fluoróforos podem ser prontamente adsorvidos na superfície do GO, entretanto a ligação não covalente entre o fluoróforo e a superfície do GO resulta no efeito de supressão de emissão da fluorescência. Assim para o processo de imageamento celular, este acoplamento não pode ser empregado diretamente (KUNDU, *et al.*, 2015).

Contudo, para a entrega de fármacos, o efeito de supressão de emissão do GO está sendo efetivamente utilizado para avaliar a capacidade de carreamento e a liberação celular de fármacos que possuem fluorescência própria. Mesmo se o fármaco carregado pelo GO não tiver fluorescência inerente, funcionalizar o nanossistema com um agente fluorescente permite avaliar o processo de carreamento, liberação e cinética da entrega do fármaco monitorando o efeito de supressão de emissão da fluorescência (SHIM, *et al.*, 2016).

O GO apresenta uma alta eficiência em supressão de emissão da fluorescência relatada para os fluoróforos orgânicos tradicionais, que é atribuída principalmente pelo forte efeito de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e a interação eletrostática entre o fluoróforo e as moléculas de GO. Este efeito deve induzir a formação de complexos rígidos que suprimem a fluorescência dos fluoróforos orgânicos através de um processo ressonante de transferência de energia e carga. Esta é uma típica estrutura de doador- $\pi$ -aceptor- $\pi$ -doador com conjugação- $\pi$  estendida. (ZHU, *et al.*, 2016). O papel do GO no processo de supressão de emissão é discutido em detalhes por TACHIKAWA e colaboradores, 2012.

A formação de H-agregados além de ser caracterizada pelo deslocamento para comprimento de ondas mais energéticos no espectro de absorvância de UV-vis, também é identificada pela supressão de fluorescência, onde a transição eletrônica de um orbital de ligação de baixa energia é permitida, e seguida por uma rápida conversão deste estado excitado para um orbital superior desocupado, suprimindo a fluorescência como resultado (ROSCH, YAO e WORTMANN, 2006).

### **1.5. Funcionalização**

Apesar de todas as aplicações potenciais que o grafeno oferece, um dos maiores desafios enfrentados é a produção de estruturas funcionalizadas de forma controlada. Abordagens para funcionalização do grafeno não covalentemente se aproveitam das interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre o anel aromático das moléculas e do plano basal do grafeno, demonstrando ser um meio eficiente e fácil para integração de moléculas orgânicas. Moléculas orgânicas doadoras de elétrons como dopamina, ácido 4-aminofenilbenzóico e tirosina, permitem uma redução do GO em rGO simultaneamente com a inserção de grupos moleculares orgânicos através das interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  (HOSU, *et al.*, 2015).

A funcionalização orgânica covalente do grafeno pode ser dividida em duas categorias: (a) formação de ligações covalentes entre os grupamentos funcionais orgânicos e os grupamentos oxigenados do GO e (b) a formação de ligações covalentes entre radicais livres e as ligações C=C do grafeno. Baseado em estudos experimentais e teóricos anteriores, a abordagem (b) é particularmente atrativa por permitir a ligação de vários grupamentos funcionais diretamente nas nanofolhas de grafeno, o que pode levar a uma interação mais eficiente entre os dois componentes e influenciar sua performance fotofísica e fotoelétrica. A adição de radicais livres aos carbonos em hibridização  $sp^2$  utilizando sal de diazônio é a maneira reportada mais eficaz de funcionalizar grafeno por ligações covalentes (WANG, A. *et al.*, 2016).

Tanto a funcionalização por redução quanto a funcionalização covalente, podem introduzir defeitos na matriz do grafeno. Estes defeitos geralmente são percebidos através de análise espectroscópica, a qual informações estruturais adicionais, como a evidência de funcionalização covalente, podem ser obtidas.

Embora uma das principais aplicações de nanofolhas de grafeno é ser um veículo para sistemas de entrega de fármacos, a biocompatibilidade ainda pode ser um problema. Para melhorar a biocompatibilidade, os pesquisadores funcionalizam o grafeno com estabilizadores que previnem que ocorra sua agregação em condições fisiológicas. Dentre estes estabilizadores estão polímeros sintéticos, polissacarídeos naturais e proteínas. Estudos preliminares demonstram que o grafeno estabilizado é promissor para atuar como nanocarreador em sistemas de entrega de fármacos, apresentando relativa baixa toxicidade e estabilidade no sistema circulatório, mantendo a habilidade de carrear fármacos anticâncer (SHIM, *et al.*, 2016).

Vários estudos reportaram que o polietilenoglicol (PEG) pode reduzir a citotoxicidade do GO, resultando em um aumento de biocompatibilidade e estabilidade em meio fisiológico. Foi demonstrado que o GO simples precipita em solução salina de tampão fosfato (PBS), em meio de cultura celular e soro, enquanto o GO ligado ao PEG apresenta dispersão estável em todas estas condições. Além disto, análises hematológicas e exames histológicos revelam que o GO funcionalizado com PEG aplicado de maneira intravenosa em ratos não causa danos consideráveis em órgãos depois de 40 dias de aplicação. Neste mesmo estudo, o tempo de meia vida do GO funcionalizado com PEG na circulação sanguínea foi de 1.5 horas (YANG, *et al.*, 2010). Este tipo de sistema funcionalizado já foi comprovadamente utilizado para a entrega de fármacos anticâncer e fotossensibilizadores (MIAO, *et al.*, 2013). Contudo modificações na superfície do GO podem inibir a liberação dos fármacos carreados pelo sistema, e algumas abordagens foram feitas para tentar resolver este problema (WEN, *et al.*, 2012).

Apesar da maioria dos esforços serem para a modificação da superfície do GO com o intuito de aumentar sua biocompatibilidade, outro objetivo importante é auxiliar o processo de carreamento de substâncias ativas com o GO. Este tipo de modificação superficial pode ser aplicado a fármacos de ácidos nucleicos, os quais não podem ser carregados no GO através de interações hidrofóbicas ou empilhamento  $\pi$ - $\pi$ .

A terapia fotodinâmica usa um agente foto responsivo denominado fotossensibilizador. A exposição a um comprimento de onda específico gera espécies reativas de oxigênio, o qual matam células próximas. Entretanto, a maioria dos fotossensibilizadores tendem a rapidamente agregar em soluções aquosas devido suas propriedades hidrofóbicas (JIM e ZHENG, 2011). Assim, vários tipos de nanocarreadores foram utilizados para a implementação de sistema de entrega de fármacos utilizando fotossensibilizadores (LIMA, et al., 2013 e YANG, et al., 2015). Recentemente, nanofolhas de grafenos estão sendo estudadas para a entrega de fotossensibilizador, seja sozinho (HUANG, et al., 2011) ou juntamente com fármacos anticâncer (ZHOU, et al., 2014).

A entrega de fotossensibilizador e agentes anticâncer concomitantemente, sendo carregados por GO, é realizada com o intuito de conseguir um efeito sinérgico através da combinação da terapia fotodinâmica e da quimioterapia. Entretanto a maioria dos estudos a respeito dessa co-entrega foram realizados em culturas de células, sendo assim, necessárias novas investigações para aplicar esta estratégia em modelos *in vivo*. Uma limitação deste método é a baixa penetração da luz nos tecidos para utilização da terapia fotodinâmica. Com o progresso na tecnologia de dispositivos óticos, essa abordagem de co-entrega se torna bastante promissora para aplicações *in vivo* em um futuro próximo (SHIM, et al., 2016)



## 1.6. Técnicas Espectroscópicas de UV-vis e Fluorescência.

A espectroscopia de UV-vis é uma técnica, barata, simples, flexível, não destrutiva e apropriada para análise de uma grande gama de compostos com alta sensibilidade e precisão, (PARMAR e SHARMA, 2016) com rápida aquisição de dados (BARBOSA-GARCIA, *et al.*, 2007). O alcance do equipamento de UV-vis geralmente é de 200 nm à 380 nm na faixa do UV e de 380 nm à 780 nm no comprimento visível (ASAHI, *et al.*, 2001). A técnica está relacionada com a capacidade da matéria em absorver e emitir luz.

Grupos covalentes insaturados com diferenças nas bandas de energia equivalente a energia no comprimento de onda do UV-visível podem absorver esta luz, e estes grupos são denominados de cromóforos. Além disto, a presença de grupos covalentemente saturados, os quais não absorvem na região do UV-vis, pode afetar a absorção de um cromóforo simplesmente por sua presença, estes grupos são denominados de auxocromos (PATIENCE, 2017). Os cromóforos são geralmente grupos aceptores de elétrons enquanto os auxocromos são grupos doadores de elétrons.

O equipamento para análises de UV-vis funciona basicamente da seguinte forma (Figura 4). Uma fonte de luz incidente é direcionada através de uma pequena abertura para um monocromador, onde o comprimento de onda é selecionado e passa por uma fenda durante a varredura do equipamento. A luz que sai do monocromador incide na amostra, transmitindo a luz não absorvida, que por fim é detectada por um fotodetector. Os dados são analisados e processados gerando o resultado final. O que se detecta é a diferença da intensidade da luz após passar pela amostra em comparação com a intensidade luminosa que atravessou a referência.

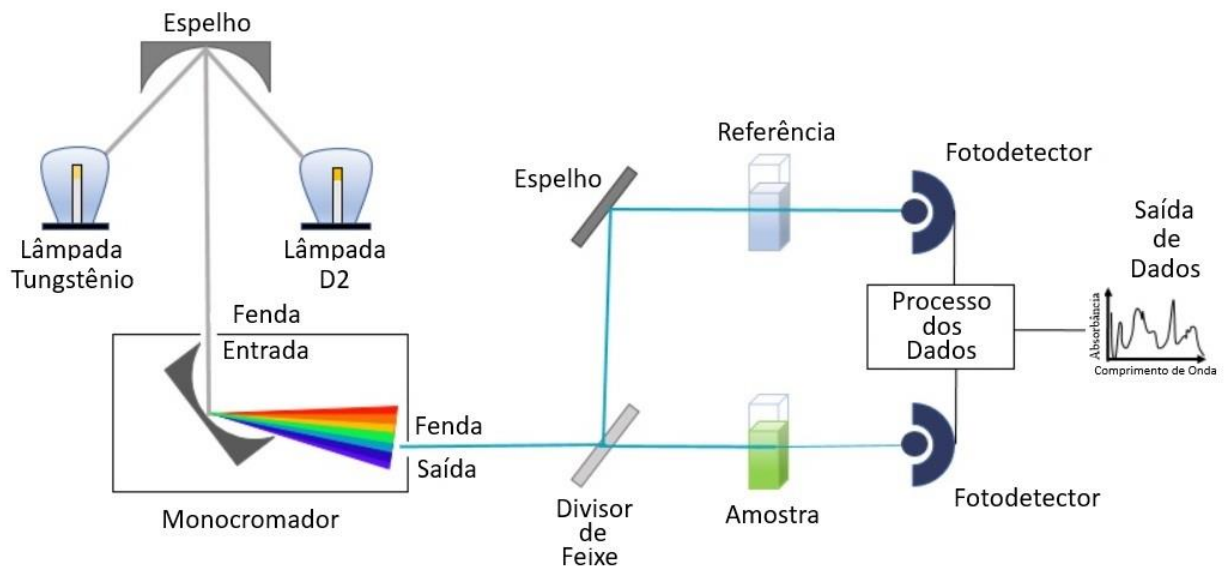


Figura 4. Esquema típico de funcionamento de um espectrofotômetro de UV-vis de duplo feixe. É mostrado o caminho percorrido pela luz desde a fonte luminosa até os fotodetectores.

Para a fluorescência de estado estacionário o equipamento funciona praticamente da mesma forma que o equipamento de UV-vis, com a diferença sendo que ao em vez da amostra ser irradiada por um intervalo de comprimento de onda ela é excitada por um comprimento de onda específico escolhido pelo operador, e a amostra emite luz em outro comprimento de onda, geralmente maior, que é detectado pelo fotodetector, analisado e processado pelo software gerando o resultado final.

Os elementos que possuem resposta espectroscópica, apresentam alterações em seus níveis energéticos o que pode afetar a intensidade de resposta ou o seu comprimento de onda (ANTOSIEWICZ e SHUGAR 2016). Deslocamento de banda para comprimento de onda mais curtos (deslocamento para o azul), são denominados de deslocamento hipsochromicos, enquanto os deslocamentos para comprimentos de onda mais longos (deslocamento para o vermelho), são denominados de deslocamento bathochromicos. Além disto, a diminuição na intensidade de resposta é conhecida como hipocromismo e o aumento de intensidade como hiperchromismo (ROBINSON, FRAME

e FRAME II). Estes efeitos estão representados na Figura 5 de forma genérica a fins didáticos.

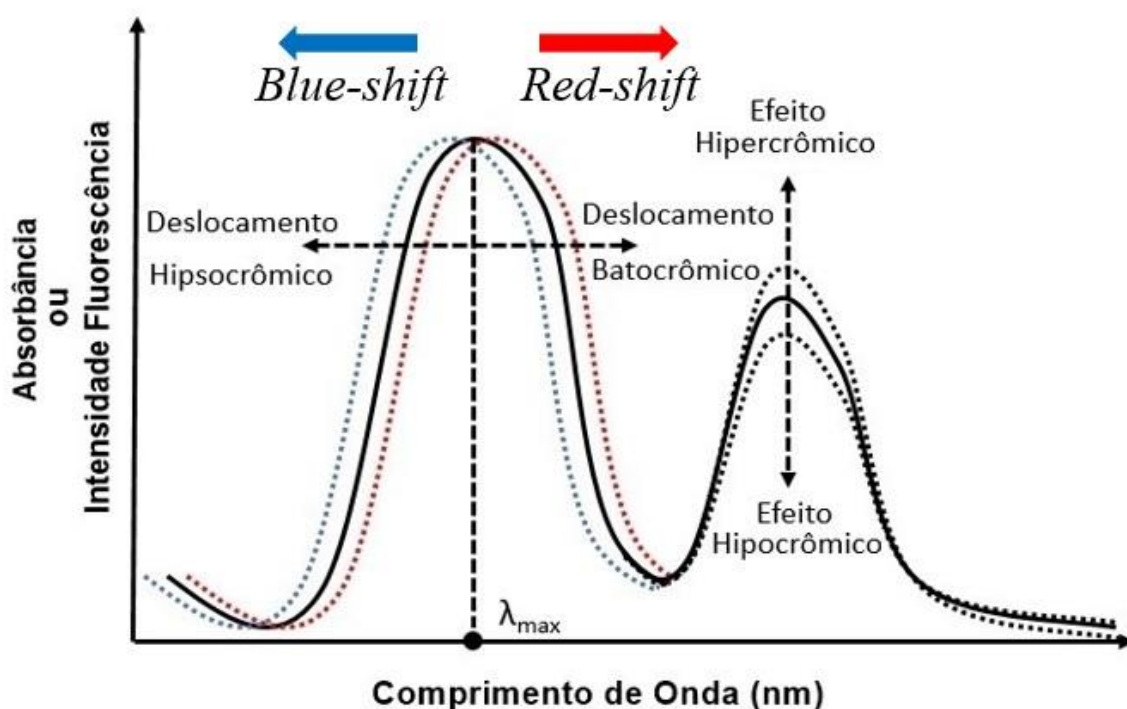


Figura 5. Representação típica do resultado da análise de amostras por técnicas espectroscópicas de UV-vis e fluorescência; exibindo o  $\lambda_{\max}$  (comprimento de onda no ponto de intensidade máxima) como ponto de interesse; os efeitos de aumento e decréscimo de intensidade; e os deslocamentos laterais do  $\lambda_{\max}$ .

Os efeitos espectroscópicos são dependentes das transições eletrônicas causadas pela interação das moléculas com a luz, causando a transição de elétrons de um estado de baixa energia (estado fundamental) para um molecular orbital mais energético. Quando dois elétrons estão emparelhados em um orbital de ligação de baixa energia, este orbital é denominado de orbital molecular mais alto ocupado (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital* – HOMO). Quando um elétron é excitado e passa para o orbital de anti-ligação, este orbital é denominado de orbital molecular mais baixo desocupado (do inglês, *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* – LUMO). Esta transição

só ocorre quando a energia do comprimento de onda incidente é igual ao  $\Delta E$  do gap entre os orbitais HOMO e LUMO (SAUER, HOFKENS e ENDERLEIN, 2011).

A espectroscopia de absorção estuda a transição do estado fundamental para o estado excitado através do ganho de energia responsável pelo salto eletrônico entre HOMO-LUMO decorrente da fonte de irradiação. Enquanto a fluorescência e a fosforescência lidam com a transição do estado excitado para o estado fundamental emitindo radiação eletromagnética. O diagrama de Jablonski na Figura 6 demonstra estes processos.

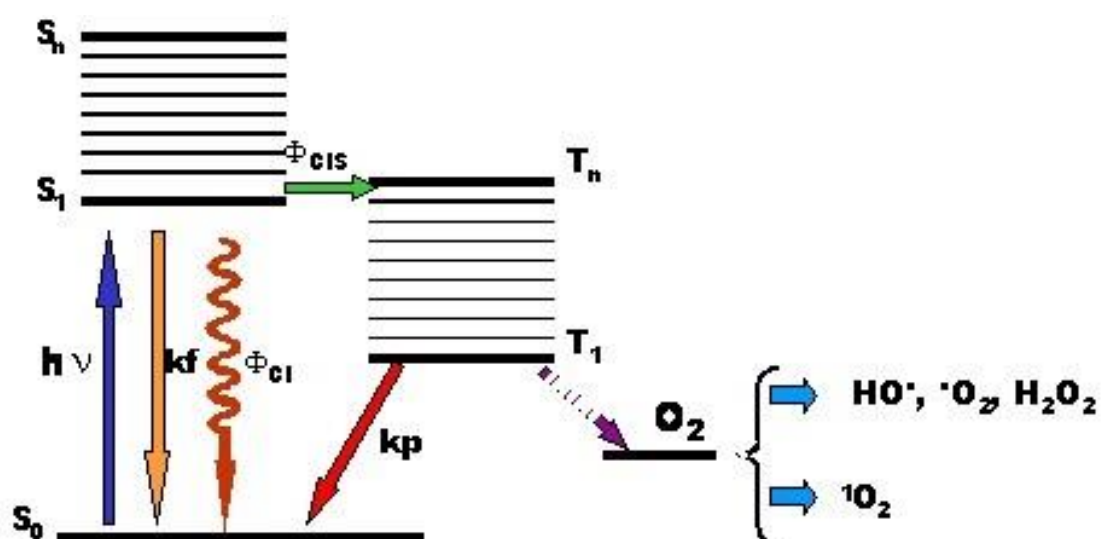


Figura 6. Diagrama de Jablonski;  $h\nu$  representa a energia eletromagnética absorvida, S<sub>0</sub> o estado singlete fundamental, S<sub>1</sub> o primeiro estado singlete excitado, S<sub>n</sub> os diferentes estados singlete excitado, T<sub>n</sub> os diferentes estados triplete excitado, T<sub>1</sub> o primeiro estado triplete excitado, CI conversão interna, CIS cruzamento intersistemas, K<sub>f</sub> emissão de fluorescência, K<sub>p</sub> emissão de fosforescência. A seta roxa representa a interação de elétron no estado triplete excitado com o oxigênio molecular produzindo ROS. Fonte: LUNARDI, C. N. **Tese Doutorado**, 2004.

Quando a irradiação luminosa excita um composto fotossensível, provoca a transição HOMO-LUMO, e conseqüentemente a molécula se encontra em um estado energeticamente instável e tende a retornar rapidamente ao estado fundamental (processo físico) ou sofrer reajando ou fragmentação (processo químico). O retorno ao estado fundamental desse composto pode ocorrer por diversas maneiras, sendo algumas mais favorecidas que outras, dependendo da natureza dos estados excitados envolvidos no processo, tipo de molécula e do solvente. A classificação destes processos se dá como: radiativos, não-radiativos e de supressão (TURRO, 1991).

No diagrama de Jablonski, o estado eletrônico do singlete fundamental é descrito por  $S_0$ , enquanto os estados excitados são descritos por  $S_1$  até  $S_n$ . Para os estados triplete, a descrição dos níveis de energia ocorre até  $T_n$ . Os subníveis dos estados eletrônicos representados quando maiores que  $S_1$  e  $T_1$ , tendem a ser rapidamente desativados, por relaxação vibracional (calor) e conversão interna até atingirem o primeiro estado excitado.

A desativação do estado  $S_1$  pode ocorrer pela continuação do processo não-radiativo de Conversão Interna (CI) de energia ou pela emissão de fluorescência (processo radiativo). Quando o estado  $S_1$  e os orbitais do estado triplete se sobrepõem energeticamente, o processo de Cruzamento Intersistemas (CIS) pode ser favorecido, invertendo o spin do elétron e populando o orbital do triplete. Uma vez no primeiro estado triplete excitado, a molécula excitada pode ser desativada ao seu estado fundamental pela CI ou pela emissão radiativa de fosforescência através de CIS.

Outros processos tais como; transferência de energia e transferência de elétrons, podem levar à desativação das moléculas ao estado fundamental, ou a desativação por transformações químicas desencadeando a formação de novos compostos (*e.g.* dissociação). Esses efeitos são denominados de processos de supressão, e dependem do tempo de vida dos estados  $S_1$  e  $T_1$ . (LAKOWICZ, 2006); (TURRO, 1991).

Existem várias evidências que sugerem que o oxigênio singlete,  $^1\text{O}_2$ , é a espécie mais danosa na terapia fotodinâmica (ATHAR, MUKHTAR e BICKERS, 1988); (ITO, 1978); (VALENZO, 1987); (WEISHAUP, GOMER e DOUGHERTY, 1976). A alta reatividade do  $^1\text{O}_2$  permite com que ele interaja rapidamente com várias biomoléculas, podendo também transferir sua energia à uma molécula doadora no estado excitado, retornando ao estado fundamental (supressão). O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  depende da polaridade de seu ambiente (*e.g.*  $5 \times 10^{-5}$  s em lipídeos,  $5 \times 10^{-6}$  s em água e  $6 \times 10^{-7}$  s em meio celular) (COREY, MEHROTRA e KHAN, 1987).

### **1.7. Oxigênio Singlete**

Geralmente as moléculas têm estado fundamental singlete, mas o oxigênio molecular apresenta estado fundamental triplete ( $^3\Sigma_g^-$ ), ou seja, o seu HOMO é constituído por dois elétrons com spin paralelos ocupando dois orbitais  $\pi^*$  distintos de nível de energia igual (degenerados), constituindo um biradical representado por  $^3\text{O}_2$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1982). Esta configuração eletrônica confere ao oxigênio molecular propriedades paramagnéticas sendo estável de maneira incomum no estado triplete, prevenindo com que ele reaja diretamente com outras moléculas as quais normalmente estão no estado singlete com elétrons com spins antiparalelos, devido a regra de conservação de spin (SCHNEIDER, GUGLIOTTI e BAPTISTA, 2000). A Figura 7 demonstra a distribuição eletrônica dos orbitais nos estados singlete e triplete.

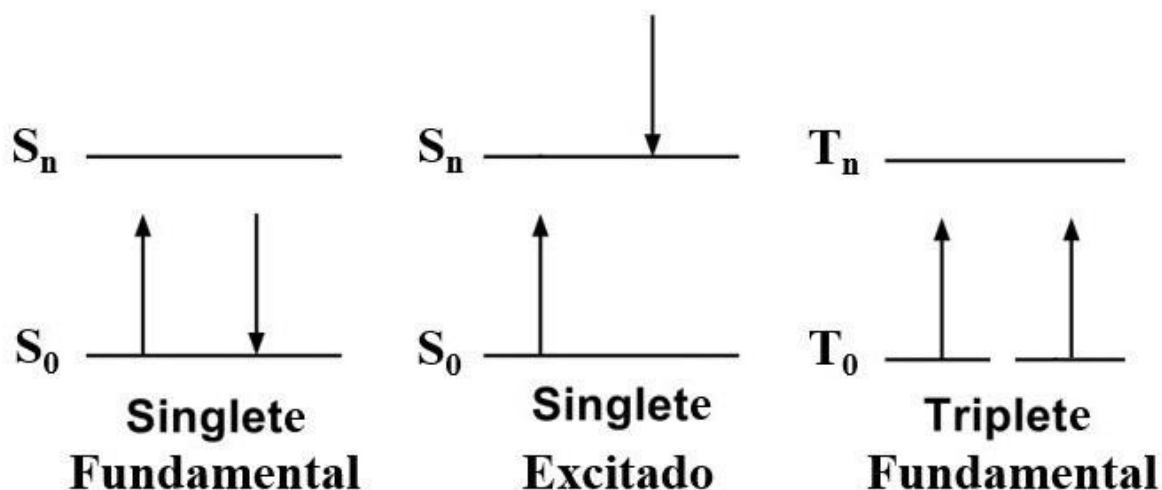
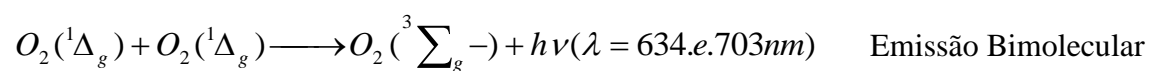
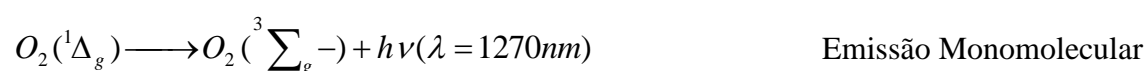


Figura 7. Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares ( $\pi^*$ ) dos estados singlete fundamental e excitado e do estado triplete fundamental.

Existem duas formas de oxigênio singlete, a  $^1\Sigma_g^+$  e a  $^1\Delta_g$ , sendo a primeira menos estável, com nível energético maior, e a segunda com energia menor conferindo maior estabilidade. Seus níveis energéticos são 37,5 kcal/mol e 22 kcal/mol mais elevados que o estado fundamental, respectivamente. Em condições experimentais normais, o estado menos estável tende a decair rapidamente para o estado  $^1\Delta_g$  que apresenta tempo de vida-média alta (2-4  $\mu$ s em  $H_2O$ ). Assim, a forma de oxigênio singlete que apresenta interesse para aplicabilidade em sistemas biológicos é a forma  $^1\Delta_g$ , que será denotado por  $^1O_2$  (MARTINEZ, MEDEIROS e DI MASCIO, 2000).

Sendo o oxigênio singlete uma molécula no estado eletrônico excitado, ela pode decair emitindo luz. Existem dois tipos de emissões possíveis:



A intensidade da emissão é diretamente proporcional a concentração do  $^1\text{O}_2$ , podendo ser quantificada. A emissão monomolecular pode ser detectada por fotodetector com fotodiodo de Germânio. A emissão bimolecular pode ser monitorada por meio de um fotomultiplicador sensível a região do vermelho, termoeletricamente resfriado, conectado a um sistema discriminador e amplificador (LUNARDI, C. N., 2004).

### **1.8. Geração de Oxigênio Singlete**

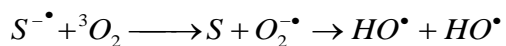
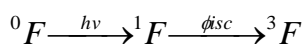
Oxigênio singlete pode ser gerado pelas reações de oxidação e desproporcionamento de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, podendo ser feita pelo íon hipoclorito ou pelo íon molibdato, ou por processo de fotossensibilização que consiste nos mecanismos de transferência de energia e transferência de elétrons. Existem várias outras formas de gerar  $^1\text{O}_2$ , como a decomposição térmica de ozonidas orgânicas, radiólise de pulso e a descarga de micro-ondas sobre o oxigênio molecular. Em meio biológico  $^1\text{O}_2$  pode ocorrer devido a ação de enzimas como oxigenases e peroxidases, termod decomposição de dioxetanos e reação de peróxido de hidrogênio com hipoclorito ou peroxinitrito (RIBEIRO, J., 2003).

A geração fotoquímica de oxigênio singlete ocorre através do mecanismo de troca, sugerindo um mecanismo comum de ação, em que uma molécula fotossensível é excitada ao estado triplete, podendo assim interagir com o oxigênio molecular ( $^3\Sigma_g^-$ ) por processo de transferência de energia ou transferência de elétrons induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (*e.g.*  $^1\text{O}_2$ ,  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). As ROS podem atacar centros específicos dentro de sistemas biológicos, levando à morte celular, o que é explorado pela TFD (FOOTE, 1968). Os mecanismos de produção dessas espécies reativas são descritos mais detalhadamente a seguir.



### 1.8.1. Mecanismo do Tipo I

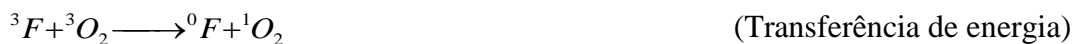
A reação do Tipo I envolve a transferência de elétron ou do átomo de hidrogênio entre o composto fotossensível no estado triplete ( $^3F$ ) e a molécula do substrato (S). Este, por sua vez, na forma reduzida, reage com o oxigênio molecular ( $^3O_2$ ) presente no meio, formando espécies tóxicas.



Em que  ${}^0F$ ,  ${}^1F$ ,  ${}^3F$  é o composto fotossensível no estado fundamental, singlete e triplete, respectivamente, S = substrato (LUNARDI, C. N., 2004).

### 1.8.2. Mecanismo do Tipo II

Nesta reação, o composto fotossensível no estado excitado triplete interage diretamente com o oxigênio molecular por transferência de energia, resultando na formação de oxigênio singlete ( ${}^1O_2$ ). Este reage de forma rápida e indiscriminada com os mais variados materiais eletrofílicos de origem biológica ou não, como ácidos nucleicos, lipídios insaturados, proteínas, etc. (FOOTE, 1991).



Acredita-se que o oxigênio singlete ( ${}^1O_2$ ) gerado pela reação do Tipo II é o principal intermediário citotóxico, responsável pela inativação de células, para os processos oxidativos fotoinduzidos, sendo extremamente importante para o sucesso da TFD. (FUCHS e THIELE, 1998).

### 1.9. Detecção da Formação de Oxigênio Singlete por Fotossensibilização

A determinação do rendimento quântico de geração de oxigênio singlete ( $\Phi\Delta$ ), pode ser feita através da oxidação de substratos que apresentam resposta à radiação eletromagnética (*e.g.* absorbância e fluorescência), formando produtos não responsivos. Assim, através do monitoramento do consumo destes compostos, utilizando técnica espectroscópica de estado estacionário, é possível determinar a produção de  $^1\text{O}_2$ .

O 1,3-Difenilisobenzofurano (DPBF), é um dos substratos oxidáveis mais utilizados, absorvendo radiação de comprimento de onda de 417 nm. Quando a solução é irradiada pela luz em uma região espectral que não induza a degradação direta do DPBF, o seu consumo é decorrente da reação com o  $^1\text{O}_2$ , que foi gerado pela excitação do fotossensibilizador pela radiação eletromagnética. Deste modo, o monitoramento do consumo de DPBF, pela medida do decréscimo de absorbância em 417 nm, é uma forma indireta e simples de medir o  $\Phi\Delta$  de oxigênio singlete. É recomendável que o acompanhamento dessas reações não se estenda até o consumo de todo o DPBF ou qualquer outro substrato oxidável, de modo que se possa evitar interferências nos resultados, causadas por reações secundárias (RIBEIRO, J., 2003).

## **2. Jutificativa**

Apesar de progresso significativo já ter sido feito na área de entrega de fármacos utilizando nanomateriais a base de grafeno, vários problemas ainda devem ser resolvidos e melhorias devem ser implementadas para utilização dessas técnicas de forma eficaz.

Desta forma, propomos a construção de um nanossistema entre óxido de grafeno e ftalocianinas metálicas, de forma a tentar compreender melhor como esta interação ocorre, monitorando o processo de supressão de emissão da ftalocianina ocasionado pelo grafeno em diferentes condições experimentais.

Com base nos resultados cinéticos da interação entre o grafeno e as ftalocianinas, iremos propor uma forma adequada para a funcionalização do nano sistema visando um aumento da biocompatibilidade para futura utilização como terapia fotodinâmica.

### **3. Objetivos**

- Caracterização das propriedades físico-químicas da interação de óxido de grafeno e ftalocianinas em diferentes condições experimentais por espectrofotometria na região do UV- Visível e fluorescência;
- Avaliar a capacidade de produção de oxigênio singlete das ftalocianinas antes e após a interação com óxido de grafeno.

#### 4. Materiais e Métodos

Os materiais necessários para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados sem prévia purificação. A ftalocianina de zinco tetra substituída utilizada foi sintetizada seguindo a rota de síntese desenvolvida por Lunardi et al., 2003. Todos os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich, inclusive o grafeno.

Os equipamentos que foram utilizados neste projeto são:

- ✓ Espectrofotômetro de UV-vis de duplo feixe marca Hitachi High-Technologies Corporation®, modelo U-3900H;
- ✓ Espectrofotômetro de fluorescência marca Hitachi High-Technologies Corporation®, modelo F-7000;
- ✓ Microscópio Eletrônico de Varredura marca Jeol®, modelo 840 A;
- ✓ Balança analítica marca Marte®, modelo AY 220;
- ✓ Sistema de água ultrapura (PURELAB PRIMA7-15-30)
- ✓ Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  e 100-1000  $\mu\text{L}$ , marca Capp®, modelo Ecopipette;
- ✓ Ultrasonicador de bancada.

#### 4.1. Síntese

O fotossensibilizador tetranitro ftalocianina de zinco foi sintetizado utilizando o protocolo descrito por Lunardi *et al.*, 2003, que consiste na obtenção do fármaco sensível à luz tetranitro ftalocianina ( $ZnPc(NO_2)_4$ ) através da reação de tetramerização da 4-nitroftalonnitrila na presença de 1,8- diazabicyclo [5,4,0]undec-7-ene (DBU) e acetato de zinco. O composto foi usado na forma de mistura de isômeros.

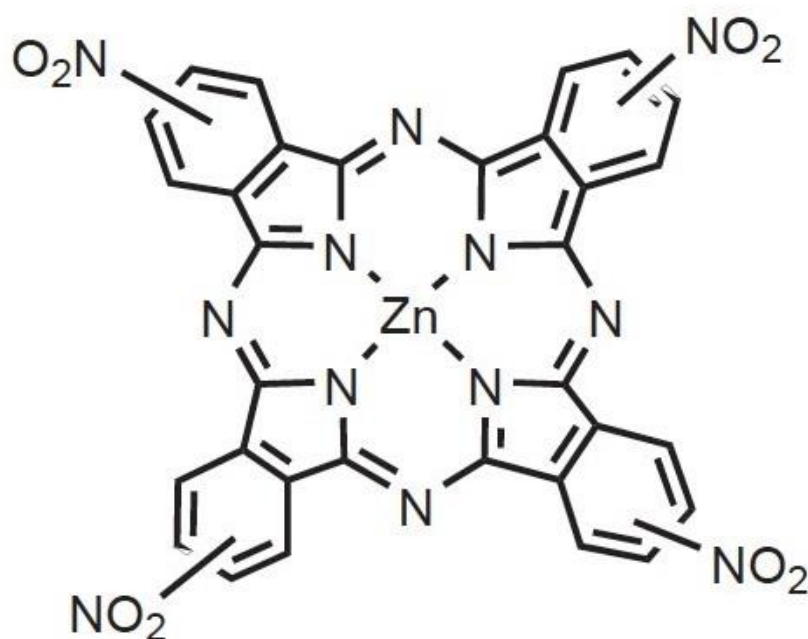


Figura 8. Estrutura química da tetranitro ftalocianina de zinco. Fonte: LUNARDI, ROTTA e TEDESCO, **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, 2003 // LUNARDI, C. N. **Tese Doutorado**, 2004.

## 4.2. Preparo de Soluções

### 4.2.1. Solução de Óxido de Grafeno

A suspensão estoque de GO de concentração de 1mg/mL foi submetida a sonicação durante 5-10 minutos para promover homogeneização e promover a remoção de possíveis focos de agregação do grafeno. Desta dispersão várias diluições em meio aquoso foram criadas, para que 2μL equivalesse as seguintes concentrações: 0,1μg/mL, 0,4μg/mL e 2μg/mL, quando estas são adicionadas em um volume de 2,5 mL de solvente.

### 4.2.2. Solução de ZnPc e ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>

A ZnPc e a ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) em alta concentração sem apresentar aglomeração. Em seguida foram diluídas nas seguintes concentrações: 3μM, 6μM, 12μM, 18μM. As diluições em baixa concentração foram realizadas nos seguintes solventes: água, dimetilformamida (DMF), acetona, acetonitrila (MeCN), clorofórmio e hexano.

As concentrações das soluções foram calculadas com base na equação da Lei de Beer-Lambert (Eq. 1),

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = E \cdot l \cdot C \quad (1)$$

Onde,  $A$  é a absorvância, definida logaritmicamente em base de 10 pela divisão dos valores de intensidade de luz incidida  $I_0$  e transmitida  $I$ ,  $E$  é o coeficiente de extinção da ftalocianina,  $l$  é o caminho ótico que a luz percorre sobre a amostra, e  $C$  é a concentração (SAUER, HOFKENS e ENDERLEIN, 2011).

### **4.3. Análises Espectroscópicas de UV-vis e Fluorescência**

Para cada solução de ZnPc e ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, foram sendo adicionadas pequenas concentrações de dispersão de óxido de grafeno, especificadas conforme o contexto. Após cada adição de GO a solução foi sonicada por 5 minutos seguida de posterior análise de perfil espectroscópico em UV-vis e fluorescência das ftalocianinas, uma vez que o GO não possui fluorescência inerente. A adição de grafeno ocorreu até que o sinal de fluorescência da ftalocianina ficasse praticamente nulo.

#### **4.3.1. Tratamento dos Dados Espectroscópicos**

Os dados obtidos nas análises espectroscópicas foram tratados no programa GraphPad Prism 6. Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico de normalização. Foram realizadas análises de regressão linear da intensidade de fluorescência inicial sobre a intensidade na presença do GO para a obtenção dos valores da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ). Também foram realizadas análises de regressão não linear de ligação específica das ftalocianinas com o GO baseadas na equação de Hill, obtendo os valores de constante de dissociação ( $K_d$ ), e coeficiente de Hill ( $n$ ) que define a cooperatividade entre a associação do fluoróforo com o supressor e valores de saturação da ligação ( $Q$ ). A análise da produção de oxigênio singlete foi feita baseada no cálculo de regressão linear de primeira ordem da constante cinética de fotodegradação do DPBF ( $K_{DPBF}$ ).



### 4.3.2. Análises de Supressão de Fluorescência

Em casos ideais de supressão a bem elucidada equação de Stern-Volmer (Eq. 2) se aplica:

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (2)$$

Onde,  $I_F^0$  é a intensidade de fluorescência,  $I_F$  é o parâmetro equivalente na presença do agente supressor (GO) na concentração  $[Q]$ ,  $K_q$  é a constante da biomolecular,  $\tau_0$  é o tempo de vida médio da substancia fluorescente sem a presença do agente supressor, e  $K_{sv}$  é a constante de supressão de Stern-Volmer. Consequentemente, a equação (1) pode ser utilizada para a determinação de  $K_{sv}$  pela regressão linear de  $I_F^0/I_F$  contra  $[Q]$ , sendo  $K_q = K_{sv}/\tau_0$  (RASHID, *et al.*, 2015).

Os parâmetros para a associação de ZnPc/ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> com GO foram descritos baseando-se na equação de Hill, (Eq. 3 e 4):

$$Q = \frac{(I^0 - I)}{I^0} \quad (3)$$

$$\frac{Q}{Q_{max}} = \frac{[GO]^n}{K_D^n + [GO]^n} \quad (4)$$

Onde  $Q_{max}$  é o valor da saturação máxima de ligação  $Q$ ,  $K_D$  é a constante de equilíbrio de dissociação de ligação, a qual descreve a força relativa entre a interação do fluoróforo com o GO, e  $n$  representa o coeficiente de Hill, que define a cooperatividade da associação (KENRY, LOH e LIM, 2016).

### 4.3.3. Rendimento Quântico de Oxigênio Singlete

A determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ) ocorre tipicamente através do método químico de *trapping* (ZHANG, *et al.*, 2014). Para os testes, 30  $\mu\text{L}$  de DPBF foram adicionados a 2,5 ml de solução com ZnPc ou  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  a 5  $\mu\text{M}$  e depois a solução foi submetida a irradiação de laser vermelho (25mW) no comprimento de onda de 637 nm. Os experimentos foram realizados sobre condições normais de temperatura e pressão. A constante cinética de fotodegradação do DPBF ( $K_{\text{DPBF}}$ ) foi determinada aplicando a equação de primeira ordem (Eq. 5):

$$kt = \text{Ln} \frac{(A_0 - A_{\text{inf}})}{(A - A_{\text{inf}})} \quad (5)$$

Onde,  $A_0$  e  $A_{\text{inf}}$  correspondem a absorvância de DPBF (417 nm) no tempo zero e no infinito, respectivamente. O rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ) foi determinado pela Eq. 6:

$$\Phi_{\Delta}^{\text{Pc}} = \Phi_{\Delta}^{\text{Std}} \frac{r_{\text{DPBF}}^{\text{Pc}}(1 - 10^{A_{637}^{\text{Std}}})}{r_{\text{DPBF}}^{\text{Std}}(1 - 10^{A_{637}^{\text{Pc}}})} \quad (6)$$

Onde  $\Phi_{\Delta}$  representa o rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta} = 0,56$  para a ZnPc livre (padrão) em DMF),  $r_{\text{DPBF}}^{\text{Pc}}$  e  $r_{\text{DPBF}}^{\text{Std}}$  representam a velocidade de fotodegradação de DPBF (correspondendo respectivamente as constantes cinéticas,  $K$  e  $K^{\text{std}}$ ),  $1 - 10^{A_{637}^{\text{Std}}}$  e  $1 - 10^{A_{637}^{\text{Pc}}}$  representam a fração de luz absorvida no comprimento de onda irradiado, e  $A_{637}^{\text{Std}}$  e  $A_{637}^{\text{Pc}}$  representam a absorvância da irradiação no comprimento de onda da ftalocianina padrão (ZnPc) e qualquer outro tipo de ftalocianina (Pc), respectivamente (LI, *et al.*, 2016).

## 5. Resultados e Discussão

Atualmente, os estudos sobre a interação molecular entre GO e ftalocianinas (Pc) ainda são limitados. A natureza, especificidade, e mecanismos que levam a interação GO-Pc ainda necessitam ser elucidados. Nestes estudos, foram investigados vários aspectos da interação GO-Pc (comportamento de agregação de Pc-GO, redução de emissão da Pc pela ação do GO, perfil cinético de ligação GO-Pc e o processo de geração de oxigênio singlete). Assim, foram conduzidos estudos sobre as interações moleculares do GO com ZnPc e ZnPcNO<sub>4</sub> em solventes orgânicos como a acetonitrila (MeCN), acetona e dimethylformamide (DMF). Técnicas espectroscópicas de ultravioleta-visível (UV-vis) e emissão de fluorescência foram empregadas para estudos de agregação e avaliação da produção de oxigênio singlete; e estudos de supressão de fluorescência e cinética de ligação, respectivamente.

A espectroscopia de UV-vis pode caracterizar as associações intermoleculares dos monômeros (HANSDA, *et al.*, 2016). Assim, a quantidade de GO apresenta um papel fundamental no processo de agregação, portanto a determinação das condições ideais se torna necessário (SINOFOROGLU, *et al.*, 2013). Para a determinação dos melhores parâmetros de análise, foram feitos inúmeros testes em DMF variando a concentração de ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> entre 5 e 60 µM com sucessivas adições de GO, começando em 0,1 µg/mL e terminando em 22 µg/mL.

Deste modo, após vários testes, o *setup* operacional dos equipamentos foi definido considerando a concentração de 10 µM de ftalocianina ideal para o estudo proposto. A supressão de fluorescência pode ser verificada e determinada pela relação da concentração entre GO: ZnPc e GO: ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, não sendo necessário concentrações maiores que 12 µg/mL, para a dada concentração. Estes estudos de avaliação da concentração foram realizados somente com a ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>, pois ela é a molécula alvo do estudo e era necessário a otimização de sua concentração. A solução de DMF foi

escolhida nesta etapa por ser o solvente, dentre os presentes neste estudo, mais utilizado com a ftalocianina de zinco. Assim, com a concentração ideal de trabalho definida para a  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$ , utilizamos esta mesma concentração para as soluções de  $\text{ZnPc}$ , a fim de ter uma melhor representatividade dos dados.

A viabilidade da caracterização de  $\text{ZnPc}$  e  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  foi analisada em água, DMF, acetona, MeCN, hexano e clorofórmio. No entanto, as ftalocianinas apresentaram quase nenhuma solubilidade em clorofórmio e se mostraram insolúveis em hexano até mesmo na presença do GO. Nas análises feitas em água, após algumas horas de diluição, foi observado a formação de precipitado nas amostras. A solução de ftalocianina em acetona apresentou boa solubilidade, entretanto pela natureza do solvente ser extremamente volátil, e o tempo de análise proposto para a caracterização ser longo, a evaporação do solvente se tornou significativa fonte de erro.

Deste modo, a fim de criar o melhor modelo possível para a interação entre as ftalocianinas testadas e o GO, foram considerados nos estudos de variação de absorvância e supressão de fluorescência os dados coletados em acetona, DMF e MeCN. Contudo, para os estudos da formação de oxigênio singlete e cinética de supressão de fluorescência, que precisam de tratamento estatístico e uso de equações matemáticas, foram utilizados somente os dados obtidos em solução de DMF e MeCN, pois estes apresentam alta correlação estatística.

### 5.1. Estabilidade com o Tempo das Soluções de Ftalocianinas Livres

Além da estabilidade visível das amostras procurando a presença de precipitados e agregados, foram feitos testes para avaliar o tempo necessário para a solução estabilizar após a diluição, e não alterar os valores de absorvância para o UV-vis. Como pode-se notar nas figuras 9 e 10, a absorvância das ftalocianinas se altera ao longo do tempo. É interessante observar que a absorvância aumenta com o tempo, e praticamente se estabilizando depois de 5 horas.

Entretanto, para a solução de ZnPc em MeCN o valor da absorvância decresce drasticamente, acreditamos que este efeito ocorre devido a acetonitrila ser o solvente com maior momento dipolar (comparando com acetona e DMF), causando com que a ZnPc, que é a ftalocianina do presente estudo com a maior hidrofobicidade, interaja de uma forma que diminua sua capacidade de absorção luminosa, devido a formação de dímeros. O efeito do aumento de intensidade de absorvância, pode estar relacionado com a estabilização do sistema, em que inicialmente as soluções de corante estavam bastante concentradas e foi necessário um tempo para que ocorresse o processo de dissociação, ao diluir a solução, aumentando a distância intermoleculares e consequentemente sua habilidade de absorver a luz.

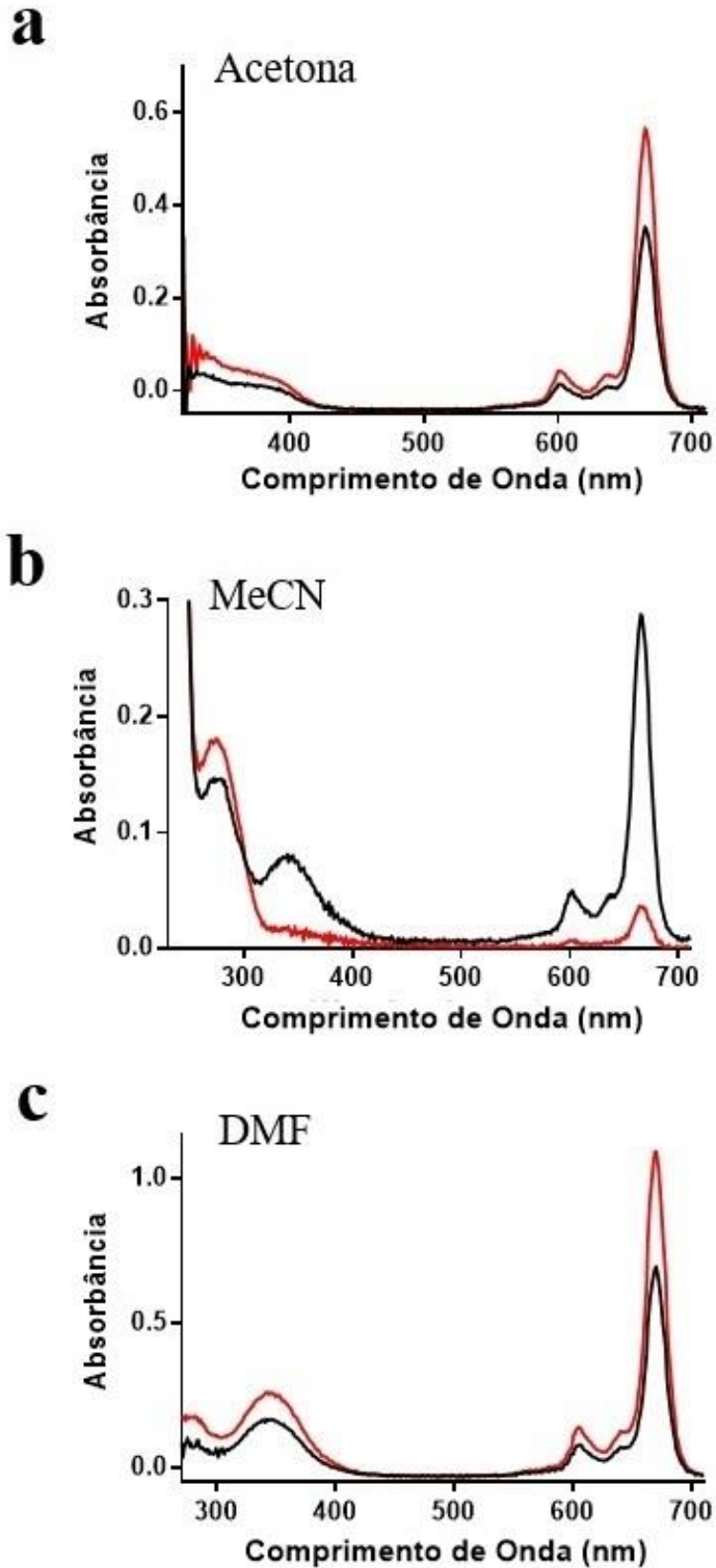


Figura 9. Espectro de absorvância de ZnPc livre (10  $\mu$ M) e a estabilidade da amostra. Linha em preto representa a solução recém diluída e em vermelho após esperar 5 horas. (a) Acetona (330 – 725 nm); (b) MeCN (285 – 725 nm); (c) DMF (290 – 725 nm).

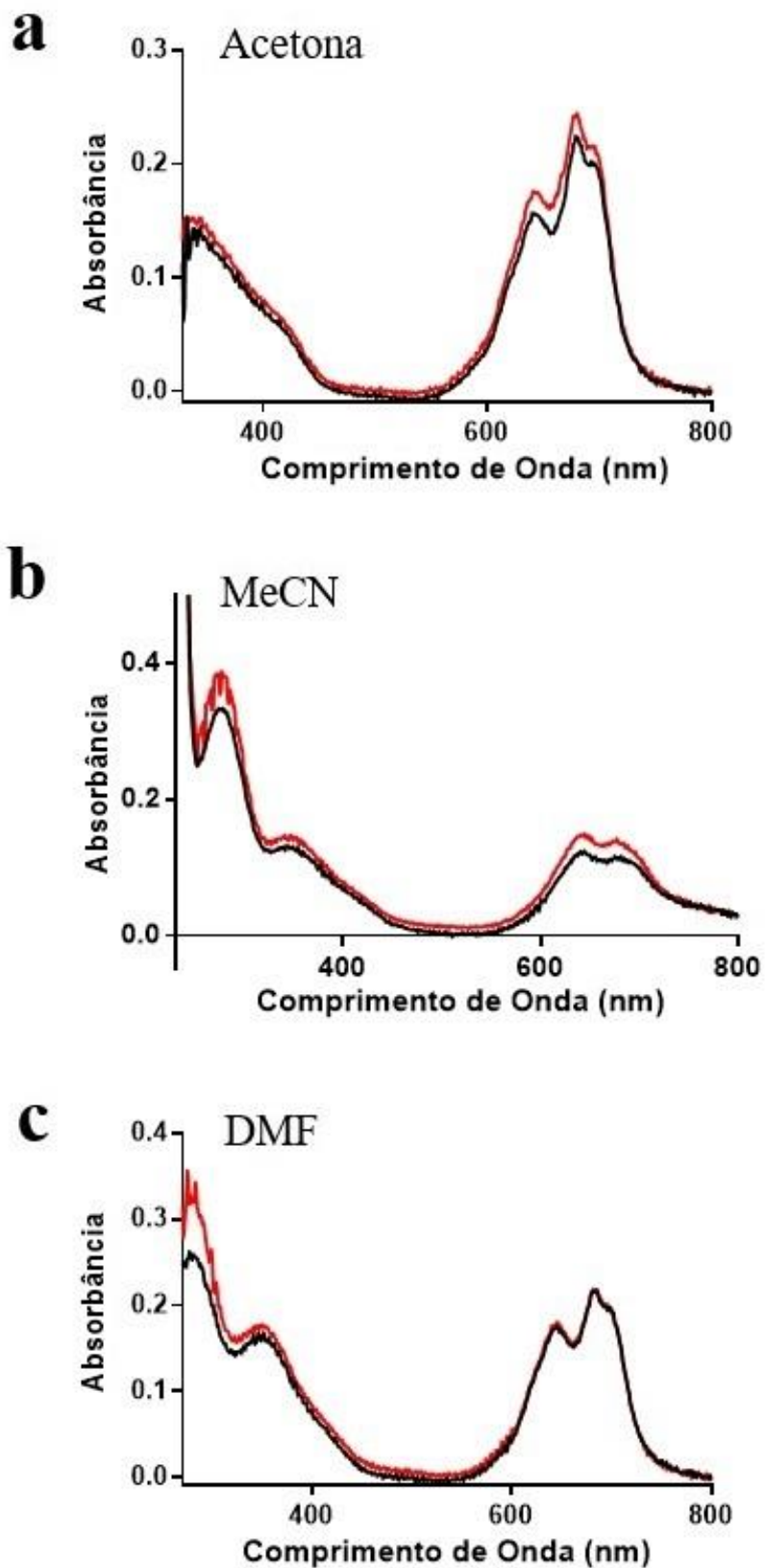


Figura 10. Espectro de absorvância de  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  livre ( $10 \mu\text{M}$ ) e sua estabilidade. Linha em preto representa a solução recém diluída e em vermelho após esperar 5 horas. (a) Acetona (330 – 800 nm); (b) MeCN (285 – 800 nm); (c) DMF (290 – 800 nm).

Assim como a estabilidade das ftalocianinas foi testada em UV-vis, também analisamos a resposta em fluorescência como demonstra as figuras 11 e 12. O que se pode observar é que em ambas as ftalocianinas, a fluorescência em DMF praticamente se conservou, sendo, portanto, a solução mais estável, e em acetona e MECN a fluorescência perdeu um pouco a intensidade. A diminuição da fluorescência para ZnPc em acetonitrila foi mais drástica, sendo atribuída pela mesma razão observada nos testes de UV-vis. Além disso, é possível observar que os gráficos para a ZnPc apresentaram um leve deslocamento, o que é indício que ocorreu formação de agregados. As soluções com ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> não apresentaram deslocamento aparente, nos permitindo inferir que a ftalocianina tetra substituída, não apresenta nenhum grau de aglomeração espontânea nestes solventes, sendo mais estável que a ZnPc.

Nota-se nos testes de estabilização das ftalocianinas que de forma geral, a absorvância de UV-vis tende a aumentar durante a fase de estabilização, e a intensidade de fluorescência tende a diminuir. Este resultado poderia ser como um resultado contraditório. Contudo, acreditamos que pela fluorescência ser uma técnica mais sensível do que a técnica de UV-vis, logo após a diluição, antes que o processo de estabilização molecular ocorra, a fluorescência total das amostras é calculada pelo fluorímetro. Assim, a queda na intensidade de fluorescência pode ser atribuída a exposição das amostras à luz.



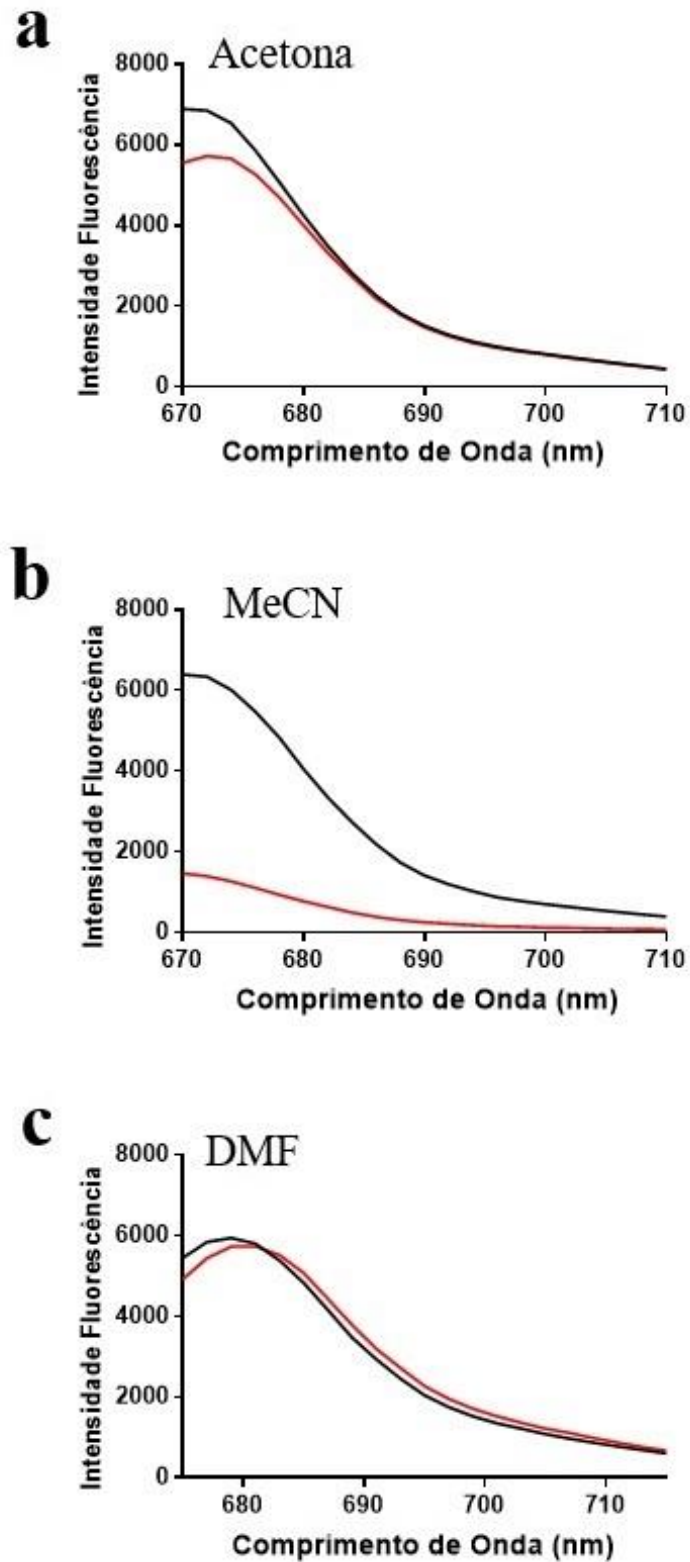


Figura 11. Espectro de fluorescência de ZnPc livre ( $10 \mu\text{M}$ ) e a estabilidade da amostra ( $\lambda_{\text{ex}} = 670 \text{ nm}$ ). Linha em preto representa a solução recém diluída e em vermelho após esperar 5 horas. (a) Acetona (670 – 710 nm); (b) MeCN (670 – 710 nm); (c) DMF (675 – 715 nm).

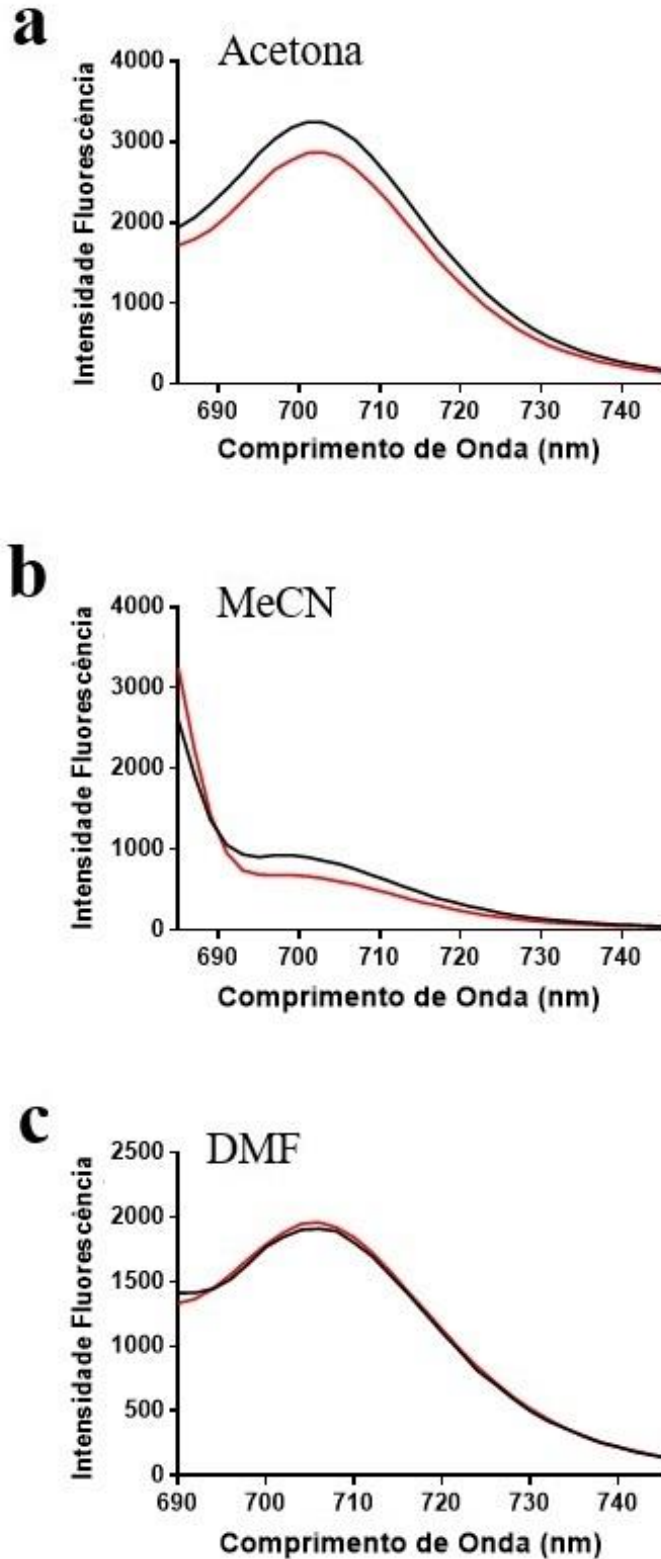


Figura 12. Espectro de fluorescência de  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  livre ( $10 \mu\text{M}$ ) e a estabilidade da amostra ( $\lambda_{\text{ex}} = 685 \text{ nm}$ ). Linha em preto representa a solução recém diluída e em vermelho após esperar 5 horas. (a) Acetona (685 – 745 nm); (b) MeCN (685 – 745 nm); (c) DMF (690 – 745 nm).

## 5.2. Resposta de Absorbância (UV-vis) Decorrente da Adição de GO

Com a conclusão dos testes de estabilidade, foi iniciada a etapa de adição sucessiva de GO nas soluções de ftalocianinas com concentração aproximada de 10  $\mu$ M. O estado eletrônico fundamental do espectro de absorbância das ftalocianinas demonstra duas bandas de absorção dominantes, uma na região do ultravioleta e outra na região do visível. Essas bandas de absorção são conhecidas como banda B (Soret) e banda Q, respectivamente. A banda Q pode apresentar um perfil dividido (Q<sub>x</sub> e Q<sub>y</sub>). A banda Q foi observada por volta de 600 – 750 nm devido a transição  $\pi$ - $\pi$  do orbital molecular ocupado mais alto (HOMO), e do orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO) dos anéis das ftalocianinas. A banda Soret é observada por volta de 300 – 400 nm surgindo de níveis mais profundos da transição  $\pi$  do LUMO (GOKSEL, DURMUS e ATILLA, 2016).

Os resultados nas Figuras 13 e 14, demonstram que as ftalocianinas de zinco apresentam um comportamento diferente de sua espécie substituída. A ftalocianina não substituída (ZnPc) demonstra um espectro de absorbância típico de ftalocianinas metálicas com um comportamento monomérico, evidenciando um único e estreito pico na banda Q (GOKSEL, DURMUS e ATILLA, 2016), e este pico está presente em 665 nm para acetona e acetonitrila, e em 670 nm para DMF (Figura 13). Os resultados demonstram que a ZnPc na presença de GO preserva seu comportamento monomérico típico, evidenciado pela não alteração do pico estreito na banda Q. Além disso, é possível observar a presença do GO no meio pelo aumento de absorbância na região da banda Soret na solução de acetona e acetonitrila (Figuras 13a, b). O sinal de GO está mais evidenciado na solução de MeCN, pois esta solução apresentava os menores valores de absorbância e no processo de normalização o aumento de absorbância causado pelo GO se tornou mais significativo no efeito visual, mas o significado quantitativo tem o mesmo valor do que o observado em acetona.

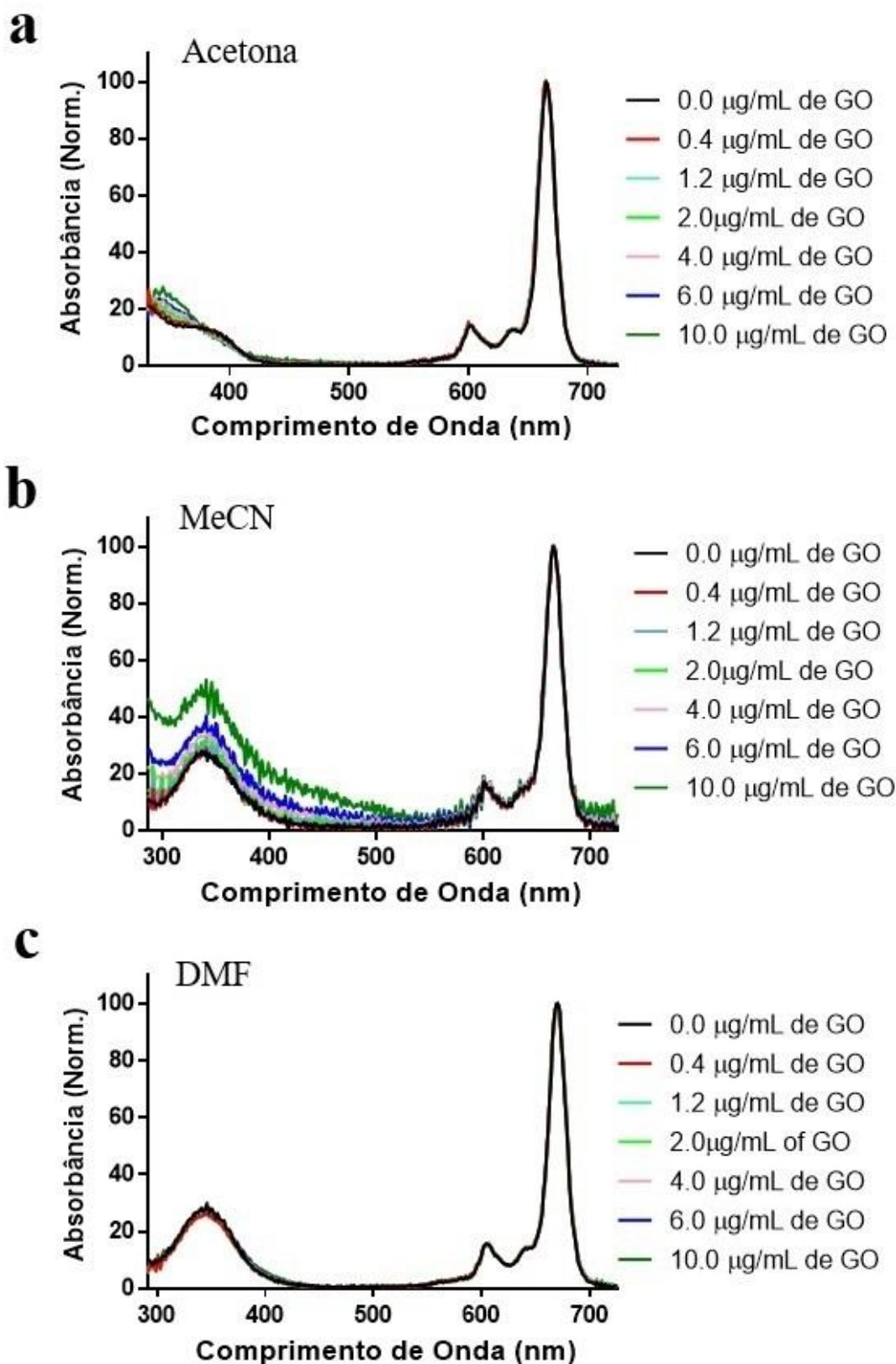


Figura 13. Espectro de absorbância normalizado (UV-vis) da solução de ZnPc ( $10 \mu\text{M}$ ) com adições consecutivas de GO, variando sua concentração no sistema. (a) Acetona (330 – 725 nm); (b) MeCN (285 – 725 nm); (c) DMF (290 – 725 nm).

Por outro lado, a ftalocianina tetranitro substituída apresenta uma banda Q mais larga, caracterizando um comportamento não monomérico, e os picos observados se alteram com a presença de GO, em diferentes concentrações. A solução de acetona (Figura 14a) apresenta dois picos na banda Q, um pequeno em 640 nm e outro maior em 678 nm. A banda solet para acetona não é representada completamente, pois o solvente apresenta interferência na resposta em comprimentos de onda mais curtos que 330 nm. Os picos na banda Q para o espectro de absorção da solução de acetonitrila são representando na Figura 14b, sendo um pequeno em 640 nm e um maior em 680 nm. Quando a primeira concentração de GO é adicionada (0,4 µg/mL), ambos os picos aumentam sua intensidade e o pico em 640 nm se torna o mais intenso. Com a contínua adição de GO, o pico em 680 nm tende a desaparecer e o pico em 640 nm diminuir a intensidade, além de ser possível notar um deslocamento para o azul dos picos na banda Q. Na solução de DMF (Figura 14c), estão presentes 3 picos na região da banda Q, um pequeno em 647 nm (Qx) e uma banda Qy dividida com o maior pico em 685 nm e um ombro em 700 nm. Com a adição de GO a banda Qx aumenta sua intensidade até se equiparar a banda Qy na concentração de 8 µg/mL de GO. As bandas Qx e Qy começam a diminuir a intensidade na concentração de 12 µg/mL, sendo que o ombro em 700 nm tende a desaparecer.

É interessante notar que para MeCN (Figura 14b) o pico em 640 nm não apresenta variação para as concentrações iniciais de GO (0,4, 2 e 4 µg/mL), enquanto o pico em 680 diminui. Para a solução de DMF (Figura 14c) a absorbância começa a cair somente na concentração de 12 µg/mL. Assim, este comportamento pode ser relacionado com a formação de diferentes complexos de  $ZnPc(NO_2)_4$ , com o GO influenciado pelos solventes. Olhando para a banda Soret das soluções em MeCN e DMF, foi observado um aumento na intensidade, provavelmente causados pela presença do GO.

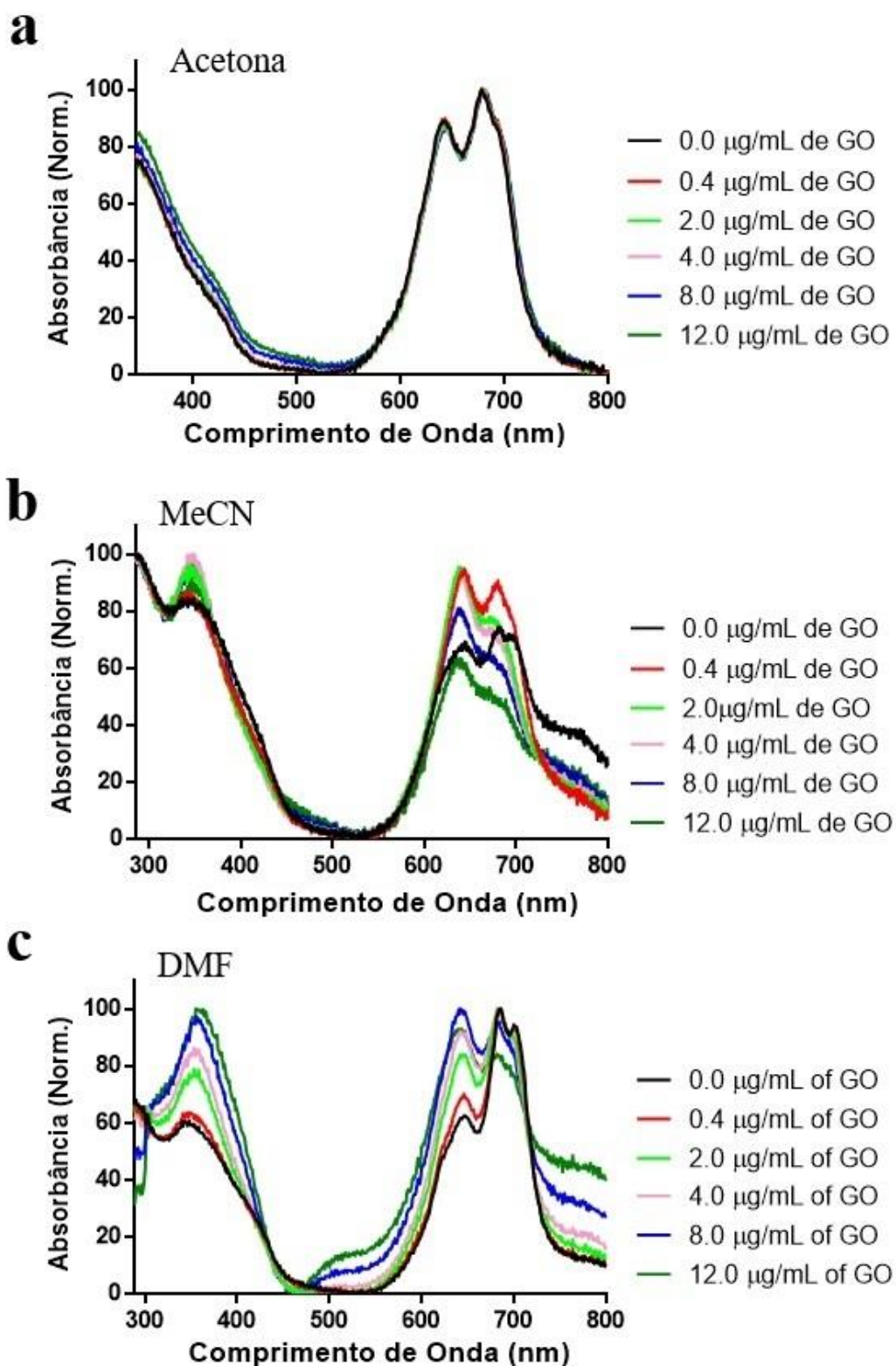


Figura 14. Espectro de absorvância normalizado (UV-vis) da solução de  $ZnPc(NO_2)_4$  ( $10 \mu M$ ) com adições consecutivas de GO, variando sua concentração no sistema. (a) Acetona (330 – 800 nm); (b) MeCN (285 – 800 nm); (c) DMF (290 – 800 nm).

### 5.3. Resposta de Fluorescência Decorrente da Adição de GO

O processo de supressão de fluorescência é um processo no qual a intensidade de fluorescência de um fluoróforo é reduzida. Sabe-se que a ligação não covalente de fluoróforo na superfície de GO, leva a supressão de fluorescência (KUNDU, *et al.*, 2015) pela indução de dois processos concomitantes; transferência de energia (TE) e transferência de elétrons fotoinduzida (TEF), do fotossensibilizador atuando como doador de elétrons e o GO como acceptor de elétrons (LI, *et al.*, 2016). O pico de emissão de fluorescência é drasticamente extinto na presença de GO na Figura 16, demonstrando que  $ZnPc(NO_2)_4$  é imediatamente adsorvido na superfície do GO. A intensidade de fluorescência diminui gradualmente com a adição de GO até praticamente desaparecer.

As interações eletrostáticas e empilhamento  $\pi$ - $\pi$  entre GO e fluorófilos são atribuídas por alguns estudos como sendo a causa da alta eficiência de supressão de fluorescência do GO (QI, *et al.*, 2010). O efeito do GO também foi observado em outros tipos de corantes e o seu papel no processo de supressão foi discutido em detalhes por (LIU, *et al.*, 2011 e TACHIKAWA, *et al.*, 2012). Entretanto, na Figura 15 nota-se que a fluorescência da  $ZnPc$  intrigantemente não é suprimida como a  $ZnPc(NO_2)_4$ . Uma possível explicação seria uma pequena torção rotacional da interação tipo face a face, resultando neste comportamento inesperado (ROSCH, YAO e WORTMANN, 2006). Somente há sinais de supressão de fluorescência na solução de  $ZnPc$  em MeCN (Figura 15b), provavelmente devido a maior tendência de agregação observada anteriormente nos testes de estabilidade para este solvente.

A supressão de fluorescência é um assunto que tem recebido atenção de longa data, por ser uma fonte de informação valiosa para o entendimento de sistemas bioquímicos. Apesar do aumento no número de estudos recentes publicados sobre a supressão de corantes orgânicos pelo grafeno, relatos similares ligados ao GO

permanecem escassos (FAN, *et al.*, 2013). A medida da supressão de fluorescência pode revelar a acessibilidade das ftalocianinas aos grupos funcionais do GO, além de ajudar a explicar os mecanismos relacionados a ligação destas moléculas, fornecendo pistas sobre a natureza do fenômeno de ligação, descobrindo estruturas únicas e informações sobre dinâmica.

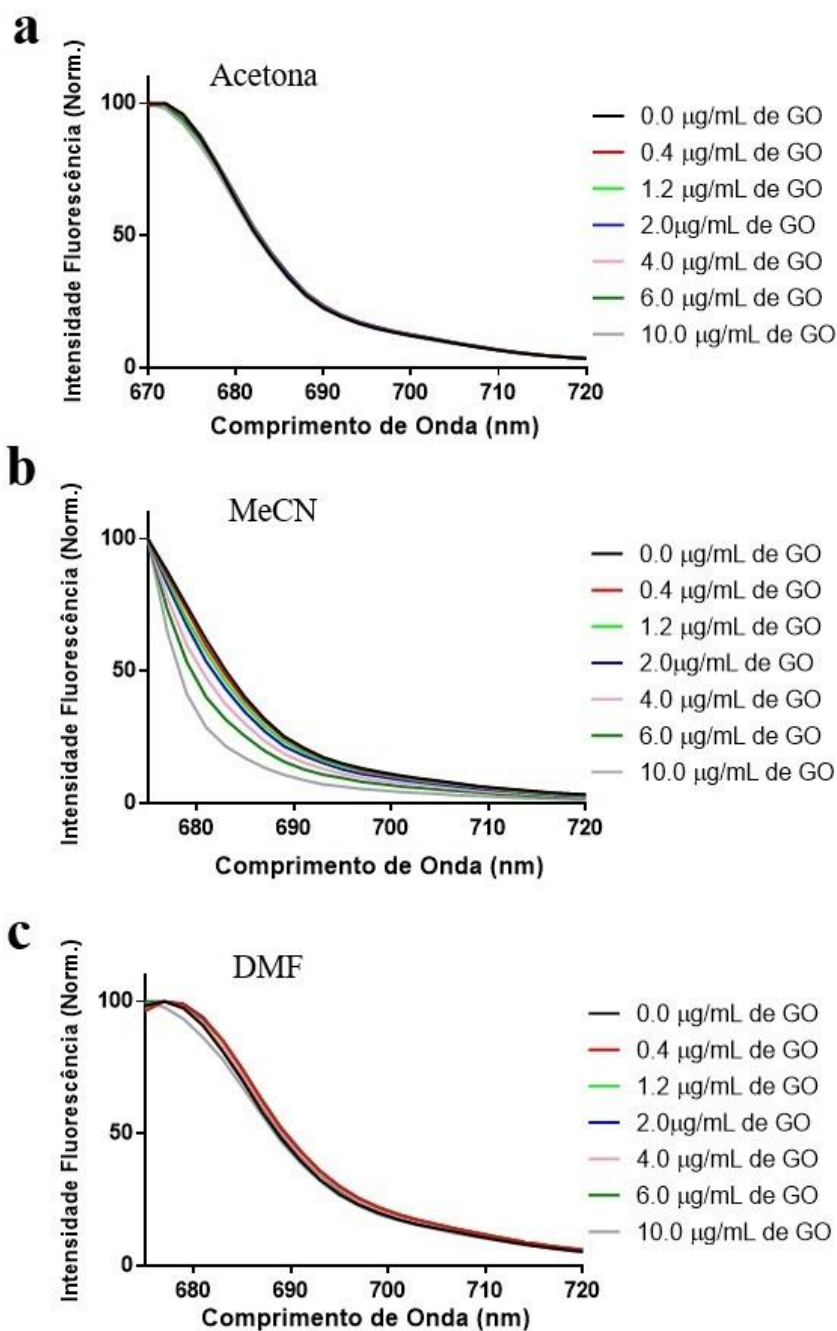


Figura 15. Espectro de fluorescência normalizado da solução de ZnPc (10 μM) com adições consecutivas de GO, variando sua concentração no sistema ( $\lambda_{ex} = 670$  nm). (a) Acetona (670 – 720 nm); (b) MeCN (675 – 720 nm); (c) DMF (675 – 720 nm).



Para a  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  em acetona na Figura 16a, o comprimento de onda de emissão máxima de fluorescência ( $\lambda_{\text{max}}$ ) foi observado em 700 nm. Quando a concentração de GO foi alterada de 0 para 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o  $\lambda_{\text{max}}$  não se alterou, mas nas adições seguintes de GO a supressão da fluorescência foi observada. Além disso, um deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$  para comprimentos de onda mais longo é evidenciado por volta de 705 nm.

Na solução de  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  em acetonitrila (Figura 16b) é possível observar a supressão da fluorescência do  $\lambda_{\text{max}}$ , em 705 nm, desde a primeira adição de GO, sem apresentar deslocamento aparente. Na Figura 16c, a solução de  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  em DMF nas primeiras adições de GO, a intensidade de fluorescência aumenta sem ocasionar deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$ , que se encontra em 708 nm. Sendo que quando a concentração de GO passa a ser igual ou superior a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ocorre o processo de supressão de fluorescência, e um deslocamento, para comprimentos de onda mais energético, do  $\lambda_{\text{max}}$  para 705 nm é observado. A análise de fluorescência de  $\text{ZnPc}$  presente na Figura 15 não demonstra deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$ .

Informações importantes do microambiente da interação entre GO e  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  podem ser reveladas através do deslocamento do pico de  $\lambda_{\text{max}}$ . Em sistemas biológicos, geralmente um deslocamento para comprimentos de onda mais energéticos indica que o agente fluorescente está exposto a um ambiente mais hidrofóbico (RASHID, *et al.*, 2015), e o deslocamento para comprimento de onda mais longos indica que ocorreu um aumento na polaridade e hidrofobicidade do ambiente molecular local (KENRY, LOH e LIM, 2016).

Teoricamente, a interação da ftalocianina tetra substituída com GO através do empilhamento  $\pi-\pi$ , deveria aumentar a hidrofobicidade do meio o qual o fluoróforo se encontra, e o deslocamento para o azul presente na solução com DMF (Figura 16c), pode ser um indicativo de uma interação bem-sucedida. Assim, o deslocamento para o vermelho presente na interação em solução de acetona (Figura 16a), pode indicar que a

interação entre o GO e a ftalocianina ocorre utilizando os grupos hidroxila e carbonila do GO, aumentando a hidrofiliabilidade do meio onde o fluoróforo se encontra.

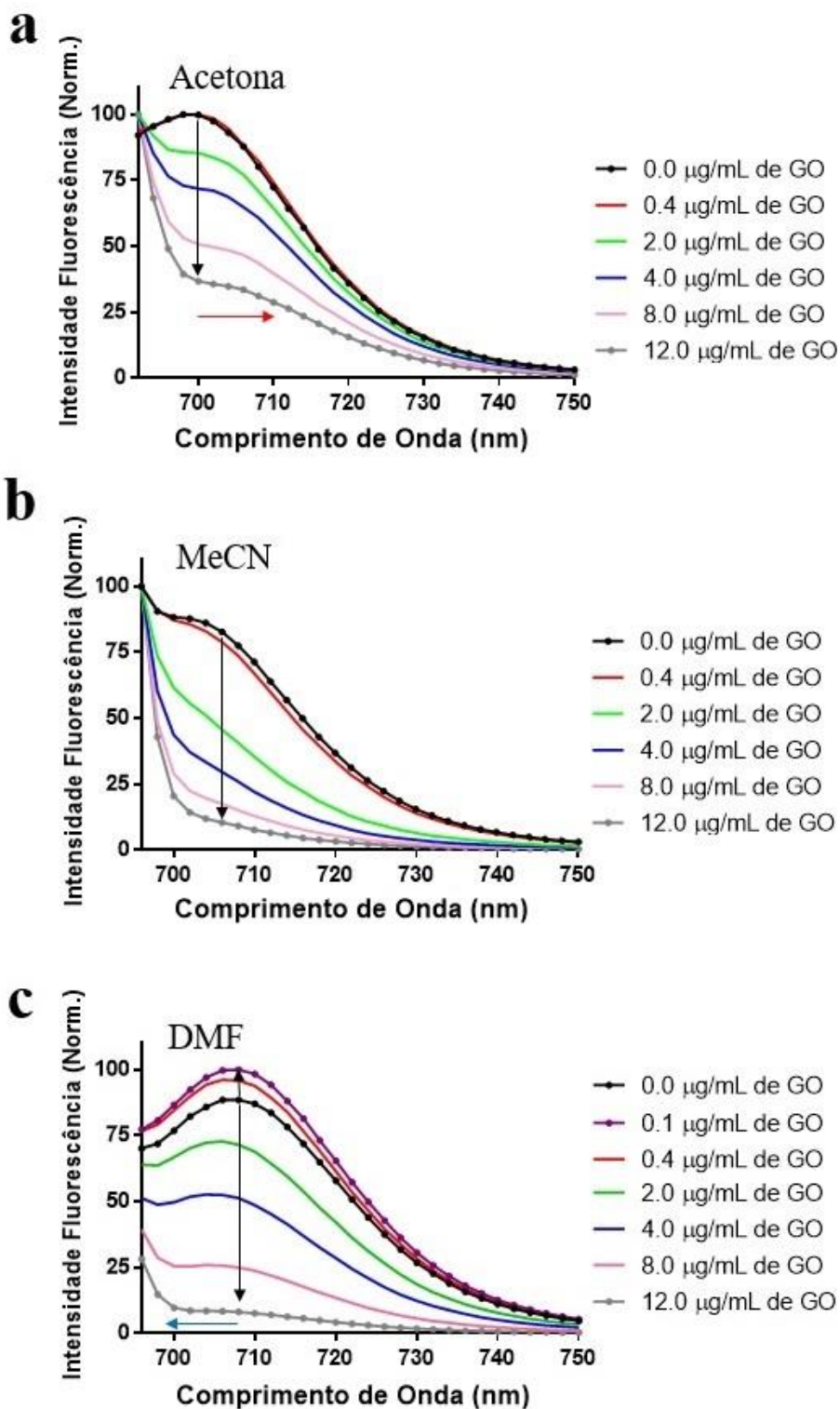


Figura 16. Espectro de fluorescência normalizado da solução de  $ZnPc(NO_2)_4$  ( $10 \mu M$ ) com adições consecutivas de GO, variando sua concentração no sistema ( $\lambda_{exc} = 685$  nm). (a) Acetona (685 – 750 nm); (b) MeCN (690 – 750 nm); (c) DMF (690 – 750 nm).

O comportamento clássico de agregação de monômeros para agregados do tipo H seria ocorrer um deslocamento hipsocrômico da absorbância e um deslocamento batocrômico da fluorescência e uma forte supressão da fluorescência. Para agregados do tipo J, os deslocamentos seriam ao contrário, sendo um deslocamento batocrômico para a absorbância e um deslocamento hipsocrômico da fluorescência, com aumento da intensidade de fluorescência (DENG, *et al.*, 2004). Como já foi dito anteriormente, de acordo com a literatura, a presença do GO induz a formação de agregados do tipo H (SINOFOROGLU, *et al.*, 2013).

Entretanto, no nosso sistema não foi observado para  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  o comportamento típico dos H-agregados. Na solução de acetona, não foi observada resposta significativa de variação da intensidade de absorbância (Figura 14a), mas o espectro de fluorescência deslocou para comprimento de onda mais longo (Figura 16a). A solução de MeCN apresentou deslocamento para o azul nos espectros de absorbância (Figura 14b), mas não foi observado deslocamento dos espectros de fluorescência (Figura 16b). Por fim, na solução de  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  em DMF, o deslocamento ocorreu para comprimento de onda mais energético nos espectros de absorbância (Figura 14c) e fluorescência (Figura 16c). Além disso, ao se observar cuidadosamente o gráfico em DMF em baixas concentrações de GO, ocorre um aumento de intensidade, o que seria característica de formação de J-agregados. Portanto, estes resultados indicam a forte influência que o solvente tem nas posições dos espectros e formação de agregados (GIERSCHNER, *et al.*, 2013).

#### **5.4. Modelo Matemático de Stern-Volmer**

Os dados de fluorescência foram analisados pela equação de Stern-Volmer (SV) (ZENG e DUROCHER, 1995), assumindo que o processo de interação das ftalocianinas com o GO ocorreu em condições de equilíbrio. Para explicar o processo de supressão de fluorescência, dois mecanismos são descritos como os principais; supressão dinâmica e supressão estática. Estes processos podem ocorrer devido a transferência de elétrons do

estado excitado do corante para o GO, que atua como acceptor de elétrons (TACHIKAWA, *et al.*, 2012). A supressão dinâmica ocorre quando o tempo de meia vida do fluoróforo excitado decresce, e a supressão estática acontece quando o tempo de meia vida permanece inalterado (DOOSE, NEUWEILER e SAUER, 2009). É sabido que a supressão de fluorescência é regida primariamente pelo transporte difuso em baixas concentrações (LACERDA, *et al.*, 2010).

Como pode ser observado na Figura 17, o gráfico demonstra um padrão linear, o que é uma grande evidencia que o processo de supressão da fluorescência é regido principalmente pelo efeito de supressão dinâmica (efeito colisional), o qual ocorre devido ao acoplamento das ftalocianinas na superfícies do GO por interações químicas fracas, como as interações  $\pi$ - $\pi$ . A ZnPc expressou valores de  $K_{sv}$  de  $(1,18 \pm 0,08) \times 10^{-2} M^{-1}$  em solução de DMF e de  $(4,84 \pm 0,17) \times 10^{-2} M^{-1}$  em MeCN,  $ZnPc(NO_2)_4$  expressou valores de  $K_{sv}$  de  $(14,43 \pm 2,5) \times 10^{-2} M^{-1}$  em DMF e de  $(50,86 \pm 4,19) \times 10^{-2} M^{-1}$  em solução de MeCN. Estes valores mostram que o  $K_{sv}$  das ftalocianinas tetra substituídas é 10 vezes maior em ambos os solventes do que a espécie não substituída, e o  $K_{sv}$  é aproximadamente 4 vezes maior em MeCN do que em DMF para ambos os fluoróforos.

Para verificar se o processo de supressão é decorrente de um simples processo de desativação do estado excitado por Conversão Interna, ou por um processo de aumento no Cruzamento Intersistemas como visto no Diagrama de Jablonski na Figura 6, foram realizadas medidas da produção de oxigênio singlete registrado nas Figuras 19 e 20 e os resultados numéricos foram arranjados na Tabela 1.

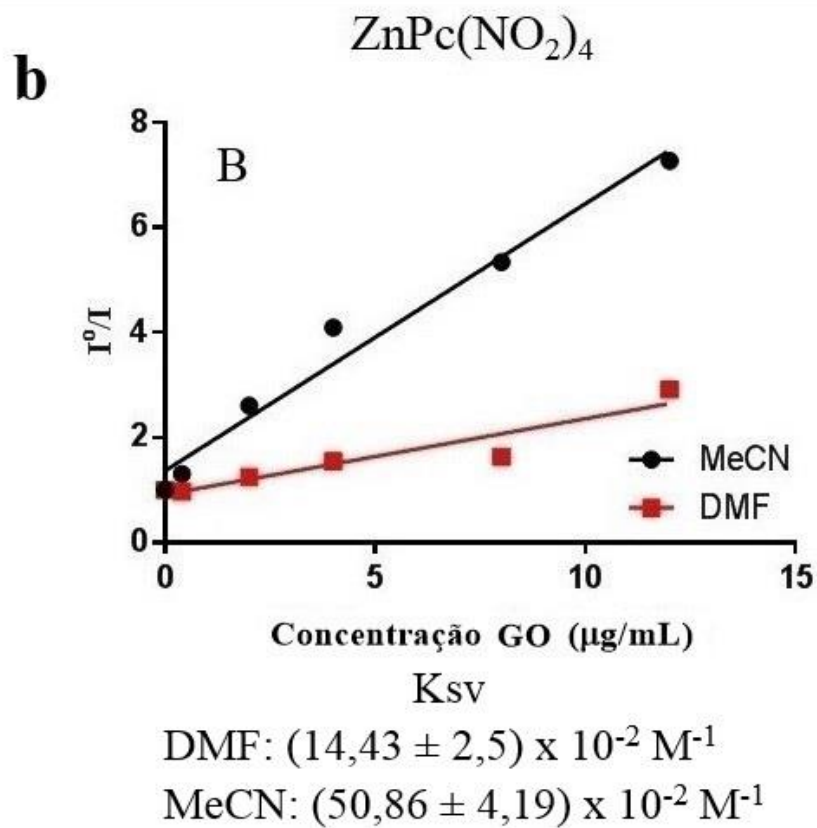
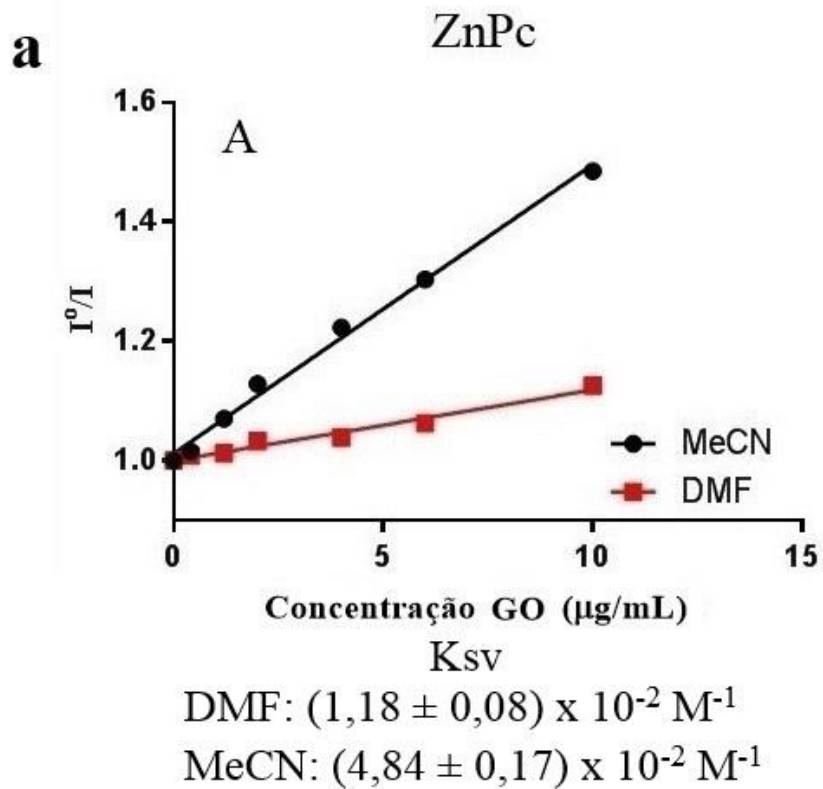


Figura 17. Gráfico de Stern-Volmer da eficiência de supressão de fluorescência das ftalocianinas; (a) ZnPc ( $\lambda_{ex} = 670 \text{ nm}$ ); (b) ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> ( $\lambda_{ex} = 685 \text{ nm}$ ).

## 5.5. Modelo Matemático de Hill

Para avaliar a força e a cooperatividade da interação, ZnPc-GO e ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-GO, foi extrapolado o modelo matemático da equação de Hill na Figura 18, que normalmente utilizado para sistemas biológicos (ex: sítios de ligação de proteínas), pois a concentrações dos materiais desempenha um papel crítico no processo de agregação molecular. Em condições experimentais otimizadas, as folhas de GO levam a formação de agregados em arranjo face a face, devido as interações cooperativas  $\pi$ - $\pi$  e eletrostáticas dos corantes com o GO (SINOFOROGLU, *et al.*, 2013). Sendo assim, é necessário quantificar parâmetros chave que descrevem a associação entre as ftalocianinas e o GO, tais como; saturação de ligação  $Q$ , constante de dissociação de ligação  $K_d$  e o coeficiente de Hill  $n$ , assumindo que a ligação das ftalocianinas no GO ocorre sobre condições de equilíbrio (KENRY, LOH e LIM, 2016).

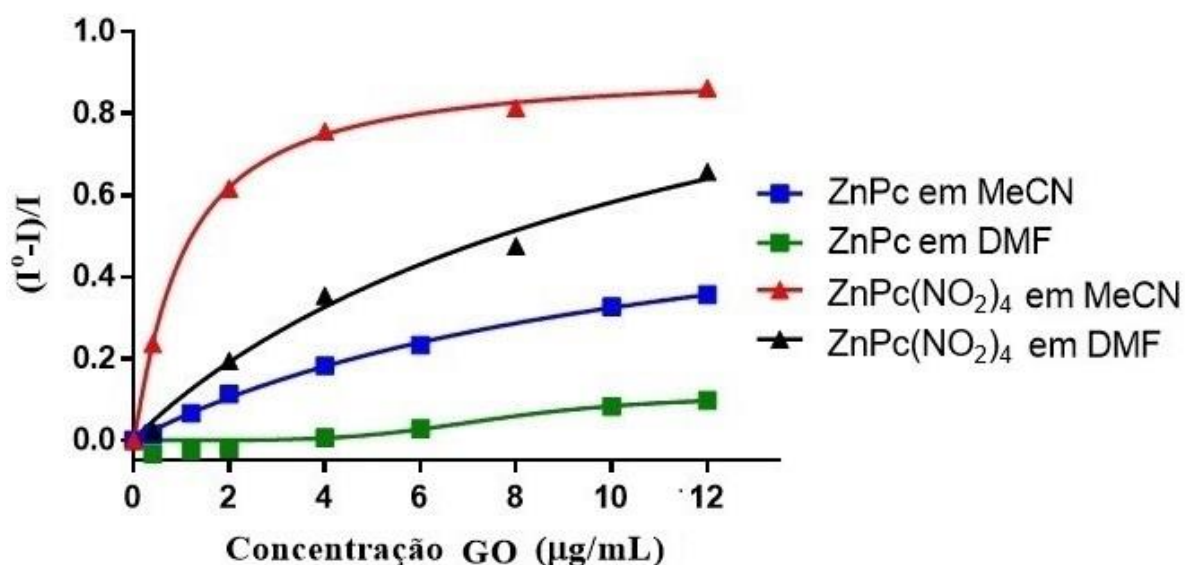


Figura 18. Propriedades da supressão de fluorescência das ftalocianinas em GO. Ligação específica da análise de Hill em ZnPc e ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>. Relação da saturação de ligação  $Q$  (eixo y), com a concentração de GO (eixo x).

A interação do fluoróforo tetra substituído com o GO mostra na Figura 18 uma constante de saturação (Q) maior, do que para a ZnPc, e para as duas ftalocianinas a interação é maior usando MeCN como solvente. A interação de ZnPc e GO em DMF sugere uma curva sigmoide, o que indica que a possibilidade de ter mais de um sitio de ligação ou apresenta cooperatividade positiva ou negativa (CHOU e TALALAY, 1984). Além disto, é conhecido que quando o coeficiente de *hill n* é significativamente diferente de 1,0, implica que a reação de ligação é mais complexa, e uma análise simples de segunda ordem não é adequada para descrever a reação e mais detalhes cinéticos de análise são requeridos (WEILAND e MOLINOFF, 1981).

Assim, a interação de ZnPc e GO em DMF apresentou um coeficiente de Hill de aproximadamente 5,34, implicando um possível processo cooperativo durante o processo de ligação, enquanto para ZnPc em MeCN e ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> em ambos os solventes o coeficiente de Hill foi de aproximadamente 1,0, o que indica um processo de ligação independente e que as interações estão ocorrendo somente com um sitio de ligação, provavelmente ocorrendo sobre as condições ideais esperadas para que o GO leve a formação de agregados do tipo H, como já havia sido sugerido pela presença de deslocamento para comprimento de onda azul nas análises de absorbância.

O efeito contraditório implicando um processo de ligação mais complicado para a ZnPc na superfície de GO pode ser elucidado pela descrição da interação entre dipolos de transição de monômeros em dímeros moleculares (YANAGISAWA, *et al.*, 2013), apresentando uma estrutura vibracional mais complicada combinando características de agregação do tipo H e J.

A solução de ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> em MeCN apresentou o menor valor de K<sub>d</sub> 1,015 ± 0,182 μM, enquanto a ZnPc apresentou o maior valor de K<sub>d</sub> 11,000 ± 1,613 μM no mesmo solvente. A solução de DMF com ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> e ZnPc não apresentam diferenças significativas nos valores de K<sub>d</sub>, sendo 6,692 ± 2,044 μM e 7,050 ± 1,712

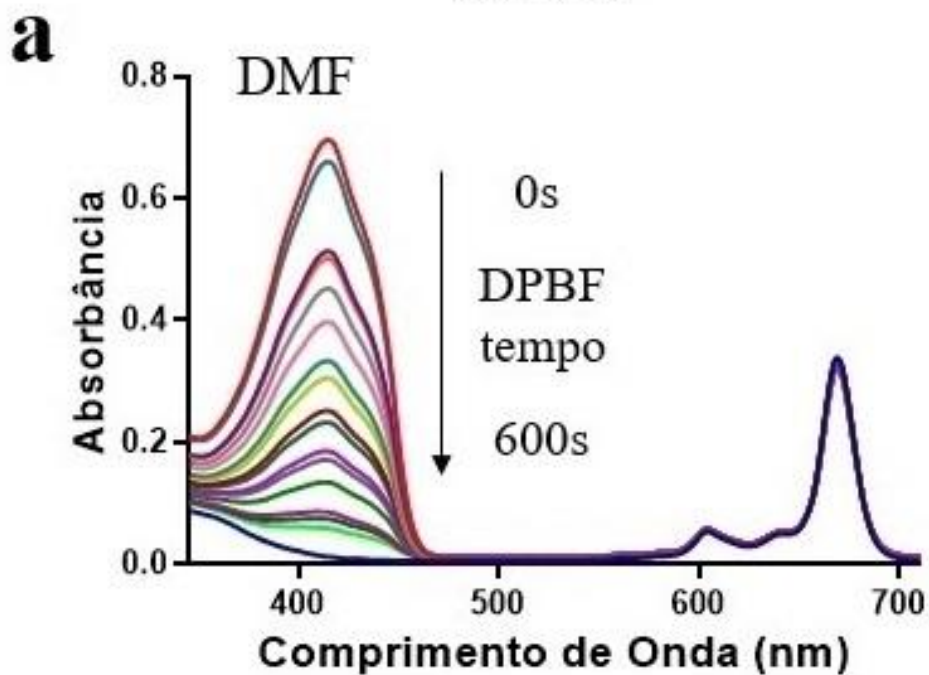
$\mu\text{M}$ , respectivamente. Entretanto, não existem dados na literatura do número de sítios de ligação e constantes de associação para interação de GO com ftalocianinas. Um estudo similar com ftalocianina tetra sulfonada ligada a proteínas príon apresentaram  $K_d$  de 8,5  $\mu\text{M}$  (DEE, *et al.*, 2012) e outro estudo com ftalocianinas de alumínio sulfonadas ligadas a albumina de soro humano com  $K_d$  de 2,5  $\mu\text{M}$  (GANTCHEV, OUELLET e VAN LIER 1999).

### **5.6. Produção de Oxigênio Singlete**

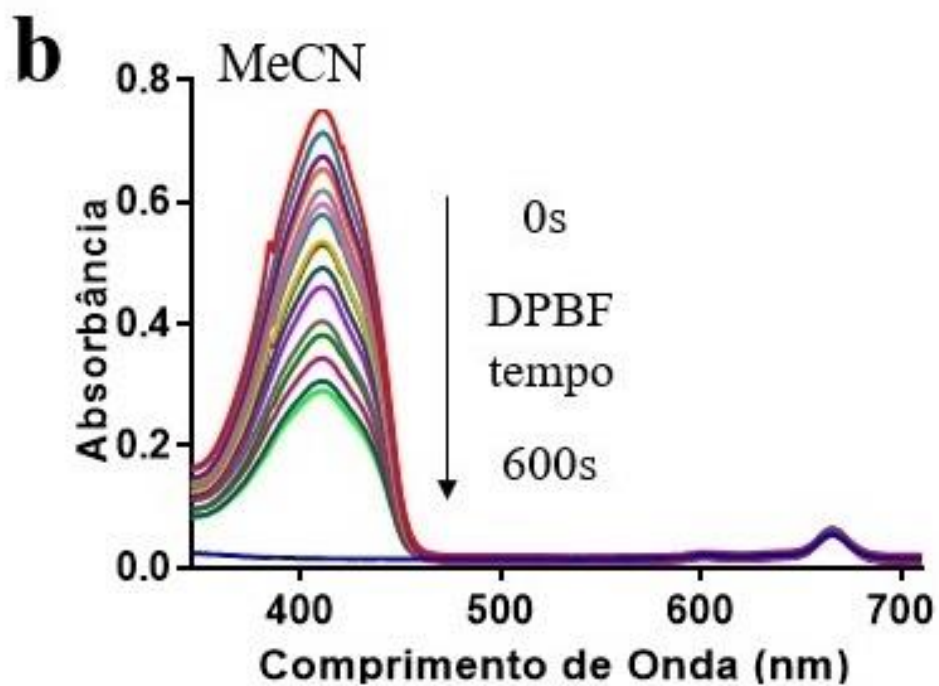
A atividade fotodinâmica de ZnPc e ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> livres foi avaliada e comparada em relação aos compostos interagindo com GO. As soluções de ftalocianinas tiveram a concentração reduzida para aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ , para evitar a formação de resíduos que possam interferir nos resultados e a concentração de GO foi fixada em 8  $\mu\text{g/mL}$ . A habilidade de produção de oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) pelas ftalocianinas foi verificada usando 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF), analisando o decréscimo na absorbância de DPBF, monitorada em 417 nm durante a irradiação com laser vermelho como mostra as Figuras 19 e 20. A linha de menor intensidade, representada pela cor azul nos gráficos, demonstra o perfil da solução antes da adição do DPBF. A avaliação da atividade fotodinâmica utilizando o DPBF é um método indireto e tem sido bastante utilizado para fornecer análises quantitativas da produção de oxigênio singlete, uma vez que o produto da reação (1,2-dibenzylbenzene) não absorve luz no comprimento de onda de UV-vis. A simplicidade do método surge da correlação entre a redução da absorbância de DPBF e o rendimento quântico de oxigênio gerado por processo fotoluminescente de tipo II (ZHANG e LI, 2011).



# ZnPc



# ZnPc



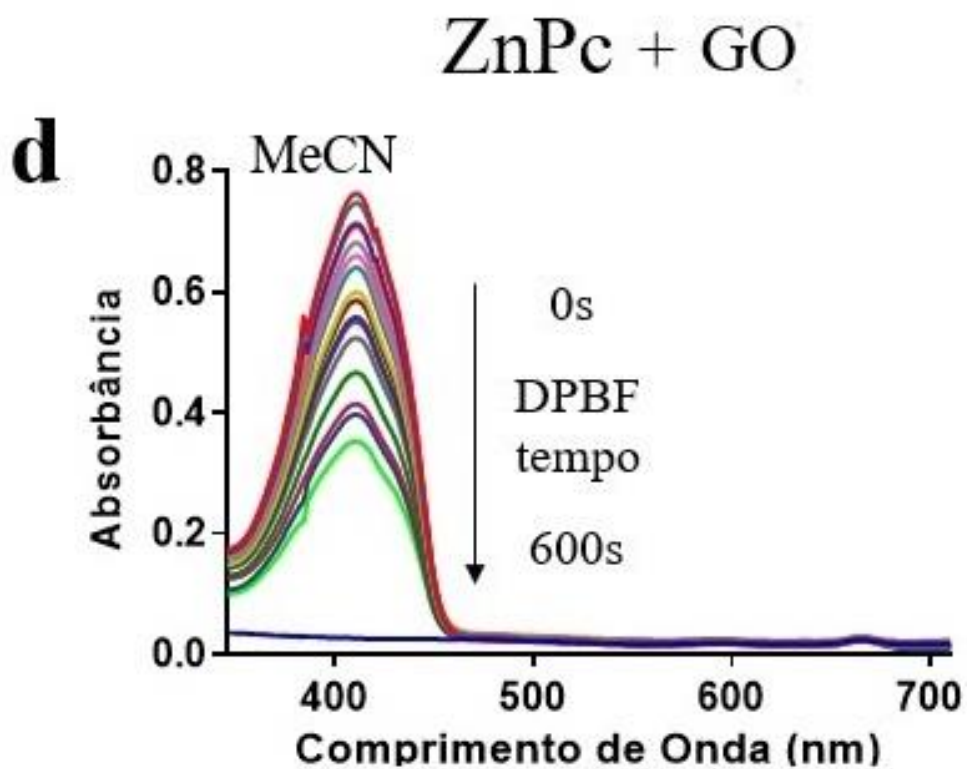
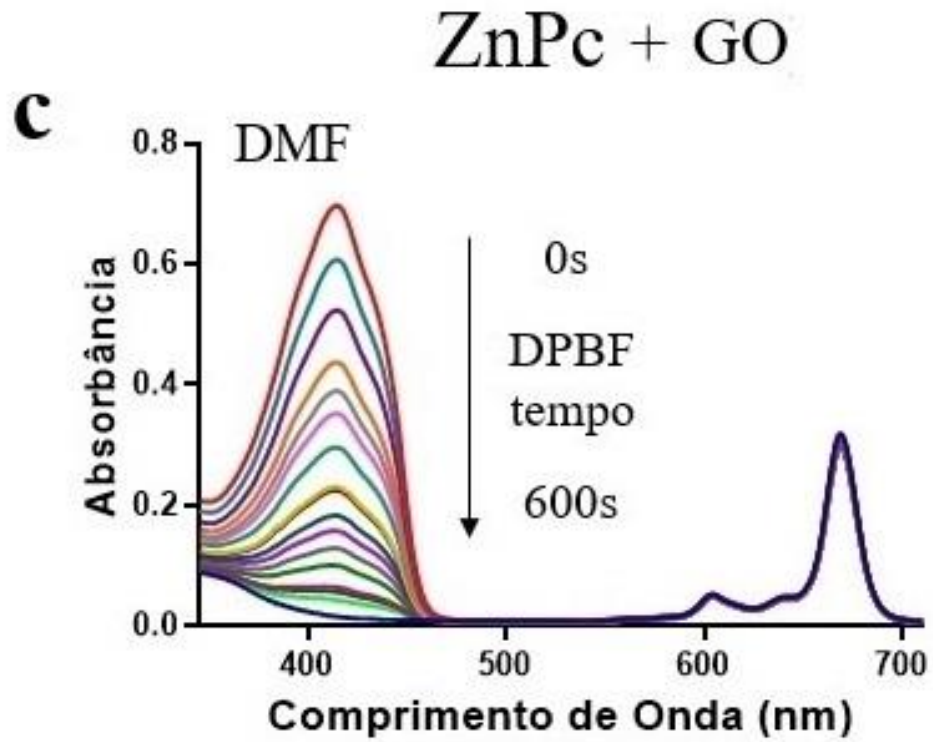
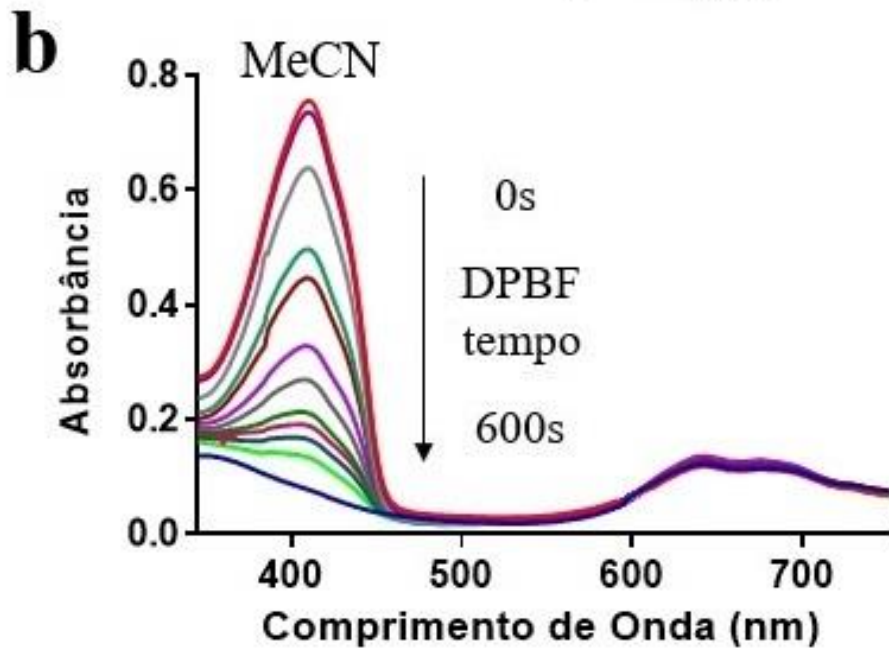
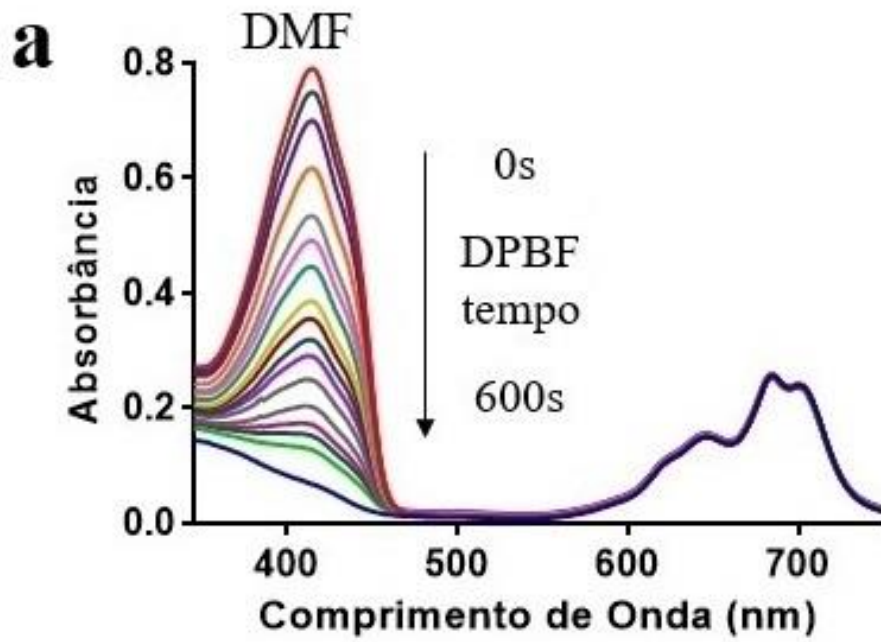
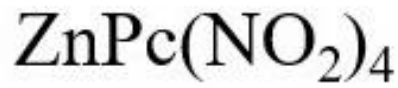


Figura 19. Perfil da fotodegradação de DPBF (417 nm) pela irradiação de laser vermelho (637 nm) na presença de ZnPc livre e interagindo com GO; (a) ZnPc livre em DMF; (b) ZnPc livre em MeCN; (c) ZnPc + GO em DMF; (d) ZnPc + GO em MeCN.



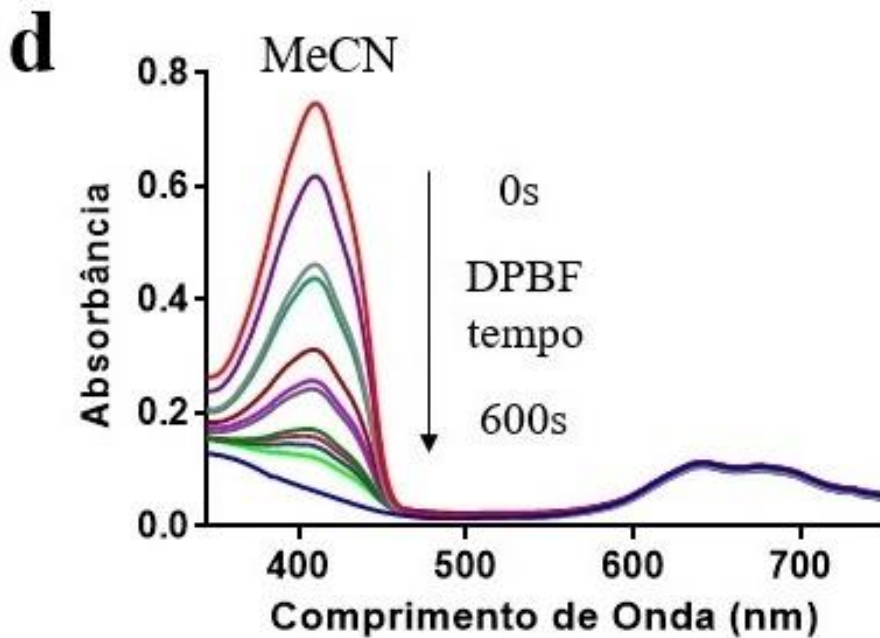
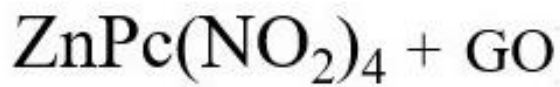
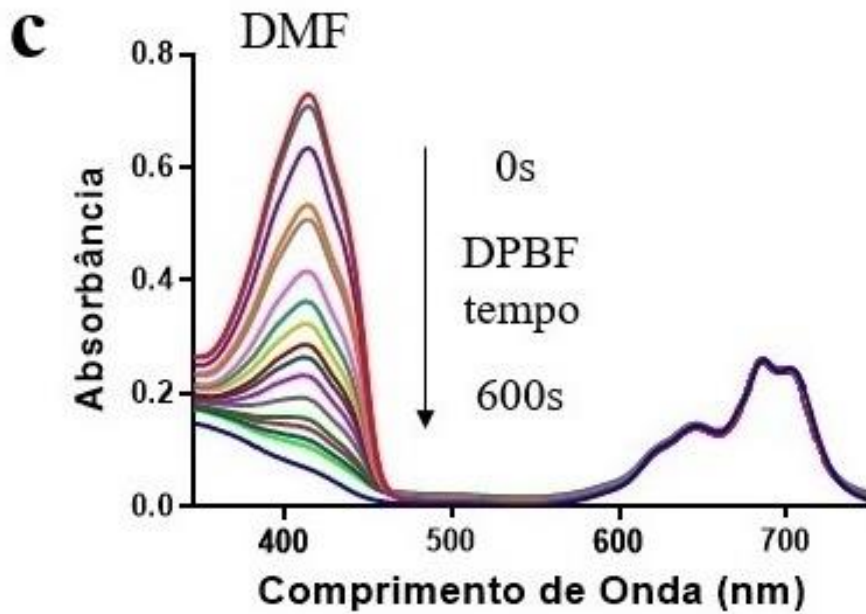
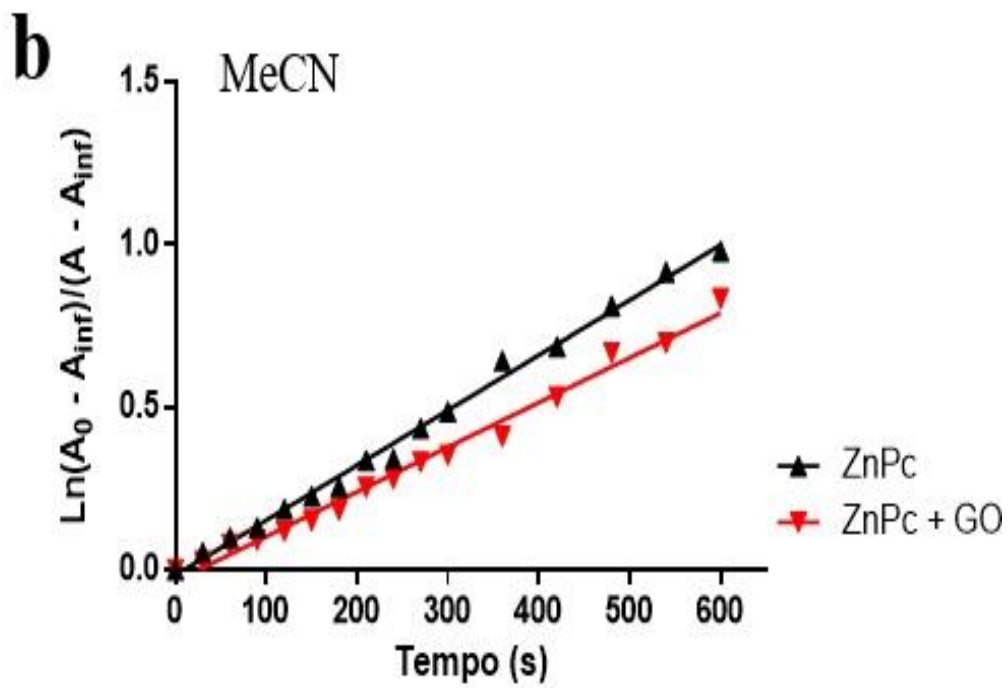
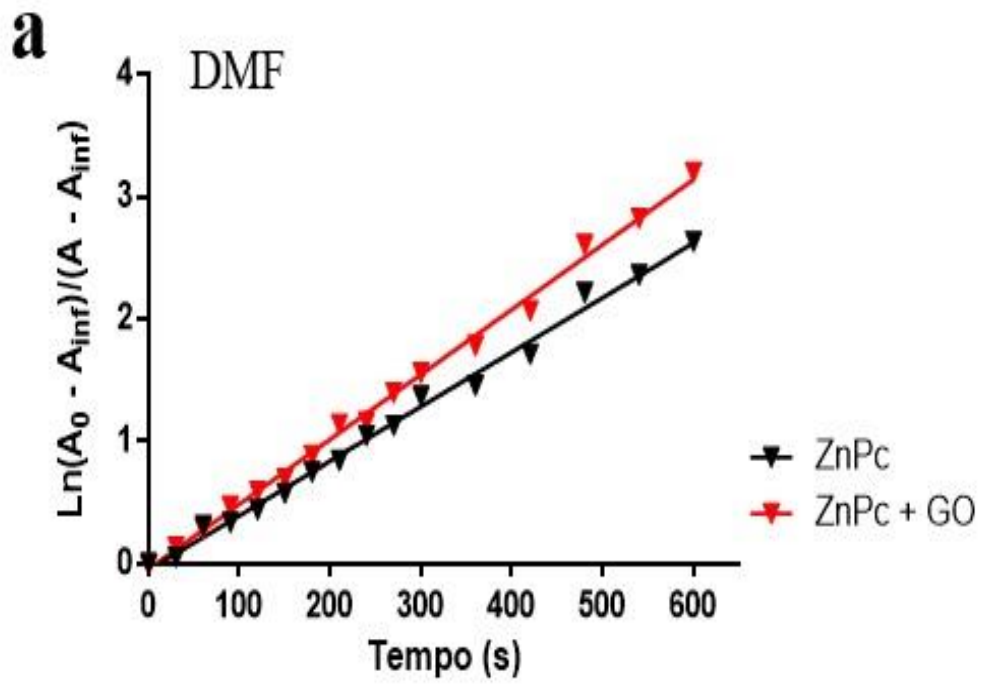


Figura 20. Perfil da fotodegradação de DPBF (417 nm) pela irradiação de laser vermelho (637 nm) na presença de  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  livre e interagindo com GO; (a)  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  livre em DMF; (b)  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  livre em MeCN; (c)  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4 + \text{GO}$  em DMF; (d)  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4 + \text{GO}$  em MeCN.

A geração de oxigênio singleto ocorre quando um fotossensibilizador ativado é excitado em seu estado tripleto interagindo com o oxigênio no seu estado tripleto fundamental. A avaliação da habilidade de ftalocianinas de produzirem espécies reativas de oxigênio em solventes orgânicos e soluções aquosas pode ser valiosa para prever a atividade *in vitro* contra células cancerosas ou microrganismos (DLUGASZEWSKA, *et al.*, 2017).

A fotodegradação de ZnPc ou ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> não foi verificada, uma vez que suas respectivas bandas Q de absorção em 670 nm e 685nm permaneceram inalteradas (Figuras 19 e 20). A reação pode ser visualmente monitorada pela mudança da cor da solução de amarelo para incolor, devido a degradação do DPBF quando iluminado pelo laser vermelho (25mW) de comprimento de onda de 637 nm. Além disso, é possível observar que a degradação do DPBF é visualmente menos intensa para a solução com ZnPc em MeCN (Figura 19b, d) do que em DMF (Figura 19a, c). Este efeito provavelmente acontece pelo mesmo princípio discutido na etapa de estabilização da solução ZnPC em MeCN (Figuras 9b e 11b). Para a solução contendo ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> (Figura 20) a degradação de DPBF ocorre visualmente de forma equivalente em ambos solventes.

O perfil da fotodegradação do DPBF em solução contendo ftalocianinas livres e interagindo com o GO, seguiu uma cinética de primeira ordem típica, como ilustrado na Figura 21. Os gráficos demonstram um perfil fotodegradação do DPBF, apresentando uma constante de degradação ( $K_{DPBF}$ ) visualmente maior, em solução de DMF para as ftalocianinas, do que em MeCN. O perfil gráfico de fotodegradação também sugere uma maior degradação do DPBF ao longo do tempo na presença de GO.



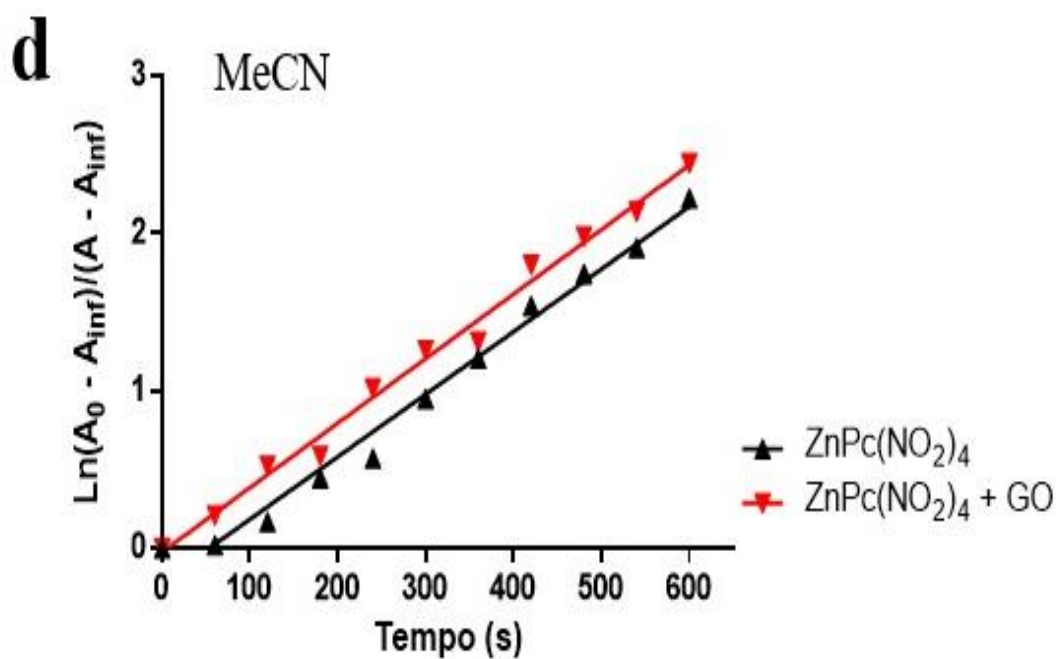
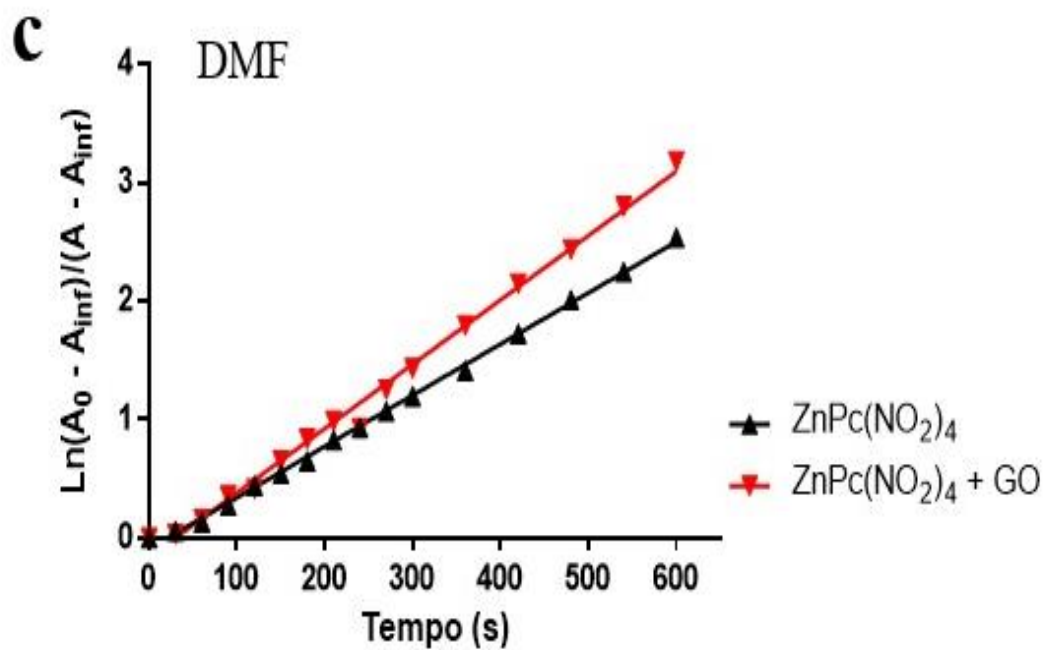


Figura 21. Perfil da cinética de primeira ordem da fotodegradação de DPBF (417 nm); (a) ZnPc em DMF; (b) ZnPc em MeCN; (c)  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  em DMF; (d)  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  em MeCN.

O rendimento quântico de oxigênio ( $\Phi_{\Delta}$ ) é o parâmetro mais importante para se avaliar em atividade fotodinâmica. O  $\Phi_{\Delta}$  é a razão do número de moléculas de  $^1\text{O}_2$  produzidas em relação ao número de fótons absorvidos pelo fotossensibilizador (ROMERO, *et al.*, 2013). Uma determinação precisa do  $\Phi_{\Delta}$  é difícil devido a possibilidade de agregação do fotossensibilizador em solução, o qual reduz a sua atividade fotobiológica. O processo de agregação é associado ao deslocamento batocrômico ou ao deslocamento hipsocrômico da banda Q (SOUZA, *et al.*, 2016). Nenhum deslocamento foi observado durante os testes de fotodegradação.

Tabela 1. Constante de fotodegradação do DPBF ( $K_{\text{DPBF}}$ ) monitorada em 417 nm e o rendimento quântico de oxigênio singlete ( $\Phi_{\Delta}$ ) calculado com base na  $K_{\text{DPBF}}$  para as soluções de ZnPc e  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$ , livres e na presença de GO, irradiadas por laser de diodo no comprimento de onda de 637 nm.

<b>Ftalocianinas Livres</b>	<b><math>K_{\text{DPBF}}(\text{s}^{-1})</math></b>	<b><math>\Phi_{\Delta}</math></b>
<b>ZnPc DMF</b>	$(4.45 \pm 0.20) \cdot 10^{-3}$	0.56 <small>Długaszewska, 2017</small>
<b>ZnPc/GO DMF</b>	$(5.31 \pm 0.18) \cdot 10^{-3}$	$0.71 \pm 0.008$
<b>ZnPc MeCN</b>	$(1.69 \pm 0.001) \cdot 10^{-3}$	$0.50 \pm 0.002$
<b>ZnPc/GO MeCN</b>	$(1.37 \pm 0.001) \cdot 10^{-3}$	$0.71 \pm 0.012$
<b>ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> DMF</b>	$(4.32 \pm 0.10) \cdot 10^{-3}$	$0.25 \pm 0.005$
<b>ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>/GO DMF</b>	$(5.43 \pm 0.24) \cdot 10^{-3}$	$0.32 \pm 0.0001$
<b>ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub> MeCN</b>	$(3.97 \pm 0.38) \cdot 10^{-3}$	$0.27 \pm 0.014$
<b>ZnPc(NO<sub>2</sub>)<sub>4</sub>/GO MeCN</b>	$(4.09 \pm 0.29) \cdot 10^{-3}$	$0.29 \pm 0.007$

Geralmente, ftalocianinas substituídas apresentam menor rendimento quântico de oxigênio (KUCINSKA, *et al.*, 2015). Como poder ser observado na tabela 1, os valores de  $\Phi_{\Delta}$  para a ZnPc é maior do que o rendimento de  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$ , assim como o esperado. Quando os fluoro filis entraram em contato com GO, o  $\Phi_{\Delta}$  aumentou para ambas as metaloftalocianinas, exibindo uma excelente habilidade de gerar oxigênio singlete, com relativo alto potencial para a utilização em terapia fotodinâmica. O aumento na fluorescência de ftalocianina de zinco tetra sulfonada por análogos de



grafeno já foi reportado (WANG, J, *et al.*, 2017), e os autores sugerem que quantum dots de grafeno (QGDs) aumentam o rendimento de fluorescência de um pico anormal de fluorescência derivado do estado triplete excitado da ftalocianina. Um alto rendimento do triplete com um correspondente baixo rendimento quântico de fluorescência sugerem um cruzamento entre sistemas mais eficiente, o qual é desejável para compostos que são destinados para uso como fotossensibilizadores. A habilidade da molécula em ter um tempo de vida longo populando o estado triplete é importante, uma vez que isto tem influência direta na produção de oxigênio singleto (NWAHARA, BRITTON e NYOKONG, 2017).

## 6. Conclusão

Neste trabalho, foram investigadas as interações de um potencial modelo terapêutico (metaloftalocianinas ligadas não covalentemente em GO), através da variação das condições experimentais. Dos estudos de absorção, aparentemente a  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  conseguiu ser adsorvida na superfície do GO, devido os deslocamentos e variação dos picos de intensidade na presença do derivado de grafeno. Apesar da interação parecer clara para  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$ , essa relação não é facilmente observada para a  $\text{ZnPc}$ . Durante os estudos de fluorescência em estado estacionário, foi visto que ocorrem deslocamentos no  $\lambda_{\text{max}}$ , que provavelmente são decorrentes da conjugação das metaloftalocianinas com o GO, e o efeito de supressão foi observado. As constantes de ligação calculadas para o complexo GO-Pc se mostram bastante dependentes do meio.

$\text{ZnPc}$  e  $\text{ZnPc}(\text{NO}_2)_4$  são fotossensibilizadores promissores para aplicação em terapia fotodinâmica. O rendimento quântico de fluorescência foi eficientemente suprimido pelo GO, entretanto o rendimento quântico de oxigênio singlete aumentou, mostrando grande absorção em comprimentos de onda longos. Provavelmene este aumento do rendimento quântico de oxigênio singlete é decorrente do processo de transferência de energia da folha de óxido de grafeno para a ftalocianina, o qual amplificou o processo de conversão intersistemas, elevando a quantidade de elétrons no estado triplete capazes de interagir com o oxigênio molecular.

## 7. Referências bibliográficas

ANTOSIEWICZ, J. K.; SHUGAR, MD. UV-vis spectroscopy of tyrosine side-groups in studies of protein structure. Part 1: basic principles and properties of tyrosine chromophore. **Biophysical Reviews**, v. 8, n. 2, p. 151-161, 2016.

ATHAR, M.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D. R. Differential role of reactive oxygen intermediates in photofrin-I-mediated and photofrin-II-mediated photoenhancement of lipid peroxidation in epidermal microsomal membranes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 90, p. 652-657, 1988.

ASAHI, R.; MORIKAWA, T.; OHWAKI, T.; AOKI, K.; TAGA. Visible-Light Photocatalysis in Nitrogen-Doped Titanium Oxides. **Science**, v. 293, n. 5528, p. 269-271, 2001.

BARBOSA-GARCIA, O.; RAMOS0ORTIZ, G.; MALDONADO, J. L.; PICHARDO-MOLINA, J. L.; MENESES-NAVA, M. A.; LANDGRAVE, J. E. A.; CERVANTES-MARTINEZ, J. Uv-vis absorption spectroscopy and multivariate analysis as a method to discriminate tequila. **Spectrochimica Acta Parta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 66, n. 1, p. 129-134, 2007.

BOZKURT, E.; ACAR, M.; MERAL, K.; ARIK, M.; ONGANER. Photoinduced interactions between coumarin 151 and colloidal CdS nanoparticles in aqueous suspension. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 236, p. 41-47, 2012.

BOZKURT, E.; ACAR, M.; ONGANER, Y.; MERAL, K. Rhodamine 101-graphene oxide composites in aqueous solution: the fluorescence quenching process of rhodamine 101. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, p. 18276-18281, 2014.

CHEN, Y-W.; SU, Y-L.; HU, S-H.; CHEN, S-Y. Functionalized graphene nanocomposites for enhancing photothermal therapy in tumor treatment. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 105, p. 190-204, 2016.

CHOU, T-C.; TALALAY, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 22, p. 27-55, 1984.

CLAESSENS, C. G.; HAHN, U.; TORRES, T. Phthalocyanines: from outstanding electronic properties to emerging applications. **Chemical Record**, v. 8, p. 75-97, 2008.

COREY, E. J.; MEHROTRAN, M. M.; KHAN, A. U. Water induced dismutation of superoxide anion generates singlet molecular oxygen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 145, p. 842-846, 1987.

DEE, D. R.; GRUPTA, A. N.; ANIKOVSKIY, M.; SOSOVA, I.; GRANDI, E.; RIVERA, L.; VINCENT, A.; BRIGLEY, A. M.; PETERSON, N. O.; WOODSIDE, M. T. Phthalocyanine tetrasulfonates bind to multiple sites on natively-folded prion protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 826-832, 2012.

DENG, Y.; YUAN, W.; JIA, Z.; LIU, G. H- and J-Aggregation of Fluorene-Based Chromophores. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, p. 14536-14545, 2014.

DLUGASZEWSKA, J.; SZCZOLKO, W.; KOCZOROWSKI, T.; SKUPIN-MRUGALSKA, P.; TEUBERT, A.; KONOPKA, K.; KUCINSKA, M.; MURIAS, M.; DUZGUNES, N.; MIELCARREK, J.; GOSLINSKI, T. Antimicrobial and anticancer photodynamic activity of a phthalocyanine photosensitizer with n-methyl morpholiniumethoxy substituents in non-peripheral positions. **J. Inorganic Biochemistry**, v. 172, p. 67-69, 2017.

DOOSE, S.; NEUWEILER, H.; SAUER, M. Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer: A Reporter for Conformational Dynamics of Macromolecules. **Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry**, v. 10, p. 1389-1398, 2009.

DREYER, D. R., PARK, S.; BIELAWSKI, C. W.; RUOFF, R. S. The chemistry of graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 228-240, 2010.

EISFELD, A.; BRIGSS, J. S. The J- and H-bands of organic dye aggregates. **Chemical Physics**, v. 324, p. 376-384, 2006.

FAN, K-L.; GUO, Z-K.; GENG, Z-G.; GE, J.; JIANG, S-L.; HU, J-H.; ZHANG, Q. *et al.* How Graphene Oxide Quenches Fluorescence of Rhodamine 6G. **Chinese Journal of Chemical Physics**, v. 26, p. 252-258, 2013.

FANG, Z.; ITO, A.; STUART, A.; LUO, H.; CHEN Z.; VINODGOPAL, K.; YOU, W.; MEYER, T.; TAYLOR, D. Soluble Reduced Graphene Oxide Sheets Grafted with Polypyridylruthenium Derivatized Polystyrene Brushes as Light Harvesting Antenna for Photovoltaic Applications. **ACS Nano**, v. 7, n. 9, p. 7992-8002, 2013.

FOOTE, C. S. Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. **Science**, v. 162, n. 857, p. 963-970, 1968.

FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659, 1991.

FUCHS, J.; THIELE, J. The Role of Oxygen in Cutaneous Photodynamic Therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, p. 835-847, 1998.

GANTCHEV, T. G.; OUELLET, R.; VAN LIER. J. E. Binding Interactions and Conformational Changes Induced by Sulfonated Aluminum Phthalocyanines in Human Serum Albumin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 366, p. 21-30, 1999.

GIERSCHNER, J.; LUER, L.; MILIAN-MEDINA, B.; OELKRUG, D.; EGELHAAF, H-J. Highly Emissive H-Aggregates or Aggregation-Induced Emission Quenching? The Photophysics of All-Trans para-Distyrylbenzene. **Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 4, p. 2686-2697, 2013.

GOKSEL, M.; DURMUS, M.; ATILLA, D. Peptide substituted Phthalocyanine Photosensitizers: Design, Synthesis, Photophysical and Photobiological Studies. **Photochemical and Photobiological Science**, v. 15, p. 1318-1329, 2016.

GUREL, E.; PISKIN, M.; ALTUN, S.; ODABAS, Z.; DURMUS, M. Synthesis, characterization and investigation of the photophysical and photochemical properties of highly soluble novel metal-free, zinc(II), and indium(III) phthalocyanines substituted with 2,3,6-trimethylphenoxy moieties. *Dalton Trans.* **44**, 6202-6211 (2015).

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2 ed. Oxford, Clarendon Press., 1982.

HANSDA, C.; CHAKRABORTY, U.; HUSSAIN, S. A.; BHATTACHARJEE, D.; PAUL, P. K. Layer-by-layer films and colloidal dispersions of graphene oxide nanosheets for efficient control of the fluorescence and aggregation properties of the cationic dye acridine orange. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 157, p. 79-87, 2016.

HOSU, I. S.; WANG, Q.; VASILESCU, A.; PETEU, S. F.; RADITOIU, V.; RAILIAN, S.; ZAITSEV, V.; TURCHENIUK, K.; WANG, Q.; LI, M.; BOUKHERROUB, R.; SZUNERITS, S. Cobalt phthalocyanine tetracarboxylic acid modified reduced graphene oxide: a sensitive matrix for the electrocatalytic detection of peroxynitrite and hydrogen peroxide. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, p. 1474-1484, 2015.

HUANG, P.; XU, C.; LIN, J.; WANG, C.; WANG, X.; ZHANG, C.; ZHOU, X.; GUO, S.; CUI, D. Folic Acid-conjugated Graphene Oxide loaded with Photosensitizers for Targeting Photodynamic Therapy. **Theranostics**, v. 1, p. 240-250, 2011.

ITO, T. Cellular and subcellular mechanisms of photodynamic action: The 102 hypothesis as a driving force in recent research. **Photochemistry and Photobiology**, v. 28, p. 493, 1978.

JANG, J.; RANGAPPA, D.; KWON, Y.; HONMA, I. Direct preparation of 1-PSA modified graphene nanosheets by supercritical fluidic exfoliation and its electrochemical properties. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 3462-3466, 2011.

JIN, C.; ZHENG, G. Liposomal Nanostructures for Photosensitizer Delivery. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 43, p. 734-748, 2011.

JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic Therapy and the Development of Metal-Based Photosensitisers. **Metal Based Drugs**, v. 2008, p. 24, 2008.

KENRY; LOH, K. P.; LIM, C. T. Molecular interactions of graphene oxide with human blood plasma proteins. **Nanoscale**, v. 8, p. 9425-9441, 2016.

KUCINSKA, M.; SKUPIN-MRUGALSKA, P.; SZCZOLKO, W.; SOBOTTA, L.; SCIEPURA, M.; TYKARSKA, E.; WIERZCHOWSKI, M.; TEUBERT, A.; WYSZKO, E.; GDANIEC, M.; KACZMAREK, M.; GOSLINSKI, T.; MIELCAREK, J.; MURIAS, M. Phthalocyanine Derivatives Possessing 2-(Morpholin-4-yl)ethoxy Groups As Potential Agents for Photodynamic Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 2240-2255, 2015.

KUILLA, T.; BHADRA, S.; YAO, D.; KIM, N.; BOSE, S.; LEE, J. Recent advances in graphene based polymer composites. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1350-1375, 2010.

KUNDU, N.; ROY, A.; BANIK, D.; KUCHLYAN, J.; SARKAR, N. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 119, n. 44, p. 25023-25035, 2015.

LACERDA, S. H. P.; PARK, J. J.; MEUSES, C.; PRISTINSKI, D.; BECKER, M. L.; KARIM, A.; DOUGLAS, J. F. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. **ACS Nano**, v. 4, p. 365-379, 2010.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3 ed. Singapore, Springer Science & Business Media, 2006.

LI, F.; LIU, Q.; LIANG, Z.; WANG, J.; PANG, M.; HUANG, W.; WU, W.; HONG, Z. Synthesis and biological evaluation of peptide-conjugated phthalocyanine photosensitizers with highly hydrophilic modifications. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 14, p. 3409-3422, 2016.

LIMA, A. M.; PIZZOL, C. D.; MONTEIRO, F. B. F.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANDRADE, G. P.; RIBEIRO, A. O. PERUSSI, J. R. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: Phototoxicity and photodynamic efficiency. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 125, n. 5, p. 146-154, 2013.

LIU, Y.; LIU, C-Y.; LIU, Y. Investigation on fluorescence quenching of dyes by graphite oxide and graphene. **Applied Surface Science**, v. 257, p. 5513-5518, 2011.

LIU, Z.; ROBINSON, J. T.; SUN, X.; DAI, H. PEGylated Nano-Graphene Oxide for Delivery of Water Insoluble Cancer Drugs. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 33, p. 10876-10877, 2008.

LUNARDI, C. N.; ROTTA, J. C. G.; TEDESCO, A. C. Zinc tetranitrophthalocyanine: isomer separation and photophysical photobiological evaluation in J774A tumor cells. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 7, p. 493-499, 2003.

LUNARDI, C. N. **Estudos sinérgicos de novos derivados de ftalocianinas de zinco contendo grupamentos quelantes para íons cálcio aplicados a Terapia Fotodinâmica: avaliação fotofísica e fotobiológica**. São Paulo, USP, 2004, 160 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Synergic Photosensitizers: A New Trend in Photodynamic Therapy. **Current Organic Chemistry**, v. 9, p. 813-821, 2005.

MARTIN, P. C.; GOUTERMNA, M.; PEPICH, B. V.; RENZONI, G. E.; SCHINDELE, D. C. Effects of Ligands, Solvent, and Variable Sulfonation on Dimer Formation of Aluminum and Zinc Phthalocyaninesulfonates. **Inorganic Chemistry**, v. 30, p. 3305-3309, 1991.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. **Química Nova**, v. 23, n. 5, 2000.



MCALLISTER, M. J.; LI, J-L.; ADAMSON, D. H.; SCHNIEPP, H. C.; ABDALA, A. A.; LIU, J.; HERRERA-ALONSO, M.; MILIUS, D. L.; CAR, R.; PRUD'HOMME, R. K.; AKSAY, I. A. Single Sheet Functionalized Graphene by Oxidation and Thermal Expansion of Graphite. **Chemistry of Materials**, v. 19, p. 4396-4404, 2007.

METIN, O.; AYDOGAN, S.; MERAL, K. A new route for the synthesis of graphene oxide-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (GO- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanocomposites and their Schottky diode applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 585, p. 681-688, 2014.

MIAO, W.; SHIM, G.; LEE, S.; LEE, S.; CHOE, Y. S.; OH, Y-K. Safety and tumor tissue accumulation of pegylated graphene oxide nanosheets for co-delivery of anticancer drug and photosensitizer. **Biomaterials**, v. 34, p. 3402-3410, 2013.

NWAHARA, N.; BRITTON, J.; NYOKONG, T. Improving singlet oxygen generating abilities of phthalocyanines: Aluminum tetrasulfonated phthalocyanine in the presence of graphene quantum dots and folic acid. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 70, p. 1601-1616, 2017.

OGUNSIPE, A.; MAREE, D.; NYOKONG, T. Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 650, p. 131-140, 2003.

PARK, S.; DIKIN, D. A.; NGUYEN, S. T.; RUOFF, R. S. Graphene Oxide Sheets Chemically Cross-Linked by Polyallylamine. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, p. 15801-15804, 2009.

PARMAR, A.; SHARMA, S. Derivative UV-vis absorption spectra as an invigorated spectrophotometric method for spectral resolution and quantitative analysis: Theoretical aspects and analytical applications: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 44-53, 2016.

PATIENCE, G. S. **Experimental Methods and Instrumentation for Chemical Engineers**. 2 ed., Amsterdam, Netherlands, Elsevier B.V., 2017.

PÉREZ-RAMÍREZ, E. E.; LUZ-ASUNCIÓN, M.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, A. L.; VELASCO-SANTOS, C. Graphene Materials to Remove Organic Pollutants and Heavy Metals from Water: Photocatalysis and Adsorption. **Semiconductor Photocatalysis – Materials, Mechanisms and Applications**. 1 ed. InTech, 2016.

PEYRATOUT, C.; DAEHNE, L. Aggregation of thiacyanine derivatives on polyelectrolytes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 4, p. 3032-3039, 2002.

POP, S. F., ION, R. M. Thermal stability – singlet oxygen quantum yields relationship of some metallophthalocyanine sensitizers for photodynamic tests. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 12, p. 1976-1980, 2010.

QI, X.; PU, K-Y.; ZHOU, X.; LI, H.; LIU, B.; BOEY, F.; HUANG, W.; ZHANG, H. Conjugated-polyelectrolyte-functionalized reduced graphene oxide with excellent solubility and stability in polar solvents. **Small**, v. 6, p. 663-669, 2010.

RASHID, M. A.; RABBI, S. N. I.; SULTANA, T.; SULTAN, M. Z.; SULTAN, M. Z. Fluorescence Spectroscopic Study of Interaction between Olanzapine and Bovine Serum Albumin. **Pharmaceutica Analytica. Acta**, v. 6, p. 1-5, 2015.

RIBEIRO, J. **Fotofísica e determinação de parâmetros fotodinâmicos da ftalocianina de zinco em meios homogêneo e microheterogêneo**. Uberlândia, UFU, 2003, 119 f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química, Universidade de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

ROBINSON, J. W.; FRAME, E. M. S.; FRAME II, G. M. Undergraduate Instrumental Analysis. 6 ed., **CRC Press**, 2004.

ROMERO, M. P.; GOBO, N. R. S.; OLIVEIRA, K. T.; IAMAMOTO, Y.; SERRA, O. A.; LOURO, S. R. W. Photophysical properties and photodynamic activity of a novel menthol-zinc phthalocyanine conjugate incorporated in miscelles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 253, p. 22-29, 2013.

ROSCH, U.; YAO, S.; WORTMANN, R. Fluorescent H-Aggregates of Merocyanine Dyes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, p. 7026-7030, 2006.

SAKAMOTO, S.; OHNO-OKUMURA, E. Syntheses and Functional Properties of Phthalocyanines. **Materials**, v. 2, n. 3, p. 1127-1179, 2009.

SAUER, M.; HOFKENS, J.; ENDERLEIN, J. **Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy Chapter in Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles**. 1 ed. Weinheim Germany, Wiley VCH, 2011.

SCHNEIDER, T.; GUGLIOTTI, M.; BAPTISTA, M. Quantitative determination of singlet oxygen by laser deflection calorimetry. **Analytical Letters**, v. 33, n. 2, p. 297-305, 2000.

SHIM, G., KIM, M-G.; PARK, J. Y.; OH, Y-K. Graphene-based nanosheets for delivery of chemotherapeutics and biological drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 105, p. 205-227, 2016.

SINOFOROGLU, M.; GUR, B.; ARIK, M.; ONGANER, Y.; MERAL, K. Graphene oxide sheets as a template for dye assembly: graphene oxide sheets induce H-aggregates of pyronin (Y) dye. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 3, p. 11832-11838, 2013.

SOUZA, T. D. ZIEMBOWICZ, F. I.; MULLER, D. F.; LAUERMAN, S. C.; KLOSTER, C. L.; SANTOS, R. C.; LOPES, L. Q.; OURIQUE, A. F.; MACHADO, G.; VILLETTI, M. A. Evaluation of photodynamic activity, photostability and in vitro drug release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v. 83, p. 88-98, 2016.

SUVARNAPHAET, P.; PECH'RASARN, S. Graphene-Based Material for Biosensors: A Review. **Sensors**, v. 17, n. 10, p. 2161, 2017.

TABATA, K., FUKUSHIMA, K., ODA, K., OKURA, I. Selective aggregation of zinc phthalocyanines in the skin. **Journal of Porphyrines and Phthalocyanines**, v. 4, p. 278-284, 2000.

TACHIKAWA, T.; CUI, S-C.; FUJITSUKA, M.; MAJIMA, T. Interfacial electron transfer dynamics in dye-modified graphene oxide nanosheets studied by single-molecule fluorescence spectroscopy. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, p. 4244-4249, 2012.

TURRO, N. J. **Modern Molecular Photochemistry**. USA, University Science Books, 1991.

VALENZO, D. P. Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, p. 147-160, 1987.

YANAGISAWA, S.; YASUDA, T.; INAGAKI, K.; MORIKAWA, Y.; MANSEKI, K.; YANAGIDA, S. Intermolecular Interaction as the Origin of Red Shifts in Absorption Spectra of Zinc-Phthalocyanine from First-Principles. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 117, p. 11246-11253, 2013.

YE, Y.; CHEN, Y.; WANG, J.; RICK, J.; HUANG, Y.; CHANG, F.; HWANG, B. Versatile Grafting Approaches to Functionalizing Individually Dispersed Graphene Nanosheets Using RAFT Polymerization and Click Chemistry. **Chemistry of Materials**, v. 24, p. 2987-2997, 2012.

WAN, Y.; LIANG, Q.; CONG, T.; WANG, X.; TAO, T.; SUN, M.; LI, Z.; XU, S. Novel catalyst of zinc tetraamino-phthalocyanine supported by multi-walled carbon nanotubes with enhanced visible-light photocatalytic activity. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, p. 66286-66293, 2015.

WANG, A.; WANG, Y.; HUANG, Z.; ZHOU, F.; SONG, J.; SONG, Y.; LONG, L.; CIFUENTES, M.; HUMPHREY, M.; ZHANG, L.; SHAO, J.; ZHANG, C. Covalent

functionalization of reduced graphene oxide with porphyrin by means of diazonium chemistry or nonlinear optical performance. **Scientific Reports**, v. 6, p. 23325, 2016.

WANG, J.; ZHANG, Y.; YE, J.; JIANG, Z. Enhanced fluorescence of tetrasulfonated zinc phthalocyanine by graphene quantum dots and its application in molecular sensing/imaging. **Luminescence**, v. 32, p. 573-580, 2017.

WANG, Z.; HE, C.; SONG, W.; GAO, Y.; CHEN, Z.; DONG, Y.; ZHAO, C.; LI, Z.; WU, Y. The effect of peripheral substituents attached to the phthalocyanines on the third order nonlinear optical properties of graphene oxide-zinc (II) phthalocyanine hybrids. **Royal Society of Chemistry Advances**, DOI: 10.1039/C5RA18911J, 2015.

WEILAND, G. A., MOLINOFF, P. B. Quantitative analysis of drug-receptor interactions: I. Determination of kinetic and equilibrium properties. **Life Sciences**, v. 29, p. 313-330, 1981.

WIEDER, M. E.; HONE, D. C.; COOK, M. J.; HANDSLEY, M. M.; GAVRILOVIC, J.; RUSSELL, D. A. Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a 'Trojan horse'. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 5, p. 727-734, 2006.

WEN, H.; DONG, C.; DONG, H.; SHEN, A.; XIA, W.; CAI, X.; SONG, Y.; LI, X.; LI, Y.; SHI, D. Engineered Redox-Responsive PEG Detachment Mechanism in PEGylated Nano-Graphene Oxide for Intracellular Drug Delivery. **Small**, v. 8, n. 5, p. 760-769, 2012.

YANG, K.; ZHANG, S.; ZHANG, G.; SUN, X.; LEE, S-T.; LIU, Z. Graphene in Mice: Ultrahigh in Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. **Nano letters**, v. 10, n. 9, p. 3318-3323, 2010.

YANG, G.; GONG, H.; QIAN, X.; TAN, P.; LI, Z.; LIU, T.; LIU, J.; LI, Y.; LIU, Z. Mesoporous silica nanorods intrinsically doped with photosensitizers as a

multifunctional drug carrier for combination therapy of cancer. V. 8, n. 3, p. 751-764, 2015.

ZENG, H.; DUROCHER, G. Analysis of fluorescence quenching in some antioxidants from non-linear Stern-Volmer plots. **Journal of Luminescence**, v. 63, p. 75-84, 1995.

ZHANG, B.; WANG, Y.; ZHAI, G. Biomedical applications of the graphene-based materials. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 953-964, 2016.

ZHANG, X-F., LI, X. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. **Journal of Luminescence**, v. 131, p. 2263-2266, 2011.

ZHANG, X-F., LIN, Y., GUO, W., ZHU, J. Spectroscopic insights on imidazole substituted phthalocyanine photosensitizers: Fluorescence properties, triplet state and singlet oxygen generation. **Spectrochimica Acta A**, v. 133, p. 752-758, 2014.

ZHOU, L.; ZHOU, L.; WEI, S.; GE, X.; ZHOU, J. JIANG, H.; LI, F.; SHEN, J. Combination of chemotherapy and photodynamic therapy using graphene oxide as drug delivery system. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 135, n. 5, p. 7-16, 2014.

ZHU, Z.; QIAN, J.; ZHAO, X.; QIN, W.; HU, R.; ZHANG, H.; LI, D.; XU, Z.; TANG, B. Z.; HE, S. Stable and Size-Tunable Aggregation-Induced Emission Nanoparticles Encapsulated with Nano Graphene Oxide and Applications in Three-Photon Fluorescence Bioimaging. **ACS Nano**, v. 10, n. 1, p. 588-597, 2016.