UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS DEPARTAMENTO DE FÍSICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

ANGELO THIAGO DE SOUZA CATANIO

Caracterização espectroscópica e fototérmica de nanopartículas de grafeno para aplicações antimicrobianas

Maringá 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS DEPARTAMENTO DE FÍSICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

ANGELO THIAGO DE SOUZA CATANIO

Caracterização espectroscópica e fototérmica de nanopartículas de grafeno para aplicações antimicrobianas

Dissertação apresentada ao Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Malacarne

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) (Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

C357c	 Catanio, Angelo Thiago de Souza Caracterização espectroscópica e fototérmica de nanopartículas de grafeno para aplicações antimicrobianas / Angelo Thiago de Souza Catanio Maringá, PR, 2022. 71 f.: il. color., figs., tabs. Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Física, Programa de Pós-Graduação em Física, 2022. 1. Terapia fotodinâmica. 2. Espectrofotômetro. 3. Pontos quânticos de grafeno. 4. Espectroscopia Lente Térmica (ELT). 5. Nanopartículas grafeno. I. Malacarne, Luis Carlos, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.
	CDD 23.ed. 530.4

Jane Lessa Monção - CRB 9/1173

ANGELO THIAGO DE SOUZA CATANIO

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E FOTOTÉRMICA DE NANOPARTÍCULAS DE GRAFENO PARA APLICAÇÕES ANTIMICROBIANAS

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Aprovado em: Maringá, 22 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luis Carlos Malacarne Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Prof. Dr. Jesus Calvo Castro Universidade de Hertfordshire – UK

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer a Deus por me ajudar a chegar até aqui.

Agradeço a minha família, meu pai Angelo, minha mãe Sandra e minha irmã Andressa, que sempre me apoiaram e estiveram comigo, me ajudando quando precisei.

Agradeço ao meu orientador, professor Malacarne, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela paciência e por sua disponibilidade em sempre querer me ajudar. Muito obrigado.

Agradeço à minha namorada Júlia V. Becker, por sempre estar comigo em todos os momentos.

Ao Eduardo, Gabriel e Victor, que sempre se dispuseram em me ajudar quando precisei. Isso foi essencial para que eu chegasse até aqui. Muito obrigado.

Ao Hugo e Gustavo, que sempre estiveram comigo durante a graduação e no mestrado. Muito obrigado à vocês.

A todos os professores que tive durante estes dois anos de mestrado, meu muito obrigado.

Agradeço ao Alysson, da Sala do Saber, que me concedeu emprego até quando uma bolsa de mestrado surgisse para mim. Muito obrigado.

Agradeço à CNPq por disponibilizar uma bolsa de mestrado faltando onze meses para o término.

Agradeço a todos os que contribuíram diretamente ou indiretamente nesta conclusão de mestrado. Muito obrigado a todos.

"Aquilo que observamos não é a natureza em si, mas a natureza exposta a nosso método de questionamento."

Werner Heisenberg, 1958.

Resumo

As terapias convencionais para o tratamento de doenças, em geral, apresentam efeitos colaterais adversos e eficiência limitada. Neste contexto, é necessário uma busca de aperfeiçoamento e por novas alternativas de tratamento. Em especial, com a resistência de microrganismos aos medicamentos já existentes no mercado atual, novos métodos precisam ser desenvolvidos para contornar o decréscimo da eficiência dos antibióticos. Em adição, apesar do avanço no tratamento, o câncer ainda é uma das doenças que mais causam mortes no mundo. Uma candidata com alto potencial de aplicação tanto no tratamento de câncer e infecções microbianas é a terapia fotodinâmica. A terapia fotodinâmica é uma terapia minimamente invasiva, o qual consiste da associação entre um fotossensibilizador, a luz com um comprimento de onda específico e o oxigênio molecular presente no meio, no qual a energia absorvida pelo fotossensibilizador é transferida para o oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio, as quais entrando em contato com algum tipo de material biológico, causará danos irreversíveis a eles. A técnica apresenta uma boa seletividade, visto que a ação somente ocorre na região iluminada e que as espécies reativas de oxigênio tem um raio de atuação bastante pequeno. Em adição, o tratamento é livre de antibióticos e com baixos efeitos colaterais.

A incorporação de nanopartículas na terapia fotodinâmica apresenta um grande potencial no aperfeiçoamento da nanomedicina atual, visto que podem ajudar na entrega do fármaco na região desejada, além de poder ser o agente gerador de calor na terapia fototérmica e como diagnóstico devido sua luminescência. Neste trabalho, investigamos as nanopartículas de grafeno (*Graphene Quantum Dots* - GQD's) disponíveis comercialmente como potencial agente teranóstico. Para investigarmos a propriedades e potencialidades do uso de GQD como agente na terapia fotodinâmica e fototérmica, serão utilizados métodos de espectroscopia de UV-VIS, espectroscopia de luminescência e espectroscopia de lente térmica. Ademais, os GQD's foram incorporados em nanocarregadores de micelas poliméricas obtidas a partir de copolímeros triblocos do tipo $(EO)_x(PO)_y(EO)_x$ comercializados como Pluronic[®] e também em lipossomas. Esses nanocarreadores são usados para melhorar a farmacocinética, biodistribuição e a fotocitotoxicidade dos fotossensibilizadores, além de permitirem a associação de diferentes moléculas. Em particular, também investigamos a associação dos GQD's com o fotossesibilizador eritrosina decil-estér. Os resultados mostram o potencial do GQD associado ou não a outro fotossensibilizador como agente teranóstico.

Palavras-chave: Nanopartículas grafeno, terapia fotodinâmica, oxigênio singleto, nanocarregadores, espectroscopia de lente térmica.

Abstract

Conventional therapies for the treatment of diseases, in general, have adverse effects and limited effectiveness. In this context, a search for improvement and new treatment alternatives is necessary. In particular, with the resistance of microorganisms to commercial drugs, new advanced methods will be developed to circumvent the decreasing efficiency of antibiotics. In addition, despite advances in treatment, cancer is still one of the fatal diseases in the world. A candidate with high potential for application in both treatments is photodynamic therapy. Photodynamic therapy is a minimally invasive therapy consisting of the association between a photosensitizer, light with a wavelength, and the molecular oxygen present in the medium. The energy absorbed by the photosensitizer is transferred to oxygen, generating reactive oxygen species, as those coming into contact with some biological material will cause irreversible cellular damage. The technique has good selectivity since the action only occurs in the illuminated region and by the reactive oxygen species' minimal range of activity. In addition, the treatment is antibiotic-free and has low associated side effects.

Incorporating nanoparticles in photodynamic therapy has excellent potential for improving current nanomedicine. They can help the drug delivery to the desired region and be the heat-generating agent in photothermal therapy and as a diagnosis due to its luminescence. This work investigates the Graphene Quantum Dots (GQD's) commercially available as a potential theranostic agent. This study uses UV-VIS spectroscopy, luminescence spectroscopy, and thermal lens spectroscopy methods to explore the properties and the potentialities of using GQD as an agent in photodynamic and photothermal therapy. Furthermore, the GQD's incorporated in micelle nanocarriers polymers obtained from triblock copolymers of the (EO)x(PO)y(EO)x type sold as Pluronic[®] and also in liposomes. These nanocarriers improve the pharmacokinetics, biodistribution, and photocytotoxicity of photosensitizers and allow the association of different molecules. In particular, we also investigated the association of GQD's with the erythrosine decyl ester photosensitizer. The results show the potential of GQD associated or not with another photosensitizer as a therapeutic agent.

Keywords: Graphene quantum dots, photodynamic therapy, singlet oxygen, nanocarriers, thermal lens spectroscopy.

Lista de Figuras

1.1	Aplicações da TFD comparada com o alcance dos antibióticos	17
1.2	Procedimento clínico da TFD.	18
1.3	Diagrama de Jablonski. Figura adaptada de $[5, 24, 25, 26, 27]$.	18
1.4	Estruturas moleculares de (a) azul de metileno, (b) rosa de bengala, (c) eritro- cina (d) accina $V_{(a)}$ fluoresceiro (f) currentino	10
15	Distribuição eletrônico dos doza elétrons de valência de melécula de evisônio [20]	19 91
1.0	Distribuição eletrônica do primeiro estado eveitado do evigênio molecular $(^{1}\Lambda)$	21 99
1.0 1.7	Distribuição eletrônica do primeiro estado excitado do oxigênio molecular (Δg) .	22 22
1.1	Conversão da molécula de ABDA em seu endoperóxido através da oxidação do	
1.0	oxigênio singleto [35]	23
1.9	Decaimentos dos picos de absorção do ABDA	23
1.10	Ilustração simplificada de uma micela englobando uma nanopartícula	24
1.11	Imagem microscópica dos GQD's disponível em [41]	25
2.1	Calibração da irradiância do LED branco quente utilizando o espectrorradiômetro.	30
2.2	As linhas contínuas de (a) e (b) correspondem aos espectros de irradiância dos	
	LED's utilizados nas cinéticas. A linha pontilhada de (a) corresponde ao espectro	
	de absorção do GQD em PBS com $[GQD] = 0,125 mg/mL$	31
2.3	Esquema simplificado de funcionamento de um espectrofotômetro	32
2.4	Espectrofotômetro Varian Cary 50 UV-VIS	32
2.5	Conjunto utilizado para fotodegradar as amostras no interior do espectrofotômetro.	33
2.6	Cubeta sendo irradiada com luz no interior do espectrofotômetro	33
2.7	Espectrômetro de fluorescência Perkin Elmer, modelo LS45.	34
2.8	Esquema simplificado de funcionamento de um espectrofluorimetro.	34
2.9	Montagem experimental da espectroscopia de lente termica. L1, L2, L3 e L4 sao	25
	ientes, M1, M2, M3, M4 e M3 sao espenios. Os sensores sao iotodiodos	55
3.1	Espectros de absorção do GQD	
	em água com diferentes concentrações.	37
3.2	Espectros de emissão do GQD	07
0.0	em PBS em solução de $0, 125 mg/mL$	37
3.3	(a) Espectros de absorção iniciais de GQD em PBS e GQD em PBS + ABDA; (b) Cinética de absorção de ABDA + LED brance quente: (a) Cinética de absorção	
	do ABDA sem o LED branco quente: (d) Cinética de absorção do ABDA com o	
	LED branco quente.	38
3.4	Cinéticas do espectro de absorção do GQD em PBS com a presença de ABDA	
	para diferentes fontes de iluminação: (a) LED customizado, (b) LED branco	
	quente, (c) LED azul, (d) LED ciano, (e) LED verde e (f) LED âmbar. \ldots	39
3.5	Evolução temporal da absor-	
	bância do GQD em 490 nm	40

3.6	Evolução temporal da absor-	
	bância do ABDA em 380 nm.	40
3.7	Evolução temporal da absor-	
	bância do GQD em 490 nm .	40
3.8	Evolução temporal da absor-	
	bância do ABDA em 380 <i>nm</i>	40
3.9	Comportamento inicial da evolução temporal da absorbância do GQD em 380 nm .	41
3.10	Cinéticas de absorção do GQD em PBS depois de degradado	42
3.11	Comportamento da evolução temporal da absorbância do GQD em 380 nm para	
	a cinética em amostra degradada	42
3.12	Transientes de LT para (a) PBS puro e (b) GQD em PBS com concentração de	
	$2~\mu g/mL.$ As linhas contínuas são os respectivos ajustes utilizando modelo teórico.	44
4.1	Espectros de absorção iniciais dos GQD's em meios diferentes mas com a mesma	
	concentração de 0, 125 mg/mL	45
4.2	Espectros de absorção de nanopartículas de GQD e o FS ERIDEC em nanocar-	
	regadores (a) Lipossomas e (b) F-127	46
4.3	Espectros de emissão de nanopartículas de GQD e o FS ERIDEC em nanocar-	
	regadores: (a) Lipossomas e (b) F-127. O comprimento de onda de excitação foi	
	de 462 nm .	46
4.4	Cinéticas do espectro de absorção em nanocarregadores F-127 utilizando o LED	
	customizado para a fotoexcitação.	47
4.5	Cinéticas do espectro de absorção em nanocarregadores lipossomas utilizando o	
	LED customizado para a fotoexcitação.	47
4.6	Comparação do decaimento do pico do ABDA em diferentes meios em função do	10
4 🗁	tempo obtidos das cinéticas com o LED customizado.	48
4.7	Comparação do decaimento do pico do ABDA em diferentes meios em função do	10
	tempo obtidos das cineticas com o LED customizado em grafico mono-log	49
B.1	Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos	
	pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo $t = 150 min.$	54
B.2	Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos	
	pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo $t = 150 min.$	55
B.3	Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos	
	pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo $t = 150 min.$	55
B.4	Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos	
	pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo $t = 150 min.$	56
B.5	Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos	
	pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo $t = 150 min.$	56
C.1	Arranjo experimental simplificado para a configuração do feixe de prova na	
	técnica de LT de feixes descasados.	57

Lista de Tabelas

2.1	Composição do PBS utilizado na solução estoque de GQD em PBS	28
2.2	Composição das formulações micelares de F-127, [ERIDEC] = $5.10^{-6} mol/L$ e	
	$[\text{GQD}] = 0,125 \ mg/mL.$	30
2.3	Parâmetros geométricos de LT	36
3.1	Irradiância dos LEDs utilizados nas cinéticas de fotodegradação, o número de fótons absorvidos N_{ABS} para $t = 10 min$, as taxas de geração de de oxigênio singleto k_i^{ABDA} e as correspondentes eficiências química de geração de oxigênio	
	singleto γ_i	43
4.1	Taxas de geração de de oxigênio singleto, k^{ABDA} , obtidos através do ajuste teórico de uma exponencial simples até $t = 100 \ min.$	49

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABDA/ADMA - 9,10-anthracenediyl-bis(methylene) dimalonic acid ADPA - 9,10-anthracenedipropionic acid AES - anthracene-9,10-bisethanesulfonic acid ALA - Ácido 5-aminolevulínico aPDT - Antimicrobial photodynamic therapy AVS - anthracene-9,10-divinylsulfonate CHDDE - sodium 1,3-cyclohexadiene-1,4-diethanoate COVID-19 - Corona virus disease CNTs - Carbon nanotubes DMSO - dimetilsulfóxido DPA - 9,10-diphenylanthracene DPPC - fosfolipídio 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina EAS - anthracene-9,10-diyldiethyl disulfate ERIDEC - eritrosina decil-éster EROs - Espécies reativas de oxigênio FS - Fotossensibilizador GQD - Graphene quantum dot IFDMO - Inativação fotodinâmica de microrganismos LED - Light Emisson Diode LT - Lente Térmica **PBS** - Phosphate-buffered saline PS - Photosensitizer PS^* - Photosensitizer in the excited state ³PS - Photosensitizer in the triplet state TFD - Terapia fotodinâmica TFT - Terapia fototérmica TOM - Teoria Orbital Molecular

UV - Ultravioleta

Sumário

Re	esumo	7
Ał	bstract	8
1	Introdução1.1Contexto histórico da TFD1.2Procedimentos Clínicos e Fotossensibilizadores1.3Oxigênio Singleto: o que é e como detectá-lo?1.4Nanocarregadores1.5Graphene Quantum Dots - GQD's1.6Objetivos	 15 16 17 20 23 24 26
2	Materiais e Métodos 2.1 Preparação das Amostras	 28 28 28 20
	 2.1.3 Preparação dos Lipossomas Mistos e Incorporação dos Fármacos 2.2 Fontes de Luz 2.3 Espectrofotômetro UV-VIS 2.4 Espectrofluorímetro 2.5 Espectroscopia de Lente Térmica 	29 30 31 33 34
3	Nanopartículas de Grafeno em PBS	37
4	Nanopartículas de Grafeno em Nanocarregadores	45
Co	onclusão	51
A	Lei de Lambert-Beer	52
В	Cálculo do Número de Fótons Absorvidos do GQD em PBS B.1 LED 450 nm	54 54
С	Espectroscopia de Lente Térmica C.1 Contexto Histórico C.2 Propagação do Feixe de Prova C.3 Modelo teórico sem fotorreação C.3.1 Perfil de Temperatura C.3.2 Diferença de fase C.4 Modelo teórico com fotorreação	57 57 58 60 60 64 65

C.4.1	Perfil de Temperatura			•			•								•		•		•			65
C.4.2	Diferença de Fase	•		•	•	•	•	•		•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	66

Capítulo 1

Introdução

A luz é considerada pela comunidade científica um dos principais elementos da natureza que possibilitaram a existência de vida na Terra, desde as bactérias até os seres mais complexos do reino animal. Com isso, os processos de sua interação com a matéria estão sendo estudados há muito tempo e a cada dia que passa, são descobertas novas ideias sobre este elemento da natureza que é tão importante para nossa sobrevivência. Após a luz interagir com qualquer objeto que estiver em seu caminho, alguns processos físicos e químicos podem ocorrer, como por exemplo: absorção, reflexão, espalhamento e transferência de energia. Entretanto, somente nos séculos XIX e XX se intensificaram os estudos com luz aplicados na área da saúde, como por exemplo, a terapia fotodinâmica (TFD) [1].

As principais terapias convencionais que temos atualmente para o tratamento de doenças patológicas são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Por apresentarem efeitos colaterais adversos e uma eficiência certamente limitada, outras terapias alternativas vêm sendo estudadas para o tratamento de doenças, entre elas, a terapia fotodinâmica. A TFD consiste na aplicação de luz (com um comprimento de onda específico) sobre um fotossensibilizador (FS), o qual ao ser estimulado pela luz, induz uma consequência cruscial desta terapia que é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em especial o oxigênio singleto ($^{1}O_{2}$). O oxigênio singleto é altamente reativo e ao entrar em contato com vírus, bactérias, fungos e parasitas ocorre a chamada Inativação Fotodinâmica de Microrganismos (IFDMO) ou Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT), resultando na destruição dos microrganismos sem chances destes criarem algum tipo de resistência à esta terapia [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Além disso, também se comprovou que a TFD é um excelente método para o tratamento de alguns tipos de câncer, como por exemplo, o câncer de pele, pulmão, cérebro, colo de útero, próstata e mama [8, 9, 10]. Para o câncer em estágio inicial, a TFD tem uma eficácia análoga a uma cirurgia. Em contrapartida, para estágios mais avançados de metástase e com descobertas tardias, a cirurgia ou quimioterapia se mostram mais eficazes em relação a TFD [7]. Em comparação com as terapias convencionais atuais, constou-se que a TFD pode apresentar, em alguns casos, maior seletividade contra células tumorais, visto que alguns fotossensibilizadores têm uma preferência em se concentrarem nas células danificadas pelo tumor [10, 11]. Para diminuir os possíveis efeitos nos tecidos sadios, busca-se novos tipos de FS isolados ou acloplados a nanocarregadores que apresentem a máxima seletividade possível. Ademais, notou-se que a TFD pode estimular o sistema imunológico a "trabalhar" contra as células tumorais, visto que a TFD induz uma inflamação na região tumoral onde os leucócitos são "convocados" para este tecido-alvo. Outra forma que a TFD pode ajudar na erradicação de um tumor é reduzindo a microvasculatura da região tumoral, privando essas células de receber a quantidade adequada de nutrientes e oxigênio para a sua sobrevivência [7, 12].

A utilização de nanopartículas na TFD tem ganhado atenção, pois estes podem atuar junto com o fotossensibilizador na produção de oxigênio singleto, bem como absorver energia e convertê-la em calor, assim também associando uma terapia fototérmica induzida localmente. Em seus experimentos, Moan *et al.* estudaram a cinética de fotodegradação dos corantes e concluíram que a distância difundida de oxigênio singleto estimada está entre 10 - 20 nm e um tempo de vida entre 10 - 40 ns, o que nos leva a concluir que precisamos de medicamentos com mais especificidade que possam carregar o fotossensibilizador até o local desejado para ocorrer um tratamento efetivo, uma vez que seu raio de atuação e tempo de vida são muito pequenos [13]. A incorporação de fotossensibilizadores em nanocarregadores também são estudos recentes na TFD, uma vez em que estes têm a finalidade de melhorar a biodistribuição e a farmacocinética da TFD [14, 15, 16, 17, 18]. No presente estudo, serão realizadas cinéticas de fotodegradação de nanopartículas de grafeno em PBS e também em soluções micelares com a presença de outro fotossensibilizador. Para isso, será utilizado diferentes comprimentos de onda que serão responsáveis por excitar as nanopartículas e, consequentemente, gerar oxigênio singleto. As taxas de geração de oxigênio singleto e de fotodegradação serão encontradas a partir da evolução temporal das absorbâncias nos picos de 380 nm e 490 nm, respectivamente.

1.1 Contexto histórico da TFD

A TFD tem sido utilizada desde a época das civilizações romanas, gregas, chinesas, indianas e egípcias, a aproximadamente 4.000 anos atrás. Sem terem todo o conhecimento científico que temos atualmente, os egípcios, por exemplo, faziam a ingestão de plantas (que continham psoralenos, estes desconhecidos) e depois se expunham à luz solar, assim tratavam doenças como o vitiligo¹ e câncer de pele [3, 6, 10, 19]. As civilizações antigas sempre faziam alguma ligação entre a luz solar e a saúde, levando-os sempre a adorar o Sol e os deuses do Sol. Dessa forma, a helioterapia foi a única terapia possível envolvendo luz até o final do século XIX [19].

A ideia de que a combinação de luz e um certo composto químico provocariam a morte celular é recente na história da ciência. Com a evolução da tecnologia, por volta de 1900, esta técnica começou a ser estudada. O pesquisador alemão O. Raab demonstrou a morte de um protozoário utilizando luz solar e o corante acridina. Em 1903, as pesquisas sobre a TFD resultaram no Prêmio Nobel de Medicina para o médico dinamarquês Niels Finsen, o qual utilizou luz solar para a cura da Lupus vulgaris, popularmente conhecida como tuberculose luposa, dando início a fototerapia moderna. No mesmo ano do prêmio Nobel de Finsen, Trappeiner fez a combinação de luz com o fotossensibilizador eosina para realizar um tratamento de câncer de pele. Nesta pesquisa, ele visualizou a necessidade de se ter oxigênio no meio para se ter uma eficácia na ação fotodinâmica. Com isso, Trappeiner usou pela primeira vez o termo "reação fotodinâmica" [10, 20]. Em 1911, W. Hausmann relatou os efeitos da combinação de hematoporfirina e luz em protozoários e células sanguíneas, descrevendo as reações que ocorriam na pele dos camundongos quando era aplicado hematoporfirina e logo em seguida expostos à luz. Em 1913, F. Meyer-Bertz se auto-injetou 200 mq de hematoporfirina para determinar se as reações descritas por Hausmann seriam análogas em humanos. Assim, Meyer-Bertz relatou edema e dor nas áreas iluminadas com luz. Mais tarde, em 1925, Policard observou que as porfirinas causaram efeitos fototóxicos em tumores malignos de ratos e posteriormente, em 1942, Auler e Banzer injetaram hematoporfirinas em ratos que tinham tumores implantados e observaram que as porfirinas se acumularam nos tecidos malignos [11].

Devido ao sucesso no uso de vacinas, sulfonamidas e de penicilina, em meados da Segunda Guerra Mundial, as pesquisas sobre a TFD e as suas aplicações foram interrompidas. No entanto, devido ao crescimento de infecções hospitalares e da criação de resistência bacteriana aos antibióticos, nos últimos anos as pesquisas com a TFD voltaram a ser utilizadas como uma terapia viável para o tratamento doenças. A partir da década de 1950, os primeiros

 $^{^1 {\}rm também}$ conhecido como leucoderma.

fármacos para a aplicação na terapia fotodinâmica começaram a ser desenvolvidos² [6, 21]. Em meados de 1970, Dougherty estudou a atividade fotodinâmica de alguns corantes, em especial a hematoporfirina. Ele concluiu que a hematoporfirina tem uma grande capacidade de destruir o tecido onde o fotossensibilizador se encontra quando é ativado por luz [8]. Em 1976, Weishaupt *et al.* aplicaram a hematoporfirina em células mamárias de camundongos e concluíram que o oxigênio singleto é o responsável pela toxicidade desse sistema [9]. Em 1976, J. F. Kelly e M. E. Snell realizaram os primeiros estudos sobre os efeitos que a TFD causa em humanos com câncer de bexiga, utilizando o fotossensibilizador hematoporfirina. Em 1984, J. S. McCaughan utilizou a TFD para tratar pacientes com câncer no esôfago [10].

Atualmente, sabemos que a TFD é utilizada não somente no combate ao câncer, mas também de doenças virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias. Além disso, ela também é utilizada em tratamentos odontológicos, dermatológicos, oftalmológicos e até mesmo no meio veterinário e na agricultura, como por exemplo, para a desinfecção de água. Doenças respiratórias, tais como a pneumonia e a COVID-19, também podem ser eliminadas com a TFD. Com a sua característica multidisciplinar, a TFD dispõe de vários ramos da ciência como a física, biologia, medicina, química, bioquímica e engenharia de materiais, que resultam em centenas de publicações que contribuem cada vez mais para o avanço desta tecnologia.



Figura 1.1: Aplicações da TFD comparada com o alcance dos antibióticos.

1.2 Procedimentos Clínicos e Fotossensibilizadores

Após constatada a necessidade da utilização da TFD no paciente, o FS poderá ser solubilizado em água, soro fisiológico ou em qualquer outro fluido líquido que tenha a função de solvente tecnicamente apropriado para o tratamento. Assim, a solução poderá ser ingerida, injetada de forma intra-venosa ou de uso tópico pelo paciente. Após o organismo do paciente conseguir absorver o FS, uma fonte luminosa com comprimento de onda específico iluminará a região doente, como mostra a figura 1.2. Depois do local ser irradiado, observa-se que as células desta região podem sofrer apoptose, necrose ou autofagia. Entretanto, nem sempre a doença será erradicada de uma vez, sendo necessárias novas sessões de TFD para conseguir uma alta efetividade no tratamento.

²estes eram derivados de hematoporfirínicos.



Figura 1.2: Procedimento clínico da TFD.

Algumas características definem o mecanismo de ação dos FS utilizados na TFD. A presença de cargas nos FS levam a diferentes interações com as organelas das células. Por exemplo, a interação da luz com os corantes de carga negativa pode ocorrer na membrana nuclear de algumas bactérias, enquanto que com os corantes de carga positiva pode ocorrer na mitocôndria das mesmas bactérias. Além disso, a concentração da solução que irá ser aplicada no paciente depende do FS que está sendo usado e também de qual doença ele quer eliminar. O estágio em que a doença se encontra e o comprimento de onda que irá ser utilizado também são variáveis que devem ser levadas em consideração para um tratamento efetivo. Além disso, o fármaco utilizado na TFD precisa ter baixa citotoxicidade na ausência da luz, ser fotodegradável, possuir fotossensibilidade não prolongada, ser de fácil eliminação pelo organismo e possuir alta afinidade com o tecido doente [2, 3, 4, 22]. Entretanto, a seletividade e a biodistribuição do FS varia muito de um tipo para outro, pois é preciso levar em consideração que eles podem ser hidrofílicos, hidrofóbicos ou anfifílicos, e também aniônicos, catiônicos ou neutros [23].



Figura 1.3: Diagrama de Jablonski. Figura adaptada de [5, 24, 25, 26, 27].

O diagrama de Jablonski, mostrado na figura 1.3, representa os processos fotofísicos que ocorrem com o FS ao interagir com a luz. Inicialmente, o FS está no chamado estado fundamental, onde ao ser atingido por um fóton de comprimento de onda no qual ele absorva, passa para o estado excitado, chamado de estado singleto. Neste estado, o FS apresenta um tempo de vida pequeno e acaba retornando para o estado fundamental, emitindo luz por fluorescência ou decaindo de forma não-radioativa por inversão interna de spin e indo para outro estado, chamado de estado tripleto. A transição direta do estado tripleto para o estado fundamental é uma transição proibida por spin, e consequentemente o tempo de vida neste estado é muito superior comparado com o tempo de vida do estado singleto. Uma vez no estado tripleto, o FS pode interagir com as moléculas de oxigênio por dois caminhos diferentes. Para o primeiro caminho, também chamado de *mecanismo tipo I*, o FS está no estado tripleto e interage com substratos orgânicos presentes no meio. Essa interação gera radicais livres, os quais interagem com as moléculas de oxigênio presentes no meio gerando espécies reativas de oxigênio conhecidas como EROs, como por exemplo, radicais hidroxilas e ânions superóxidos. Essas espécies reativas de oxigênio no estado tripleto transfere energia diretamente para o oxigênio no estado fundamental, levando-o para o estado singleto, o qual é altamente oxidante e causa danos em membranas, proteínas e ácidos nucleicos, assim, induzindo a morte celular [4, 5, 25, 27].

Apesar de apresentarem um mesmo princípio fotoquímico tanto para a morte celular quanto para doenças microbianas, os FS apresentam diferenças em suas estruturas moleculares, como vemos na figura 1.4, a qual nos mostra alguns dos FS utilizados na TFD. Como já citado anteriormente, estudos mostraram que a TFD induz respostas imunoestimuladoras no organismo, diferentemente das terapias convencionais como a quimioterapia e a radioterapia, que são terapias imunosupressoras. Neste contexto, a TFD induz uma inflamação no tecido-alvo, estimulando, assim, a produção de anticorpos, sendo os linfócitos T CD8+ os principais responsáveis por este efeito [12].



Figura 1.4: Estruturas moleculares de (a) azul de metileno, (b) rosa de bengala, (c) eritrosina, (d) eosina Y, (e) fluoresceína, (f) curcumina.

Na história dos FS utilizados na TFD, podemos dividi-los em três gerações. A primeira geração foi na década de 1970, onde eram utilizadas misturas complexas de porfirinas. Por apresentarem uma baixa seletividade e uma baixa taxa de entrega, na década de 1980 novos compostos como o ALA (ácido 5-aminolevulínico), clorinas e hipocrelinas foram desenvolvidos para melhorar a TFD. Estes foram chamados de fotossensibilizadores de segunda geração. Infelizmente, ainda havia alguns fatores que dificultavam a utilização destes na TFD, como a baixa fotoestabilidade e baixo desempenho quando diluídos em água. Entretanto, houve uma pequena melhora na seletividade, uma alta geração de oxigênio singleto e uma ação mais

profunda no tecido devido a absorção deles serem entre 650 - 800 nm. Estes aspectos negativos levaram ao desenvolvimento de FS da terceira geração, baseados em sistemas que fazem o carregamento de drogas até um local de destino. Com o desenvolvimento da nanomedicina, vários tipos de nanomateriais já foram testados e comprovados, mostrando melhora na eficiência da TFD, como nanopartículas poliméricas, nanopartículas à base de carbono, ouro e também hidrogéis [14].

Apesar dos avanços nos estudos de FS na TFD, ainda há muito para se desvendar. Além da alta taxa de produção de oxigênio singleto e de materiais que entregam os FS em locais específicos, existe a possibilidade de se utilizar mais de um FS atuando simultaneamente para a TFD. Como por exemplo, utilizar o azul de metileno e a eritrosina para um dado tratamento de forma a controlarmos a profundidade da ação pela seleção do comprimento de onda. Entretanto, poucos estudos foram feitos para investigar a aditividade efetiva de combinaçãoes de FS, ou seja, se as produções de oxigênio singleto são de forma aditiva, visto que pode haver uma competição entre os FS, assim reduzindo a taxa de geração de oxigênio singleto [28]. As pesquisas atuais mostram que aproximadamente um terço de todos os ensaios clínicos recentes que envolvem FS para a TFD são FS de primeira geração. Além disso, há perspectivas de que em breve, os estudos sobre a TFD irão se concentrarem em FS de terceira geração [7].

Como já citado anteriormente, a fonte luminosa utilizada deve ter um comprimento de onda específico, o qual varia de acordo com o espectro de absorção do FS. Geralmente são utilizados fontes de luz de comprimento de onda na qual o FS tem uma boa absorbância e também fontes de luz no qual tem maior rendimento quântico na geração de oxigênio singleto para aquele FS [3]. Entretanto, a penetração da luz nos tecidos depende muito das propriedades ópticas dos tecidos. Como grande parte do corpo humano é composto de água, isso afeta diretamente na penetração da luz nos tecidos, tendendo ter maior absorbância em altos comprimentos de onda. Por sua vez, a hemoglobina e a melanina presentes na pele por exemplo, absorvem luz em comprimentos de onda menores, influenciando também na penetração da luz na pele. Com isso, demonstrou-se que há uma região do espectro eletromagnético o qual tem maior poder de penetração nos tecidos da pele, que varia entre $600 - 1.300 \ nm \ [12, 29]$. Esta região também é conhecida como "janela terapêutica". Para regiões mais profundas e internas, pode ser utilizado lasers monocromáticos combinados ou LED com fibras ópticas.

1.3 Oxigênio Singleto: o que é e como detectá-lo?

Sabemos que no nosso cotidiano que tudo em excesso faz mal, inclusive o oxigênio em concentrações muito maiores do que as presentes no ar que respiramos. Em excesso, este se torna um vilão capaz de causar danos irreversíveis em plantas, bactérias aeróbicas e animais, com efeitos distintos para cada ser vivo. Para haver um tratamento efetivo de TFD, é indispensável que o meio em que irá ocorrer a TFD tenha oxigênio. Consequentemente, a aplicação de TFD em tecidos hipóxicos (tecidos com baixa concentração de oxigênio) prejudicam consideravelmente a eficiência da TFD, principalmente em tumores sólidos [12]. Neste contexto, para podermos diferenciar os estados fundamental e excitado do oxigênio molecular, primeiramente devemos ter em mente que estes estados se referem à multiplicidade (M) do estado eletrônico, descritas pela teoria quântica. Em outras palavras, a multiplicidade seria o número total de configurações possíveis dos spins dos elétrons. A multiplicidade é definida por: [30]

$$M = 2S + 1$$

no qual S é a soma dos spins dos elétrons em questão. O estado singleto apresenta uma configuração de spins antiparalelos (emparelhados), diferente do estado tripleto que apresenta uma configuração de spins paralelos (desemparelhados). De acordo com a Teoria Orbital Molecular

(TOM), a molécula de oxigênio em seu estado fundamental está no estado tripleto (${}^{3}O_{2}$), diferentemente da grande maioria das moléculas orgânicas que estão no estado singleto. O primeiro estado excitado para o oxigênio é o estado singleto (${}^{1}O_{2}$). Para demonstrar essa afirmação, consideremos um átomo de oxigênio, contendo oito elétrons. Dessa forma, a distribuição eletrônica do átomo de oxigênio será dada por:

$$^{8}\mathrm{O} = 1s^{2}2s^{2}2p^{4}$$

De acordo com a TOM, primeiramente deve ser considerado que os orbitais atômicos devem ser combinados durante a ligação química, dando origem a orbitais moleculares. Assim, o número de orbitais moleculares será dado pela combinação linear do número de orbitais atômicos. Juntando dois orbitais atômicos, tem-se dois orbitais moleculares, sendo um de menor energia chamado de ligante e outro de maior energia, chamado de antiligante. Para poder realizar a distribuição eletrônica dos elétrons, os orbitais moleculares devem ser organizados de forma crescente de energia, além de obedecer a regra de Hund, onde cada orbital abriga somente dois elétrons de spins contrários. Aplicando a TOM para os elétrons de valência da molécula de oxigênio, a união de dois orbitais 2*s* resulta em dois orbitais atômicos 2*p*, resultam em quatro orbitais do tipo π , onde destes seis, dois serão orbitais ligantes³ (π_{2p}) e dois serão orbitais antiligantes (π_{2p}^*); além de ter ainda mais dois orbitais do tipo σ , sendo um ligante (σ_{2p}) e o outro antiligante (σ_{2p}^*) [30].

σ_{2s}	σ_{2s}^{*}	π_{2p}	π_{2p}	σ_{2p}	π_{2p}^*	π_{2p}^*	σ_{2p}^{*}
t↓	t↓	t↓	t↓	t↓	1	t	

Figura 1.5: Distribuição eletrônica dos doze elétrons de valência da molécula de oxigênio [30].

Na figura 1.5, mostramos a distribuição eletrônica dos doze elétrons de valência da molécula de oxigênio [30]. Analisando esta distribuição eletrônica, nota-se que os dois elétrons desemparelhados ocupam orbitais antiligantes degenerados, de acordo com o Princípio da Exclusão de Pauli, possuindo a tendência de ter o mesmo spin e a multiplicidade máxima, resultando em um estado tripleto de mais baixa energia.

As figuras 1.6 e 1.7 mostram dois dos três possíveis estados excitados que o oxigênio molecular pode apresentar⁴, representados por ${}^{1}\Delta_{g}$ e ${}^{1}\sum_{g}^{+}$. A diferença entre os estados excitados ${}^{1}\Delta_{g}$ e ${}^{1}\sum_{g}^{+}$ é que o estado excitado ${}^{1}\sum_{g}^{+}$ apresenta energia de 157 kJ/mol acima do estado fundamental, diferente do estado excitado ${}^{1}\Delta_{g}$, que apresenta energia de 94 kJ/mol acima do estado fundamental. Dessa forma, quando o fotossensibilizador se degrada e libera energia, esta energia liberada pode ser transferida para estas moléculas de oxigênio no estado fundamental (estado tripleto) presentes no meio, levando-as para o estado excitado. Entretanto, o oxigênio no estado ${}^{1}\sum_{g}^{+}$ tem um tempo de vida muito pequeno, sendo convertido ao estado ${}^{1}\Delta_{g}$ praticamente de forma instantânea, fazendo que o oxigênio no estado ${}^{1}\sum_{g}^{+}$ não seja reativo [30, 31, 32].

³referentes aos eixos perpendiculares y e z.

⁴O terceiro estado é análogo ao estado representado na figura 1.6, mas em coordenadas distintas da ligação de π_{2p}^* .

σ_{2s}	σ_{2s}^{*}	π_{2p}	π_{2p}	σ_{2p}	π_{2p}^*	π_{2p}^{*}	σ_{2p}^{*}
†∔	†↓	t↓	t↓	†↓	†↓		

Figura 1.6: Distribuição eletrônica do primeiro estado excitado do oxigênio molecular $({}^{1}\Delta_{g})$.

 $\sigma_{2s} \quad \sigma_{2s}^* \quad \pi_{2p} \quad \pi_{2p} \quad \sigma_{2p} \quad \pi_{2p}^* \quad \pi_{2p}^* \quad \sigma_{2p}^*$ $\uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \quad \uparrow \downarrow \quad \downarrow \quad \downarrow$

Figura 1.7: Distribuição eletrônica do segundo estado excitado do oxigênio molecular $(^{1}\sum_{q}^{+})$.

O oxigênio singleto é encontrado em vários processos químicos, físicos, biológicos, atmosféricos e terapêuticos. Reações fotoquímicas como a incidência de luz sobre um fotossensibilizador, reações químicas entre hipoclorito e peróxido de hidrogênio, ou até mesmo a decomposição de peróxido de hidrogênio, endoperóxidos naftalênicos, superóxido ozoneto de íon e trifenil fosfato são algumas das maneiras de se produzir oxigênio singleto [33]. Neste estado excitado, o oxigênio apresenta o seu tempo de vida extremamente curto (da ordem dos nanosegundos, $10^{-9} s$), no entanto suficientes para interação localizada com meio biológico adjacente [13, 34].

Para conseguir detectar o oxigênio singleto presente em um meio, existem várias técnicas espectroscópicas diretas e indiretas relatadas na literatura, como a espectrofotometria, emissão no infravermelho, fluorescência e quimioluminescência [33, 34]. Para a detecção direta via emissão de infravermelho, é utilizado um equipamento capaz de realizar varreduras entre $800 - 2.700 \ nm$ e realizar cinéticas de emissão. Para a detecção indireta via espectrofotometria na região do visível, são utilizados alguns compostos químicos em que, ao reagirem com o oxigênio singleto, têm as suas absorbâncias diminuídas, podendo monitorá-los por meio de um espectrofotômetro UV-VIS. Os compostos químicos mais utilizados para esta finalidade são [33, 34]:

- 9,10-anthracenediyl-bis(methylene) dimalonic acid (ABDA);
- 9,10-diphenylanthracene (DPA);
- 2,5-dimethyfuran derivatives;
- anthracene-9,10-diyldiethyl disulfate (EAS);
- anthracene-9,10-bisethanesulfonic acid (AES)
- anthracene-9,10-divinylsulfonate (AVS);
- 9,10-anthracenedipropionic acid (ADPA);
- 1,3-diphenylisobenzofuran;
- sodium 1,3-cyclohexadiene-1,4-diethanoate (CHDDE).

Neste trabalho, para monitoriar a quantidade de oxigênio singleto que é produzida pelo fotossensibilizador, utilizaremos um composto conhecido como ABDA ou ADMA (9,10-anthracenediylbis(methylene) dimalonic acid) [9, 18, 26, 33, 34], visto que este composto apresenta boa solubilidade em solução aquosa. O ABDA é um derivado do andraceno, que ao entrar em contato com o oxigênio singleto é convertido de forma irreversível em seu endoperóxido, conforme mostraremos na figura 1.8 [35]. A degradação direta do ABDA pelas fontes de luz utilizadas neste trabalho foi insignificante, podendo assim, ser desprezada na estimativa da geração de oxigênio singleto. Veremos na figura 1.9 que os picos do espectro de absorção do ABDA diminuem com o passar do tempo, uma vez que a degradação do ABDA está diretamente relacionada com a quantidade de oxigênio singleto que é gerada pela fotoativação do fotossensibilizador.



Figura 1.8: Conversão da molécula de ABDA em seu endoperóxido através da oxidação do oxigênio singleto [35].



Figura 1.9: Decaimentos dos picos de absorção do ABDA.

1.4 Nanocarregadores

Como já citado, o desenvolvimento de fotossensibilizadores da terceira geração se baseia em sistemas que fazem o carregamentos das drogas até um lugar pretendido. Os estudos da biomedicina e da nanomedicina vêm sendo essenciais nas pesquisas destes compostos, uma vez que as interações biológicas ocorrem nesta escala. Existem inúmeros tipos de sistemas responsáveis por fazerem estes carregamentos, como nanopartículas inorgânicas de ouro e sílica, polímeros biodegradáveis e naturais como a quitosana, alginato, derivados de proteínas e carboidratos, além de estruturas micelares e vesículas, cuja finalidade é melhorar a biodistribuição do fotossensibilizador, acumulação seletiva, fotocitotoxicidade e a cinética da TFD [25]. Encapsulação, interações hidrofóbicas, adsorção física e conjugação covalente são alguns métodos possíveis de serem realizados para unificar fotossensibilizadores e carregadores.

De todas as nanopartículas inôrganicas utilizadas em nanomedicina, as constituídas de ouro são as mais utilizadas devido à sua entrega de fotossensibilizadores em tratamentos de câncer por meio da adsorção física [25] (que em alguns casos pode ocorrer eletrostaticamente). Além disso, em alguns casos, essas nanopartículas podem ainda gerar EROs sem um fotossensibilizador, aumentando a eficiência da TFD e, ainda com algumas condições apropriadas, elas podem ser utilizadas na terapia fototérmica (TFT), que consiste na produção de calor para eliminar as células cancerígenas [25, 36]. Nanopartículas derivadas de sílica também são utilizadas na TFD por apresentarem uma boa biocompatibilidade e uma alta estabilidade coloidal nos produtos finais. Outra finalidade destes entregadores de sílica é a possibilidade de poder incorporar radionuclídeos para ativar o fotossensibilizador, além de servir de revestimento para outras nanopartículas [25].

As nanopartículas orgânicas, como as cápsulas formadas à base de um polieletrólito, são responsáveis pelo encapsulamento do fotossensibilizador seguindo a estratégia de camada por camada, o qual possui algumas camadas alternadas de polieletrólitos com cargas opostas em um núcleo inorgânico. Já as micelas, ilustradas na figura 1.10, são nanoestruturas que possuem moléculas anfifilicas, o qual possui um núcleo hidrofóbico e uma coroa hidrofílica, além de poderem possuir formatos unimicelares, esféricos, cilíndricos e elípticos de tamanhos diversificados, entre 5 - 100 nm. Levando em consideração que grande parte dos fotossensibilizadores existentes no mercado são hidrofóbicos, as micelas são fundamentais na aplicação de nanocarregadores. Uma desvantagem das micelas é ter grandes chances de ocorrer uma liberação precoce do fotossensibilizador em outros locais devido à sua facilidade de se ligar com os compostos [25]. Outro tipo de nanocarregador orgânico é os lipossomas, que são pequenas vesículas constituídas por uma bicamada lipídica que engloba um núcleo interno aquoso, podendo carregar, simultaneamente, fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos. Eles são destaque em biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo um dos mais avançados nanocarregadores na atualidade. Além disso, sabe-se que o pH do meio biológico pode influenciar a liberação das drogas no local alvo [37].



Figura 1.10: Ilustração simplificada de uma micela englobando uma nanopartícula.

Neste trabalho, para fazermos algum tipo de comparação entre uma solução sem nanocarregador e uma solução com nanocarregador, utilizou-se dois tipos de nanocarregadores: do tipo Pluronicos[®] (EO)_a(PO)_b(EO)_a, mais especificamente no qual a = 100 e b = 70 e os lipossomas obtidos a partir do fosfolipídeo DPPC (1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina). Estas amostras foram preparadas pela Prof. Dra. Camila Fabiano de Freitas do departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e os detalhes das preparações destas serão trazidas no próximo capítulo.

1.5 Graphene Quantum Dots - GQD's

Nanopartículas à base de carbono são boas candidatas de utilização na TFD. Elas possuem inúmeras formas estruturais, como os nanotubos de carbono (*carbon nanotubes* - CNTs), nanopontos de carbono (*carbon nanodots* - C-dots), fulereno (C_{60}), óxido de grafeno (*graphene oxide* - GO) e os pontos quânticos de grafeno (*graphene quantum dots* - GQD's). Recentemente, descobriu-se que os GQD's têm uma grande capacidade de gerar EROs quando irradiados com uma luz de diferentes comprimentos de onda. Dessa forma, eles estão sendo considerados uma ferramenta muito importante para serem utilizados na TFD. Os GQD's são nanoestruturas semicondutoras de grafeno, alótropos do carbono com hibridização sp^2 que apresentam um diâmetro menor que 10 *nm*. Sua estrutura é altamente compactada, análoga à favos de mel. Eles apresentam fotoestabilidade, alta solubilidade em água, grande área de contato, biocompatibilidade e estabilidade fisiológica, características cruciais que um fotossensibilizador utilizado na TFD precisa ter, sendo inclusive melhores que alguns nanocompostos orgânicos [22, 38]. Além disso, os GQD's são aplicados em diversas áreas ambientais, energéticas e biomédicas por possuírem um grande efeito de fotoluminescência, o qual permite a sua utilização como marcadores de bioimagem e biossensores. Além disso, herdam propriedades térmicas, elétricas e mecânicas equivalentes ou superiores ao grafeno. Na área energética por exemplo, os GQD's podem ser utilizados em capacitores, pilhas e baterias de íon lítio e também em células solares por apresentarem uma ampla superfície de contato e uma alta condutividade. Na literatura, também existem relatos que já foram produzidos micro-supercapacitores utilizando os GQD's [39, 40]. Na área ambiental, os GQD's são utilizados no tratamento de água, detecção de metais pesados em águas e também na sua dessalinização [40].



Figura 1.11: Imagem microscópica dos GQD's disponível em [41].

Por possuírem o efeito de fotoluminescência, os GQD's têm capacidade de atuar como fontes de energia para FS que absorvam o comprimento de onda emitido pelos GQD's [38, 42, 43], podendo potencializar a produção de oxigênio singleto. Desta forma, a união entre GQD e FS já conhecidos comercialmente pode ser aplicada para aumentar a velocidade de inativação fotodinâmica de microrganismos e células [14, 22], e/ou ainda atuar com a terapia fototérmica, uma vez em que estes são excelentes condutores. Ademais, há relatos na literatura que estas nanopartículas à base de carbono podem ainda atuar como nanocarregadores devido a sua ampla superfície plana, auxiliando na entrega de drogas terapêuticas [14, 44, 45].

Alguns métodos de síntese de GQD envolvem matérias-primas de alto custo ou métodos caros e de baixo rendimento, como é o caso da síntese química, ablação a laser e a litografia por feixe de elétrons, o que dificulta a produção em larga escala e o uso comercial. A síntese de GQD utilizando fontes de carvão baratas reduz o custo de produção, permitindo que a indústria produza GQD em larga escala. A literatura nos mostra que algumas das propriedades físicas dos GQD's, como a geração de oxigênio singleto, absorção, luminescência, toxicidade e o tamanho das nanopartículas são dependentes do método de síntese ou a matéria-prima utilizada, o que dificulta a comparação dos estudos das aplicações do GQD [39, 46]. Por exemplo, para o método de esfoliação e desintegração de flocos de grafite utilizado na referência [38], a absorção na região do visível é praticamente nula, com uma alta absorção próximo de 200 nm. Para o método utilizando um laser pulsado [22], tem-se outro espectro de absorção, com um alto pico de absorção próximo de 200 nm e com uma absorção na região do visível levemente maior do que o espectro da referência [38]. Já para o método (este desconhecido) utilizado pela fabricante Sigma Aldrich, teremos um espectro de absorção totalmente diferente dos demais, apresentando uma larga banda de absorção na região $460 - 490 \ nm$, como veremos no próximo capítulo. Estas diferenças dificultam os avanços nos estudos sobre os GQD's de modo geral, pois por mais que sejam denominados GQD's por terem seu tamanho parecido, suas propriedades se alteram consideravelmente [46].

Como vimos, existem vários métodos para se produzir os pontos quânticos de grafeno. A literatura nos mostra que, basicamente, a síntese de GQD pode ser dividida de duas formas: "topdown" e 'bottom-up". Na "top-down", os GQD's são fragmentados a partir de folhas de grafeno por métodos físicos, químicos ou eletroquímicos, enquanto na "bottom-up", os GQD's são formados a partir de materiais precursores, sendo formados e controlados por reações químicas [40]. Para os processos de "top-down", temos o processo hidrotérmico, processo solvotérmico, processo de litografia, técnicas de ultrassom, esfoliação por técnica de "nanotomia", esfoliação química e a esfoliação assistida por microondas. Já para os processos de "bottom-up", temos o processo de pirólise de precursores, síntese orgânica e decomposição do fulereno.

Os estudos das aplicações de GQD em TFD mostram resultados promissores e ainda há muito para avançar. Uma das inúmeras dificuldades que ainda precisam ser superadas seria a produção em massa, além de uma síntese que tenha um alto rendimento e com uma menor quantidade possível de impurezas [39]. Hui et al. [46], mostraram que o GQD obtido via o fulereno reduz drasticamente a viabilidade da bactéria S. aureus, diferentemente do GQD obtido via óxido de grafeno. Markovic et al. [47], mostraram que o GQD sob iluminação de luz azul é capaz de matar células de glioma humano (U251), além de conseguir fácil acesso em células cancerígenas alvo quando são fotoexcitados. Belekov et al. [22], mostraram que os GQD's associados com o azul de metileno destruíram colônias de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de mostrarem que os GQD's não foram tóxicos para células humanas cancerígenas e não-cancerígenas. Nurunnabi et al. [44], mostraram que os GQD's carboxilados não apresentaram nenhuma toxicidade e além disso, ficaram acumulados no fígado, rim, baço e tumor após 24 h de injeção intravenosa em camundongos. Alguns desses resultados conflitantes são atribuidos às diferentes propriedade que o GQD pode apresentar dependendo do método de síntese. Essas variações dificultam a reprodução e ampliação de estudos feitos por diferentes grupos de pesquisa.

1.6 Objetivos

A necessidade de se apresentar novas tecnologias para a terapia fotodinâmica aumenta a cada dia e ainda há muito por vir. Entretanto, uma grande dificuldade apresentada atualmente é de que nem sempre os resultados *in vitro* e *in vivo* são compatíveis, o que a grande maioria das vezes acaba atrasando o andar das pesquisas. Como vimos anteriormente, dependendo do método de síntese dos GQD's, suas propriedades também se alteram consideravelmente a ponto de até não obter um bom rendimento quântico na produção de oxigênio singleto [18]. Dessa forma, utilizaremos o GQD disponível comercialmente pela empresa Sigma Aldrich Inc.⁵ Sigma Aldrich: GQD (Sigma-Aldrich 900713 - aqua green luminescent Graphene Quantum Dots), avaliando alguns aspectos de geração de oxigênio singleto para determinar se o GQD produzido por eles pode ser considerado um fotossensibilizador utilizado na TFD. As vantagens da utilização de amostras comercialmente disponíveis são a possibilidade de outros grupos verificarem, melhorarem o estudo por funcionalização de GQD's com FS em solução micelar e estender o estudo para aplicação in vitro e in vivo. Para analisar esta geração de oxigênio singleto, faremos a fotoativação do GQD na presença de ABDA, pela sua especificidade de reação com o oxigênio singleto. Para o estudo das cinéticas de fotodegradação, utilizaremos um espectrofotômetro UV-VIS, analisando a taxa de fotodegradação do ABDA utilizando diferentes comprimentos de onda de excitação.

A seguir, faremos uma descrição dos materiais e métodos utilizados. Na primeira parte do

 $^{^{5}} https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt$

trabalho, explorararemos o GQD em solução tampão de PBS, verificando sua capacidade de geração de ${}^{1}O_{2}$ sob diferente comprimento de onda de excitação, além de sua fluorescência, fotoestabilidade e capacidade geração de calor. Na segunda parte do trabalho, será explorado o acoplamento de GQD e o FS ERIDEC em micelas poliméricas e lipossomos. Os espectros de absorção mostram que as bandas de absorção ERIDEC são adicionadas ao espectro GQD aumentando a banda de absorção. Em adição, a emissão do GQD é parcialmente absorvida pela ERIDEC. Esta transferência de energia é favorecida pelo curto deslocamento de Stokes entre o pico de absorção da ERIDEC e o pico de emissão do GQD, apresentando uma grande sobreposição entre as duas bandas. A eficiência química de geração de ${}^{1}O_{2}$ para este sistema composto avaliada.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1 Preparação das Amostras

2.1.1 Preparação das Soluções Estoque

A preparação da solução estoque de GQD em água bidestilada (Mili-Q) foi obtida pesando o GQD com uma balança analítica (incerteza $\pm 0,00001~g$) e diluído para obtermos a solução de concentração 0, 125~mg/mL. Igualmente, foi preparada uma solução estoque de GQD em solução salina tamponada com fosfato (do inglês "*phosphate-buffered saline*" ou PBS) com a finalidade de manter o pH da solução constante, próximo de 7,4. Ambas as amostras foram ultrassonificadas por vinte minutos. A solução estoque de ABDA na concentração de 2 nM foi preparada pesando 1,64 mg de ABDA¹ e dissolvendo em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Mallinckrodt). Em seguida, a amostra foi colocada em uma cuba de ultrassom de bancada por dez minutos.

Composição do PBS	-
NaCl	8 g
KCl	$0,2 \ g$
Na_2PO_4	$1,44 \ g$
$\rm KH_2PO_4$	$0,24 \ g$
Água Mili-Q	1 L

Tabela 2.1: Composição do PBS utilizado na solução estoque de GQD em PBS.

Já para a preparação dos nanocarregadores realizados pela Prof. Dra. Camila Fabiano de Freitas do Departamento de Química da UEM, foi preciso mais delhates e muito mais rigor. A eritrosina decil-éster (ERIDEC) foi sintetizada se adaptando as metodologias descritas na literatura [20, 48, 49]. A solução estoque de ERIDEC $(1, 0.10^{-3} mol/L)$ foi preparada em DMSO (Mallinckrodt), sendo padronizada periodicamente. O fosfolipídio 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) foi adquirido da Avant Polar Lipids. O Pluronic[®] F-127 ($MM = 12.600 \ g/mol$) e a biotina foram adquiridos da Sigma Aldrich. Para preparo das micelas poliméricas, o surfactante foi primeiramente seco em dessecador sob vácuo. Os solventes utilizados para a preparação das soluções e purificação dos compostos foram de grau de pureza P.A. e utilizados sem purificação prévia. A água utilizada foi bidestilada.

¹massa molar: 410, 37 g/mol.

2.1.2 Preparação das Micelas Poliméricas e Incorporação dos Fármacos

As micelas copoliméricas de F-127 foram obtidas a partir da metodologia de dispersão sólida, que consiste na solubilização do Pluronic[®] em um solvente com baixo ponto de ebulição [50]. Utilizou-se 1% de surfactante em todas as formulações, o que corresponde a 7,94.10⁻⁴ mol/Lde F-127. Primeiramente, o copolímero foi solubilizado em etanol. Em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo por 20 minutos, a 50 °C em balão de fundo redondo, obtendose uma matriz sólida (filme fino). Após esse processo, a fim eliminar possíveis resíduos do solvente, o sistema foi deixado em dessecador a pressão reduzida durante 24 h. Na sequência, foi realizada a hidratação da matriz sólida se aquecendo o sistema a 60 °C, sob agitação (Banho do tipo Dubnoff com agitação MA-093, Marconi Ltda), até sua completa solubilização (2 h). Uma parcela da amostra foi reservada para ser utilizada como o "branco" das amostras incorporadas com ERIDEC e GQD em diferentes combinações. A incorporação da ERIDEC foi realizada a partir da adição de diminutas alíquotas (5 $\mu L/mL$) da respectiva solução estoque para a obtenção da concentração final igual a $5.10^{-6} \mu M$. Com relação ao GQD, utilizou-se uma balança analítica devidamente calibrada (incerteza $\pm 0,00001 \ q$) para a pesagem do material (0, 125 mg/mL). Os sistemas obtidos são sumarizados na tabela 2.2 e o diâmetro hidrodinâmico, mensurado em DLS, é de aproximadamente 100 nm [51].

2.1.3 Preparação dos Lipossomas Mistos e Incorporação dos Fármacos

Primeiramente, o copolímero F-127 foi covalentemente funcionalizado com biotina para a obtenção do F-127 biotinilado (F-127B), seguindo procedimento sintético descrito na literatura [52]. Para obtenção de lipossomas mistos de DPPC/F-127B também se utilizou a metodologia de dispersão sólida [50]. Partindo dessa premissa, o DPPC $(1, 5.10^{-3} mol/L)$ foi solubilizado em clorofórmio e o F-127B (7, 5.10⁻⁵ mol/L) em metanol para a obtenção de uma mistura final 4:1 (V/V). Posteriormente, o solvente foi removido em um evaporador rotativo à vácuo por 20 min a 40 °C mantendo o balão suspenso ao banho (evaporação a seco), obtendo-se uma matriz de filme fino sólido. Em seguida, a fim de garantir a eliminação completa de resíduos do solvente, o sistema foi deixado em dessecador à pressão reduzida durante 24 h. Após esse período, o filme fino seco foi hidratado com tampão PBS (pH 7,4) mediante aquecimento (40 - 45 °C) e sonicação em uma cuba de ultrassom de bancada (Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA, com frequência de $42 \, kHz$). O processo foi realizado por cerca de 15 min. levando à formação das vesículas lipossomais. Salientamos que não foi necessário utilizar outros métodos de uniformização como extrusão, por exemplo. A incorporação dos fármacos (ERIDEC e GQD) foi realizada seguindo o mesmo protocolo definido anteriormente. Os sistemas obtidos são sumarizados na tabela 2.2.

AMOSTRA	ERIDEC	GQD
F-127 "branco"		
F-127/ERIDEC	Х	
F-127/GQD		Х
F-127/ERIDEC/GQD	Х	Х
DPPC/F-127/ "branco"		
DPPC/F-127/GQD		Х
DPPC/F-127/ERIDEC	Х	
DPPC/F-127/ERIDEC/GQD	Х	Х

Tabela 2.2: Composição das formulações micelares de F-127, [ERIDEC] = $5.10^{-6} mol/L$ e [GQD] = 0,125 mg/mL.

2.2 Fontes de Luz

As fontes de luz utilizadas para realizar as cinéticas de fotodegradação das amostras eram compostas por um suporte, que em seu interior era fixado um LED ligado a um controlador de corrente e tensão. Esse conjunto era colocado a 3 cm de altura da superfície da amostra. No suporte, também se colocou uma lente para focar o máximo de luz dentro da amostra.

Os comprimentos de onda dos LEDs que foram utilizados são: azul (450 nm), ciano (492 nm), verde (517 nm), âmbar (596 nm), branco quente e um sistema *customizado*, o qual continha o LED ciano e branco quente acoplados ao mesmo suporte, mas com controladores de corrente e tensão independentes. Todos os sistemas de luz utilizadas neste trabalho foram fornecidos pelo Departamento de Física da UEM e calibrados usando o espectrorradiômetro Gooch & Housego, Modelo OL 756, como mostra na figura 2.1.



Figura 2.1: Calibração da irradiância do LED branco quente utilizando o espectrorradiômetro.

Levando em conta que os LED's apresentam propriedades físicas diferentes, como por exemplo eficiência luminosa e largura do espectro, para fazer uma comparação das cinéticas de fotobranqueamento é preciso que o número de fótons absorvidos por cada amostra sejam próximos. O número de fótons absorvidos nas cinéticas de fotobranqueamento é definida pela equação [53]:

$$N_{ABS} = \frac{1}{hcN_A} \int_0^t \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} P_e(\lambda)\chi(\lambda,\tau)\lambda d\lambda d\tau, \qquad (2.1)$$

no qual h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, N_A é a constante de Avogadro, t é o tempo de iluminação, $\lambda_{i,f}$ é o comprimento de onda inicial e final respectivamente, $P_e(\lambda)$ é a potência espectral, ou seja, a irradiância espectral integrada sobre a área iluminada, $P_e = \int I \, dA$. O termo $\chi(\lambda, t)$ é chamado de atenuação e é expresso matematicamente por: $\chi(\lambda, t) = 1 - 10^{-A(\lambda,t)}$, onde $A(\lambda, t)$ é a absorbância dependente do tempo de iluminação. A figura 2.2 nos mostra os espectros de irradiância de cada LED utilizado nas cinéticas.



Figura 2.2: As linhas contínuas de (a) e (b) correspondem aos espectros de irradiância dos LED's utilizados nas cinéticas. A linha pontilhada de (a) corresponde ao espectro de absorção do GQD em PBS com [GQD] = 0,125 mg/mL.

2.3 Espectrofotômetro UV-VIS

Os espectros de absorção das amostras e as suas cinéticas de fotodegradação foram realizados utilizando o espectrofotômetro Varian Inc. Cary 50 UV-VIS, como mostra a figura 2.4. Este equipamento se caracteriza por trabalhar com radiação modulada, de forma que a luz externa não causa interferência nas análises.

Seu funcionamento basicamente consiste em emitir um raio luz de uma fonte policromática, o qual será colimado e depois atravessará uma grade de difração para dissociar os espectros da luz. Posteriormente, o feixe de luz irá passar por uma fenda, na qual irá ocorrer a seleção de um dos comprimentos de onda que foram dissociados. Por fim, este feixe de luz monocromático de intensidade I_0 irá atravessar a cubeta (que contém a amostra) e depois chegará no fotodetector com uma intensidade I. O modelo matemático que este equipamento utiliza para calcular a absorção de luz pela cubeta é a *Lei de Lambert-Beer*, que está demonstrada no apêndice A e esquematizado na figura 2.3.



Figura 2.3: Esquema simplificado de funcionamento de um espectrofotômetro.



Figura 2.4: Espectrofotômetro Varian Cary 50 UV-VIS.

Para realizar a medida de absorbância de GQD em PBS, o controlador de temperatura do espectrofotômetro era, primeiramente, ligado e programado para permanecer em 25 °C. Após isto, a linha de base era feita com o PBS puro e depois 2 mL da solução estoque de GQD em PBS com concentração 0, 125 mg/mL eram adicionados na cubeta. A cubeta utilizada era de quartzo, com 10 mm de espessura e duas faces polidas. Para as medidas de absorbância das demais amostras utilizadas neste trabalho, foram utilizados os mesmos procedimentos descritos, com alterações somente na linha de base e da solução estoque em questão.

Para realizar as cinéticas de fotodegradação do GQD em PBS, 50 μL de ABDA da solução estoque foi adicionado à cubeta com 2 mL da solução de GQD em PBS na concentração 0,125 mg/mL. Posteriormente, o suporte de fonte de luz foi colocado de maneira centralizada acima da cubeta. Por fim, o computador foi programado no software do espectrofotômetro para realizar uma nova medida a cada minuto durante certo intervalo de tempo que a cinética foi monitorada. Depois da primeira medida, o LED foi ligado com uma corrente elétrica pré definida, como é possível observar nas figuras 2.5 e 2.6. Os mesmos procedimentos foram adotados para as demais amostras utilizadas neste trabalho.



Figura 2.5: Conjunto utilizado para fotodegradar as amostras no interior do espectrofotômetro.



Figura 2.6: Cubeta sendo irradiada com luz no interior do espectrofotômetro.

2.4 Espectrofluorímetro

Uma outra técnica óptica utilizada nos nossos estudos foi o espectrômetro de fluorescência. A fluorescência é o processo de emissão de radiação eletromagnética de uma substância quando ela é irradiada com uma luz de comprimento de onda expecífico, esquematizado na figura 2.8. Simplificadamente, as moléculas no estado fundamental antes de serem irradiadas são excitadas pela absorção de fótons de comprimento de onda específico. Entretanto, o tempo de vida no estado excitado é muito curto² e logo as moléculas retornam para o estado fundamental perdendo energia na forma de radiação eletromagnética. Para medir os espectros de emissão de

²Podem ser da ordem dos micro/nano/pico segundos.

fluorescência das amostras, foi utilizado o espectrômetro de fluorescência Perkin Elmer, modelo LS45, como mostra a figura 2.7.



Figura 2.7: Espectrômetro de fluorescência Perkin Elmer, modelo LS45.



Figura 2.8: Esquema simplificado de funcionamento de um espectrofluorímetro.

2.5 Espectroscopia de Lente Térmica

A espectroscopia de lente térmica utilizada neste trabalho consiste em um feixe duplo no modo descasado usado para estimar o rendimento de calor gerado pelos GQD's. Dois lasers gaussianos TEM₀₀ contínuos foram usados para gerar e monitorar o efeito de lente térmica (LT), também conhecidos como laser de excitação e de prova, respectivamente. Quando a luz laser de excitação é absorvida, parte da energia é convertida em calor, consequentemente alterando o índice de refração e culminando em um efeito de LT para o laser de prova. Como o calor gerado é dissipado seguindo a lei de difusão, o sinal de LT é dependente do tempo. A solução da equação de difusão nos permite escrever expressão que descreve a variação da intensidade do sinal de LT como[54]

$$I(t) = \frac{|\int_0^\infty exp[(1+iV)g - i\phi(g,t)]dg|^2}{|\int_0^\infty exp[(1+iV)g]dg|^2},$$
(2.2)

sendo $\phi(g,t)$ a diferença de fase induzida na amostra e V um parâmetro geométrico da montagem experimental. Em amostras em que ocorre a fotorreação, a absorção óptica da amostra varia e, consequentemente, a produção de calor gerado e a mudança de caminho óptico também são alterados. Entretanto, o tempo característico do processo de fotorreação nestas amostras, quando excitadas em 532 nm, é muito maior que o tempo característicos térmicos, de modo que somente o processo térmico domina totalmente os transientes para a escala de tempo observado. No caso onde somente efeitos térmicos contribuem para o transiente, a mudança de fase induzida na amostra é dada por [54]:

$$\phi(g,t) = P_{exc} \frac{\theta_{th}}{t_c} \int_0^t \frac{1 - e^{\frac{-2mg}{1 - 2\tau/t_c}}}{1 - 2\tau/t_c} d\tau, \qquad (2.3)$$

na qual $t_c = \omega_{0e}^2/4D$, $m = \omega_{1P}^2/\omega_{0e}^2$, D é a difusividade térmica, ω_{0e} é o raio do laser de prova, ω_{1P} é o raio do laser de excitação e P_{exc} a potência do laser de excitação. A amplitude do sinal de LT, e a fração de calor gerada, está diretamente relacionada com o θ_{th} ,

$$\theta_{th} = -\frac{\beta_0 L \phi}{k \lambda_P} \frac{dn}{dT},\tag{2.4}$$

no qual β_0 é o coeficiente de absorção óptico no comprimento de onda de excitação, L o comprimento da amostra, ϕ o rendimento de calor ou a quantidade de energia que é absorvida e convertida em calor, k a condutividade térmica do material, λ_P o comprimento de onda do laser de prova e dn/dT a variação do índice de refração em função da temperatura. Mais detalhes serão encontrados no apêncide C.



Figura 2.9: Montagem experimental da espectroscopia de lente térmica. L1, L2, L3 e L4 são lentes; M1, M2, M3, M4 e M5 são espelhos. Os sensores são fotodiodos.

Na tabela a seguir, estão disponíveis os valores dos parâmetros geométricos obtidos experimentalmente.

Parâmetro geométrico	Módulo
$\omega_{0P} \ (\mu \mathrm{m})$	69,2
$\omega_{0e} \; (\mu \mathrm{m})$	55,75
$\omega_{1P} \ (\mu \mathrm{m})$	$319,\!05$
m	32,75
V	4,45
$Z_1 (cm)$	8,7
$Z_2 (cm)$	426,5

Tabela 2.3: Parâmetros geométricos de LT.
Capítulo 3

Nanopartículas de Grafeno em PBS

Como comentado anteriormente, o método de síntese dos pontos quânticos de grafeno altera significativamente o seu espectro de absorção. Como não se sabe qual é o método de síntese utilizado pela empresa Sigma Aldrich, precisamos verificar primeiramente como é o espectro de absorção deste composto em água pura e posteriormente em uma solução tampão para comparar com os espectros já conhecidos na literatura. Nas figuras 3.1 e 3.2, vemos os espectros de absorção do GQD em função da concentração, bem como os espectros de emissão quando excitados com vários comprimentos de onda distintos. A partir dos espectros de absorção, definiu-se quais seriam os LED's utilizados para realizar as cinéticas de fotodegradação, podendo assim, fazer uma comparação do rendimento de geração de oxigênio singleto. Desta forma, podemos verificar qual LED seria o mais ideal para aplicar este GQD na terapia fotodinâmica. Uma observação inicial é a larga banda de absorção apresentanda na região de 460 – 490 nm, a qual não é vista na grande parte das amostras de GQD's mencionadas na literatura. De alguma forma isso mostra as particularidades que esta amostra apresenta, diferenciando-se da grande parte dos GQD's aplicados na TFD.

Primeiramente, para definir qual concentração de GQD que seria mais viável para realizar os estudos, foram feitos alguns espectros de absorção de GQD diluídos em água Mili-Q, conforme veremos na figura 3.1. Observando a figura 3.1, podemos notar que a concentração de 0, 125 mg/mL seria a ideal em nossos estudos, por apresentar um pico de absorção próximo de 0,5. Após definirmos essa concentração, a mesma foi utilizada na preparação de amostras de GQD em PBS e posteriormente com nanocarregadores de lipossomas e F-127 que veremos no próximo capítulo. Essa concentração foi utilizada nas cinéticas de fotoativação do GQD nestes compostos na presença de ABDA, nas quais foi possível fazer uma análise mais detalhada da geração de oxigênio singleto.



Figura 3.1: Espectros de absorção do GQD em água com diferentes concentrações.



Figura 3.2: Espectros de emissão do GQD em PBS em solução de 0, 125 mg/mL.

Após feita a análise dos espectros de absorção das amostras com diferentes concentrações, fez-se uma análise dos espectros de emissão excitando a amostra de GQD em PBS na concentração de $0, 125 \ mg/mL$ com vários comprimentos de onda, que são mostrados na figura 3.2. Podemos observar que os picos de emissão do GQD em PBS estão entre $528 - 530 \ nm$ quando a excitação tem comprimento de onda menor que 490 nm. Já quando a excitação é em 517 nm, a emissão tem o pico no comprimento de onda de $542 \ nm$, e quando a excitação é maior ou igual a $532 \ nm$, é visível perceber que há pouca (ou nenhuma) emissão por fluorescência, como era esperado. A maior eficiência de fluorescência ocorre quando a excitação é em torno da banda de absorção do GQD, entre $460 - 490 \ nm$.

Na figura 3.3 (a), vemos que os espectros de absorção do ABDA e do GQD em PBS se somam, mostrando que o ABDA não interage com o GQD. Nas figuras 3.3 (b) e (c), são mostradas as cinéticas em diferentes condições, utilizando o LED branco quente como fonte de excitação ou no escuro. Podemos ver nas figuras 3.3 (b) e (c) que o espectro do ABDA não sofre modificação no caso de ABDA puro na presença de luz ou ABDA + GQD na ausência de luz, demonstrando que a geração de oxigênio singleto é nula nessas condições. Os mesmos resultados são observados para todas as fontes de LED utilizadas nesta amostra. A figura 3.3 (d) mostra a cinética de fotoativação de GQD na presença de ABDA. A diminuição da absorção óptica na região em torno de 490 nm corresponde a fotodegradação do GQD. O GQD não é completamente degradado e um perfil de absorção de crescimento suave para a região do UV é formado após a degradação das bandas em torno de 460 nm e 490 nm. Verificou-se que, mesmo após essa degradação parcial do GQD, a amostra continua fluorescendo, porém com uma intensidade menor. A diminuição da absorção óptica na região em torno de 360 - 400 nmestá relacionada à oxidação do ABDA pelo oxigênio singleto, que converte o ABDA em seu endoperóxido correspondente. A diminuição dos picos de ABDA demonstra a produção efetiva de ${}^{1}O_{2}$ pela fotoativação do GQD.



Figura 3.3: (a) Espectros de absorção iniciais de GQD em PBS e GQD em PBS + ABDA; (b) Cinética de absorção do ABDA + LED branco quente; (c) Cinética de absorção do ABDA sem o LED branco quente; (d) Cinética de absorção do ABDA com o LED branco quente.

A seguir, mostraremos as cinéticas de fotoativação do GQD na presença do ABDA para diferentes fontes de iluminção. As grandezas como a distância do LED em relação a amostra e a concentração de GQD foram fixadas de modo a minimizar as variáveis. Somente a corrente elétrica dos LED foi ajustada para os diferentes comprimentos de ondas, de tal forma que a irradiância fosse próxima para cada LED utilizado nas cinéticas de fotodegradação, como



Figura 3.4: Cinéticas do espectro de absorção do GQD em PBS com a presença de ABDA para diferentes fontes de iluminação: (a) LED customizado, (b) LED branco quente, (c) LED azul, (d) LED ciano, (e) LED verde e (f) LED âmbar.

A figura 3.4 mostra as cinéticas de degradação do GQD em PBS na presença de ABDA com as diferentes fontes de iluminação. Apenas observando a figura 3.4, é possível notar nitidamente que para o LED âmbar não houve produção de oxigênio singleto, diferentemente do LED azul, que foi o LED que melhor se sobressaiu para a produção de oxigênio singleto, conseguindo degradar todo o ABDA até alcançar uma estabilidade no espectro de absorção. Como consequência, este produziu uma maior quantidade de oxigênio singleto. O LED âmbar está quase fora das bandas de absorção do GQD e após a banda de emissão, o que resulta em uma mudança insignificante nas bandas ABDA, apesar da irradiância usada ser alta o suficiente para resultar em um número semelhante de fótons absorvidos em comparação com as outras fontes de LED.

A taxa de geração de oxigênio singleto e a taxa de fotodegradação do GQD pode ser analisada de forma simples pela evolução do espectro de absorção em função do tempo nos comprimentos de onda de 490 nm (pico do GQD) e 380 nm (pico do ABDA), como veremos na figuras 3.5 e 3.6. Estes mesmos gráficos são mostrados em escala mono-logarítmica nas figuras 3.7 e 3.8.



Figura 3.5: Evolução temporal da absorbância do GQD em 490 nm.



Figura 3.7: Evolução temporal da absorbância do GQD em 490 nm.



Figura 3.6: Evolução temporal da absorbância do ABDA em $380 \ nm$.



Figura 3.8: Evolução temporal da absorbância do ABDA em $380 \ nm$.

Como observado, o decaimento da pico do GQD (490 nm) é bem descrito por um comportamento exponencial simples, sendo que a excitação com o LED ciano (banda em 490 nm) induz um processo de degradação maior que os outros LEDs. O LED branco quente apresenta o menor efeito de fotodegração visto que maioria dos fótons absorvidos estão fora das bandas 460 nm e 490 nm. As taxas de degradação (k^{GQD}) obtidas pelo ajuste exponencial para todos os LEDs são apresentadas na Tabela 3.1. A taxa de degradação do GQD também foi estimada para cinética na ausência do ABDA. Observamos um leve, mas não significativo, aumento na taxa de degradação. Isso é esperado, pois vários processos contribuem para a degradação dos FS, incluindo a interação do ${}^{1}O_{2}$ com FS no estado excitado. Porém, uma vez que o ABDA consome uma pequena parcela de oxigênio singleto gerado pela fotoativação do GQD, essa taxa pode ser afetada pela quantidade de ${}^{1}O_{2}$ disponível no meio.

Em relação ao decaimento do pico do ABDA (380 nm), observamos um comportamento diferente. Inicialmente, a geração de ${}^{1}O_{2}$ é mais efetiva, porém a taxa começa a diminuir com o passar do tempo, indo para um decaimento exponencial simples (comportamento linear no gráfico em escala logarítmica) somente em tempo longo. O LED ciano apresenta uma taxa de decaimento do ABDA inicial similar ao LED azul, porém visto que a degradação do GQD nesse comprimento de onda é maior, isso afeta de forma mais significa o número de fótons absorvidos com o tempo de iluminação e a geração correspondente de ${}^{1}O_{2}$. A excitação com

o LED azul produziu uma degradação maior na banda ABDA pelo tempo total de iluminação utilizado na cinética. Isso pode ser explicado pela menor fluorescência e degradação das bandas de GQD do que a fotoativação do ciano. Pelo mesmo motivo, os LEDs verdes e customizado também são eficazes na geração de ${}^{1}O_{2}$. O LED branco quente apresenta a menor taxa de geração de oxigênio singleto e também a menor taxa de degradação do GQD, o que implica em um maior tempo de iluminação para se obter a mesma quantidade de consumo de ABDA. Após a fotodegradação da banda em torno de 460 - 490 nm, o espectro GQD é fotoestável, apresentando um perfil de absorção de crescimento suave para a região do UV. Podemos observar também que, após as bandas do GQD serem totalmente degradadas, os picos ABDA ainda estão diminuindo, mostrando a produção efetiva de oxigênio singleto mesmo após este primeiro estágio, porém com uma taxa mais lenta. Na figura 3.9, mostramos o comportamento inicial das curvas de decaimento do ABDA, cuja inclinação representa de forma aproximada a taxa de geração de ${}^{1}O_{2}$, que vamos chamar de k_{1}^{ABDA} . Os valores de k_{1}^{ABDA} para todos os LEDs são mostrados na tabela 3.1. Essa taxa vai diminuindo conforme as bandas do GQD vão sendo degradadas, atingindo uma estabilidade após esse período e consequentemente, apresentando um comportamento linear em tempos muito longos, como é observado na figura 3.8.



Figura 3.9: Comportamento inicial da evolução temporal da absorbância do GQD em 380 nm.

Para determinarmos a taxa de geração de ${}^{1}O_{2}$ após a degradação da banda do GQD, amostras de GQD foram completamente degradadas por um período de seis horas. Após feita a degradação do GQD, verificou-se como o GQD degradado responderia a uma nova cinética de fotodegradação na presença de ABDA. Na figura 3.10, é mostrado a cinética para a iluminação utilizando o LED azul. No detalhe da figura, é mostrado a evolução temporal do pico do ABDA (380 *nm*) para a amostra antes e após a degradação. Como observado, temos uma diminuição na taxa de geração de ${}^{1}O_{2}$.



Figura 3.10: Cinéticas de absorção do GQD em PBS depois de degradado.

A figura 3.11 nos mostra evolução temporal do pico do ABDA para as cinéticas de fotoativação para os diferentes LEDs nestas amostras degradadas. A inclinação nos fornece a taxa de geração de ${}^{1}O_{2}$ para amostra degradada (k_{2}^{ABDA}) . Os valores de (k_{2}^{ABDA}) são mostrados na Tabela 3.1. Note que o LED azul mostra uma efetividade maior do que os outros LEDs. Isso pode ser explicado pelo fato de que após a degradação temos uma absorção maior nesse comprimento de onda do que para os outros. A capacidade de geração de ${}^{1}O_{2}$ para amostra totalmente degradada nos mostra que o GQD tem um grande potencial de ser utilizado para geração de ${}^{1}O_{2}$ permanente, o qual tem potencial interesse na produção de superfícies antimicrobianas.



Figura 3.11: Comportamento da evolução temporal da absorbância do GQD em 380 nm para a cinética em amostra degradada.

Em 2014, Arnaut *et al.* usaram a relação entre a taxa de produção de oxigênio singleto e a taxa de fotodegradação para determinar as atividades fotodinâmicas relativas de fotossensibilizadores contra várias células cancerosas [55]. No entanto, quando queremos comparar sistemas de iluminação diferentes, essa maneira de se obter a atividade fotodinâmica não é totalmente

interessante, pois não leva em conta o número de fótons efetivamente absorvidos. Uma maneira alternativa de obter a eficiência química de geração de oxigêncio singleto é dada pela razão da taxa de produção de oxigênio singleto pelo número de fótons absorvidos¹, equação 2.1, ou seja, [53]

$$\gamma_i = k_i^{ABDA} / N_{ABS}$$

O resultado para cada LED é apresentado na tabela 3.1 para um tempo de 10 min de excitação, que corresponde aproximadamente a taxa de geração de ${}^{1}O_{2}$ para amostra sem a degradação da banda do GQD. Observamos que, por essa metodologia, a excitação em 450 nm apresenta um eficiência superior em relação aos demais LEDs. A menor eficiência química do LED branco quente está relacionada ao fato de a maior parte dos fótons absorvidos estarem em comprimentos de onda maiores do que os da banda de emissão.

LED	Irrad.	N_{ABS}	N_{ABS}^{deg}	k_1^{ABDA}	k_2^{ABDA}	k^{GQD}	γ_1	γ_2
-	mW/cm^2	$10^{-6} \ mol$	$10^{-6} mol$	$10^{-5}s^{-1}$	$10^{-5}s^{-1}$	$10^{-4}s^{-1}$	$mol^{-1}s^{-1}$	$mol^{-1}s^{-1}$
BQ	5.5	3.3	3.0	10.7	1.3	1.1	32	4.2
Cust.	6.8	4.8	3.9	20.7	1.6	3.4	43	4.0
492 nm	4.8	6.0	3.5	35.9	1.3	5.6	60	3.8
450 nm	4.7	5.3	3.8	43.1	35.5	4.7	80	92.8
517 nm	6.4	5.9	3.0	33.8	1.1	4.0	57	3.7

Tabela 3.1: Irradiância dos LEDs utilizados nas cinéticas de fotodegradação, o número de fótons absorvidos N_{ABS} para $t = 10 \ min$, as taxas de geração de de oxigênio singleto k_i^{ABDA} e as correspondentes eficiências química de geração de oxigênio singleto γ_i .

Por fim, a técnica de lente térmica foi uma ferramenta óptica adicional para estimarmos o calor gerado pelo GQD em PBS. Esta técnica é muito sensível, capaz de analisar soluções com concentrações da ordem de micromolares. No nosso caso, para a medida de lente térmica do GQD em PBS, utilizou-se a concentração de 2 $\mu g/mL$. Utilizando os modelos teóricos para ajustar os resultados experimentais, é possível encontrar alguns parâmetros essenciais da lente térmica, como o tempo característico, t_c , que é dependente da difusividade térmica (D)do fluido em análise e o θ_{th} , demonstrado na equação 2.4, que é proporcional a quantidade de energia que é convertida em calor. A partir do ajuste dos transientes, observamos que $D^{GQD} \approx D^{PBS} = (1,56\pm0,09).10^{-7} m^2/s$, visto que para concentrações tão baixas é esperado que a difusividade térmica da amostra não varia de forma significativa. Para os valores de θ_{th} para o PBS puro e para GQD em PBS, obtemos $\theta_{th}^{GQD} = (1,42\pm0,08) W^{-1} e \theta_{th}^{PBS} =$ $(0,15\pm0,02) W^{-1}$. Entretanto, como a concentração de GQD é muito pequena, é possível assumir que as propriedades do GQD em PBS, como dn/dT e k, são muito próximas das propriedades do PBS puro. Dessa forma,

$$\frac{\theta_{th}^{GQD}}{\theta_{th}^{PBS}}\approx\frac{\beta_{e}^{GQD}\phi^{GQD}}{\beta_{e}^{PBS}\phi^{PBS}}$$

Considerando $\phi^{PBS} = 1$, os valores de $\theta_{th}^{GQD} \theta_{th}^{PBS}$, e a razão dos coeficientes de absorção óptica obtida dos espectros de absorção, obtemos uma estimativa que aproximadamente 50% da energia que é absorvida é convertida em calor. Entretanto, note que esta montagem experimental permitiu encontrar o calor gerado apenas para $\lambda_{exc} = 532 \ nm$. Como verificado anteriormente, a fluorescência varia com o comprimento de onda de excitação, de forma que a eficiência quântica de geração de calor também deverá depender da excitação. Um estudo

¹A rotina feita no software Wolfram Mathematica 7.0 para calcular o número de fótons absorvidos a partir dos espectros das cinéticas é mostrada no apêndice B.

mais detalhado é necessário para obtermos ϕ para outros comprimentos de onda. Contudo, esse resultado nos mostra o potencial do GQD para a aplicação da TFD e da terapia tototérmica (TFT) de forma conjunta.



Figura 3.12: Transientes de LT para (a) PBS puro e (b) GQD em PBS com concentração de $2 \mu g/mL$. As linhas contínuas são os respectivos ajustes utilizando modelo teórico.

Capítulo 4

Nanopartículas de Grafeno em Nanocarregadores

Neste capítulo, investigaremos as propriedades dos GQD's incorporados em nanocarregadores, previamente descritos no capítulo 2, e associados com o fotossensibilizador ERIDEC. Primeiramente, foram feitos os espectros de absorção do GQD em nanocarregadores sem a presença do ABDA. Pode-se notar, por meio da figura 4.1, que com a mudança de meio que os GQD's estão solubilizados, a sua absorbância inicial apresenta um pequena variação, especialmente na região em torno de 600 nm, na qual uma banda adicional é amplificada quando o GQD está solubilizado em F-127 ou lipossomas.



Figura 4.1: Espectros de absorção iniciais dos GQD's em meios diferentes mas com a mesma concentração de 0, 125 mg/mL.

Na análise do GQD em PBS, explorou-se os efeitos dos diferentes comprimentos de onda de excitação na geração de ${}^{1}O_{2}$. Neste capítulo, fixaremos a excitação para o GQD em diferentes meios. Utilizaremos apenas o LED customizado, cujo seu espectro de irradiância é grande o suficiente para atingir o máximo possível das bandas de absorção destas amostras.

Na figura 4.2, temos os espectros de absorção da ERIDEC, $GQD \in GQD + ERIDEC$ acoplados em nanocarregadores de lipossomas e F-127. É possível observar que os espectros de absorção do GQD e da ERIDEC aproximadamente se somam no composto contendo ambos os compostos.



Figura 4.2: Espectros de absorção de nanopartículas de GQD e o FS ERIDEC em nanocarregadores (a) Lipossomas e (b) F-127.

Na figura 4.3, temos os espectros de emissão da solução de ERIDEC e GQD+ERIDECacoplados em nanocarregadores de lipossomas e F-127. Para verificarmos o efeito da ERIDEC no espectro de emissão do GQD, a excitação foi fixada em 462 nm, visto que a ERIDEC tem uma absorção aproximadamente nula nesta região. É possível notar que, quando a ERIDEC está junto com o GQD, ocorre uma diminuição da emissão do GQD, demonstrando que a emissão de GQD é parcialmente absorvida pela ERIDEC, uma vez que a mudança no espectro de emissão para GQD + ERIDEC é como um espelho do espectro de absorção ERIDEC. Esta transferência de energia é favorecida pelo curto deslocamento de Stokes entre o pico de absorção de ERIDEC e o pico de emissão de GQD, apresentando uma grande sobreposição entre as duas bandas.



Figura 4.3: Espectros de emissão de nanopartículas de GQD e o FS ERIDEC em nanocarregadores: (a) Lipossomas e (b) F-127. O comprimento de onda de excitação foi de 462 nm.

As figuras 4.4 e 4.5 mostram as cinéticas dos espectros de absorção dos nanocarregadores F-127 e lipossomas em presença do ABDA, respectivamente. Analogamente ao que foi realizado para o GQD em PBS, o espectrofotômetro era programado para realizar uma nova medida a cada um minuto, em um tempo total de seis horas. O decaimento dos picos do ABDA mostram que os nanocarregadores não impedem a geração oxigênio singleto, que neste caso pode ter contribuição tanto das nanopartículas quanto do FS acoplado. Uma análise visual das cinéticas das figuras 4.4 e 4.5 mostram que a adição da ERIDEC acelera o decaimento das bandas de absorção do ABDA, mostrando o incremento na geração de 1O_2 quando comparada com o GQD puro.



Figura 4.4: Cinéticas do espectro de absorção em nanocarregadores F-127 utilizando o LED customizado para a fotoexcitação.



Figura 4.5: Cinéticas do espectro de absorção em nanocarregadores lipossomas utilizando o LED customizado para a fotoexcitação.

De forma análoga ao método utilizado no capítulo anterior, para a possível comparação das taxas de geração de oxigênio singleto, analisaremos o decaimento do pico do ABDA em 380 nm. Inicialmente, fez-se uma análise da fotodegradação apenas do respectivo nanocarregador puro (branco) na presença do ABDA. Na fotodegradação da solução de lipossomas pura, observou-se que houve um certo ruído na medidas em comprimentos de onda menores que 400 nm. Uma possível explicação para este efeito seria o aumento do espalhamento da luz pelos nanocarregadores, visto que isso ocorre somente quando o LED é acionado. Em adição, os picos do ABDA apresentaram um leve decaimento. Já para as medidas com o F-127 puro, estas não apresentaram ruídos significativos nas cinéticas e o pico do ABDA ficou estável.

A figura 4.6 mostra a comparação do decaimento do pico do ABDA nos diferentes meios para as cinéticas feitas utilizando o LED customizado. Em ambos os nanocarregadores é possível notar, a partir da análise visual, que a taxa de geração de oxigênio singleto dos GQD's é menor comparado ao da ERIDEC. Além disso, ao acoplar a ERIDEC e o GQD no mesmo nanocarregador, ao invés de diminuir o tempo de fotodegradação do pico do ABDA como era esperado, uma vez que agora teríamos duas fontes de geração de oxigênio singleto, ocorre um leve aumento no tempo em relação à fotodegradação da ERIDEC pura para o caso dos lipossomas e basicamente nenhuma variação para o caso do F-127. Como as taxas de geração de 1O_2 são distintas nos dois compostos, quando acoplados, o número de fótons atingindo a amostra acaba sendo em parte compartilhado, de forma que no composto GQD + ERIDEC, o número efetivo de fótons que cada composto absorve acaba sendo menor do que na solução com apenas GQD ou ERIDEC. Outro efeito adicional que pode contribuir é o fato que um composto pode atuar como supressor de estado excitado ("quencher") do segundo composto, diminuindo a transferência de energia para o oxigênio molecular da solução.



Figura 4.6: Comparação do decaimento do pico do ABDA em diferentes meios em função do tempo obtidos das cinéticas com o LED customizado.

A figura 4.7 mostra o mesmo gráfico da figura 4.6, porém em escala mono-logarítmica. Observamos que neste caso o comportamemento é bem próximo a uma exponencial simples. Esse comportamento pode ser entendido pelo fato da fotodegradação dos GQD, e principalmente da ERIDEC ser pequeno, de forma que não afeta de modo substancial a taxa de geração de ${}^{1}O_{2}$. Especialmente no caso do F-127, a ERIDEC praticamente não apresenta degradação ao longo do período que foi monitorado. Isso pode estar relacionado com a posição em que o FS fica quando incorporado nas micelas, o que pode diminuir os processos de fotodegradação,

especialmente a interação FS-FS no estado excitado.



Figura 4.7: Comparação do decaimento do pico do ABDA em diferentes meios em função do tempo obtidos das cinéticas com o LED customizado em gráfico mono-log.

A tabela 4.1 mostra explicitamente os valores da taxa de geração de ${}^{1}O_{2}$ obtidos pelo ajuste exponencial. Neste caso não fizemos o cálculo do número de fótons absorvidos, pois o principal objetivo era observamos a viabilidade do acoplamento dos GQD com outro FS.

Amostra	$k^{ABDA} (10^{-4} s^{-1})$
GQD em F-127	1,7
ERIDEC em F-127	12,9
GQD + ERIDEC em F-127	11,7
GQD em Lipossoma	4,6
ERIDEC em Lipossoma	12,1
GQD + ERIDEC em Lipossoma	9,6

Tabela 4.1: Taxas de geração de de oxigênio singleto, k^{ABDA} , obtidos através do ajuste teórico de uma exponencial simples até t = 100 min.

Os resultados acima mostraram que a adição do GQD+ERIDEC em nanocarregadores não levam a uma adividade na produção de ${}^{1}O_{2}$. Por outro lado, a adição ocorre nos espectros de absorção, o que pode favorecer a utilização de diferentes comprimentos de onda em uma possível aplicação *in vivo*. Esta possibilidade permite um controle de profundidade da ação da TFD devido as propriedades de absorção do tecido biológico. A diferença de geração de ${}^{1}O_{2}$ em diferentes comprimentos de onda poderia ser compensado pelo tempo de exposição, levando a uma dosimetria equivalente. Aliado a isto, a ação da TFD em situações reais depende da localização do FS nas moléculas. Desta forma, o GQD e a ERIDEC podem ser entregues pelos nanocarregadores e se localizarem em regiões diferentes das moléculas, de forma que a efetividade do sistema precisa ser avaliada em estudos *in vitro* e *in vivo* na presença dos respectivos meios biológicos de interesse. Resultados preliminares da adição da ERIDEC e do Azul de Metileno nestas mesmas nanoplataformas mostraram que, apesar de em solução não termos a aditividade, quando aplicados em um estudo *in vitro* os compostos contendo os dois FS foram mais efetivo na destruição das células estudada do que quando somente um FS estava presente, ou quando somente um dos FS era ativado pelo comprimento de onda específico. Isso poderia ser interessante para o tratamento de câncer de pele ou de cérebro. Neste último caso, a aplicação da TFD é feita em conjunto com a cirurgia usual. Como o volume retirado do tumor tem que ser minimizado para evitar efeitos colaterais, muitas vezes acabam ficando células malignas nas bordas da região após a ressecção cirúrgica, o que leva a uma reincidência do tumor. Nesta situação, se o FS utilizado for seletivos às células malignas, a TFD poderia atuar na eliminação destas células após a retirada do tumor, controlando a profundidade pelo comprimento de onda utilizado. Um estudo *in vitro* com células de gliobastoma já está sendo planejado com o objetivo de ver a toxicidade e especificidade destes FS para as células sadias e as células cancerígenas.

Conclusão

Neste trabalho, realizou-se um estudo com nanopartículas de grafeno - GQD disponível comercialmente para uma possível aplicação na terapia fotodinâmica - TFD e na terapia fototérmica - TFT. A intensão inicial em usar uma amostra disponível comercialmente seria a possibilidade de ampliação de estudos *in vitro* e *in vivo* por diferentes grupos de pesquisa, visto os GQD's podem apresentar propriedades distintas dependendo do seu material precursor e também do seu método de síntese.

A aplicação de técnicas ópticas nos permitiu a análise das propriedades destas amostras de GQD em solução simples ou acoplada com outro FS em nanocarregadores. Este estudo é o primeiro passo para a definição de um protocolo no estudo *in vitro* e *in vivo*. A primeira observação é que essas amostras de GQD apresentam um banda de absorção não usual na região 460 - 490 nm, a qual não é fotoestável. Após a degradação desta banda, o espectro de absorção recupera a forma usual observada na literatura para nanopartículas de grafeno, apresentando um crescimento suave na absorção na direção da região UV. Apesar da geração de ${}^{1}O_{2}$ diminuir com a fotodegradação do GQD, observamos uma produção efetiva de oxigênio singleto mesmo após esta primeira etapa, porém com um ritmo mais lento. O fato do GQD continuar gerando oxigênio singleto de forma permanente, em uma larga faixa de comprimentos de onda, permite a visualização de uma aplicação deste composto incorporado em filmes finos na produção de superfícies antimicrobianas iluminadas por luz natural ou artificial.

A técnica de LT mostrou que o GQD é capaz de converter 50% da energia recebida em calor quando excitado em 532 nm, mostrando seu grande potencial na terapia fototérmica - TFT. Adicionalemente, a alta fluorescência próxima do comprimento de onda de 530 nm mostra que as nanopartículas de GQD têm a possibilidade de serem utilizadas para bioimagens e biossensores fluorescentes, demonstrando o potencial teranóstico deste composto.

O acoplamento de nanopartículas de GQD com outros FS em nanocarregadores mostrou que combinação de fotossensibilizadores podem levar a um efeito de competição pelos fótons absorvidos pelos compostos, em adição a um possível efeito "quencher", o que não leva um efeito aditivo direto na taxa de produção de oxigênio singleto. No entanto, a combinação pode aumentar as faixa de absorção efetiva na geração de ${}^{1}O_{2}$, permitindo assim um controle de profundidade mais efetivo para uma possível aplicação *in vivo*.

Este trabalho tinha inicialmente a intenção de estender o estudo para a fase adicional, a qual seria a investigação do potencial antimicrobiano do GQD na inativação de fungos e bactérias. Porém, devido a pandemia da COVID-19, o processo de produção deste composto pela empresa Sigma-Aldrich Inc. foi afetado, e a entrega de novas amostras de GQD foi adiada. No entanto, como perspectivas futuras temos a intenção de efetivar os estudos *in vitro*, além de explorar de forma mais efetiva o acoplamento do GQD com outros tipos de fotossensibilizadores. Um outro ponto de interesse seria a incorporação de GQD em filmes finos para recobrimento de superfícies. Esse tipo de superfície antimicrobiana tem alto interesse no controle de formação de biofilmes em ambientes hospitalares, nos quais a infecção por microrganismos multiresistentes tem levando a um crescimento na letalidade dos casos.

Apêndice A Lei de Lambert-Beer

Uma parcela do feixe de luz com intensidade inicial I_0 será absorvida pela amostra. Essa fração de luz absorvida depende de alguns fatores, como: espessura da cubeta (l), a absorvidade molar da substância (ϵ) e da concentração da substância (c). Como a absorvidade molar é uma constante, a relação entre a quantidade de luz absorvida pela amostra e as grandezas citadas acima pode ser encontrada por dois caminhos distintos:

- 1º caso: quando o decréscimo infinitesimal da luz transmitida dI é devido ao aumento infinitesimal da espessura (dl) da cubeta e a concentração (C) da amostra se mantém constante;
- $2^{\underline{o}}$ caso: quando o decréscimo infinitesimal da luz transmitida dI é devido ao aumento infinitesimal da concentração (dC) da amostra e a espessura (l) da cubeta se mantém constante;

Veremos que no fim, ambos terão o mesmo resultado. Para o 1^{0} caso temos,

$$dI = -I \ \epsilon \ C \ dl$$

Assim integrando em ambos os lados,

$$\int_{I_0}^{I} \frac{dI}{I} = -\int_{0}^{l} \epsilon C \, dl$$
$$ln \frac{I_0}{I} = -\epsilon C \, l$$
$$I = I_0 e^{-\epsilon C \, l}$$
(A.1)

ou

Já para o 2^{Ω} caso temos,

 $dI = -I \epsilon l dC$

Assim integrando em ambos os lados,

$$\int_{I_0}^{I} \frac{dI}{I} = -\int_{0}^{C} \epsilon \ l \ dC$$

$$ln \frac{I_0}{I} = \epsilon \ C \ l$$
(A.2)

ou

 $I = I_0 e^{-\epsilon \ C \ l} \tag{A.3}$

Para uma propagação de distância arbibrária \boldsymbol{z} ao longo da amostra, teremos

$$I(z) = I_0 e^{-\beta z},\tag{A.4}$$

na qual definimos o coeficiente de absorção óptica $\beta = \epsilon C$. A equação (A.4) é conhecida como *Lei de Lambert-Beer*.

Definindo a absorbância como sendo

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I},$$

e utilizando a relação dada pela equação A.4, teremos

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} = \frac{\epsilon \ C \ l}{\ln(10)}.$$

Apêndice B

Cálculo do Número de Fótons Absorvidos do GQD em PBS

Nesta seção de apêndice, será mostrada a rotina desenvolvida no software Mathematica 7.0 para calcular o número de fótons absorvidos pela amostra de GQD em PBS para o LED 450 nm e de maneira análoga, será utilizada também para todos os LEDs utilizados nas demais cinéticas de fotodegradação.

B.1 LED 450 nm



Figura B.1: Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo t = 150 min.



Figura B.2: Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo t = 150 min.



Figura B.3: Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo t = 150 min.



Figura B.4: Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo t = 150 min.



Figura B.5: Rotina do software Mathematica para o cálculo de número de fótons absorvidos pelo GQD em PBS para o LED de 450 nm até um tempo t = 150 min.

Apêndice C

Espectroscopia de Lente Térmica

C.1 Contexto Histórico

O efeito da Lente Térmica (LT) foi observado e descrito em 1964 por Gordon *et al* [56] ao colocar uma cubeta que continha uma amostra líquida dentro de uma cavidade do *laser* de He-Ne. Com isso, observou-se a variação da intensidade do centro do feixe da ordem de milisegundos quando uma amostra era colocada no caminho do feixe emitido pelo *laser*. Assim, chegaram a conclusão de que, quando um feixe atravessa um material que possui uma absorção óptica finita, este gera calor na amostra, aumentando a sua temperatura. Consequentemente, isto acaba influenciando no índice de refração do material afetando o caminho óptico do feixe.

Gordon *et al* [56] propuseram um modelo teórico para este efeito, usando aproximações quadráticas, em que a variação de temperatura induzida foi calculada fazendo a expansão em série de potências de integrais do tipo exponenciais, com termos até segunda ordem da expansão em relação a coordenada radial \mathbf{r} do feixe *laser*. Este modelo descreve bem o comportamento de lente térmica, porém a variação de temperatura e o índice de refração não são parabólicos. Posteriormente, Sheldon *et al* [57] propuseram um novo modelo teórico, levando em conta a variação de fase do feixe e não adotaram o modelo parabólico. Com isso, a teoria da difração foi usada para obter a mudança na intensidade do feixe *laser* na aproximação de campo distante. Os modelos expostos anteriormente foram obtidos para casos que utilizam apenas um *laser*. Posteriormente, foram desenvolvidos modelos utilizando dois feixes de comprimento de onda diferentes, um para excitação da amostra e o outro para prova. J. Shen *et al* [54], desenvolveram um modelo de feixes descasados, no qual os dois feixes possuem diâmetros diferentes. A figura a seguir mostra a ideia do arranjo experimental para o feixe de prova na técnica de LT de modo descasado. O feixe de excitação é colinear (quase colinear) e de diâmetro menor, induzindo os efeitos que serão monitorados pelo feixe de prova.



Figura C.1: Arranjo experimental simplificado para a configuração do feixe de prova na técnica de LT de feixes descasados.

Observe que a amostra é posicionada em z_1 , $z_1 + z_2$ é a distância do foco do *laser* de prova até o fotodetector; enquanto que L é a espessura da cubeta, ω_{1P} é o raio do feixe de prova na amostra, ω_{0P} é o raio da cintura do feixe de prova. Sobre esta configuração experimental representada na figura, é necessário fazer algumas observações:

- a amostra deve ser homogênea e obedecer a lei de Lambert-Beer¹;
- a espessura da amostra deve obedecer à condição de que as seções transversais dos feixes sejam considerados constantes ao passarem pelo interior da amostra;
- as dimensões da amostra são grandes comparados com o ω_{0e} , evitando os efeitos de borda;

C.2 Propagação do Feixe de Prova

A intensidade do feixe de prova [54, 56, 57, 58, 59, 60, 61] é dado, de modo que

$$I(t) = |U_{\rm PS}(t)|^2,$$
 (C.1)

sendo $U_{\rm PS}(t)$ o campo elétrico no plano de saída, o qual em coordenadas cilindricas é descrito pela relação

$$U_{\rm PS}(t) = \frac{i}{\lambda} \int_0^\infty \int_0^{2\pi} U_{\rm PE}(r,t) \frac{\left(\frac{1+\cos(2\alpha)}{2}\right)}{|z_2 - r|} e^{\frac{-i2\pi|z_2 - r|}{\lambda}} r dr d\theta$$
(C.2)

em que $U_{\text{PE}}(r,t)$ é a amplitude no plano de entrada. Para simplificar a expressão anterior, são feitas algumas aproximações como:

• $z_2 \gg r$

• Para ângulos pequenos, temos
$$\left(\frac{1+\cos(2\alpha)}{2}\right) \approx 1$$

- $|z_2 r| \approx z_2$
- Expandindo o termo em exponencial, $\frac{2\pi}{\lambda} |z_2 r| \approx \frac{2\pi}{\lambda} (z_2^2 + r^2)^{0,5} \approx \frac{2\pi}{\lambda} (z_2 + \frac{r^2}{2z_2}).$

A última expressão é chamada de grau de aproximação de Fresnel. Assim, com estas aproximações, podemos reescrever (C.2) da seguite forma:

$$U_{\rm PS}(t) = A \int_0^\infty \int_0^{2\pi} U_{\rm PE}(r,t) e^{\frac{-i\pi r^2}{\lambda z_2}} r dr d\theta, \qquad (C.3)$$

sendo A uma constante. Além disso, considerando que $U_{\rm PE}$ é composto por ondas esféricas de raio de curvatura R, a amplitude complexa do campo elétrico no plano de entrada de um feixe de modo TEM₀₀ [59, 60, 62] é dado por

$$U_{PE}(r,t) = \frac{\sqrt{\frac{2P_P}{\pi}}}{\omega_P} e^{\left(\frac{-r^2}{(\omega_{1P})^2}\right)} e^{\left(\frac{-i}{\lambda_P}\left(2\pi z_1 + \frac{r^2}{R_{1P}}\right)\right)}.$$
 (C.4)

 P_P é a potência incidente, R_{1P} é o raio de curvatura em z_1 e λ_P é o comprimento de onda do feixe de prova.

¹relação matemática entre a absorbância de uma solução e a sua concentração, quando atravessada por um feixe de luz monocromático colimado.

Após a interação com a amostra, o feixe sente o efeito de Lente Térmica, adquirindo uma fase extra em sua amplitude que pode ser expressa por:

$$U_{PE}(r, z_1, t) = Be^{\left(-i\left(\frac{\pi r^2}{\lambda_P R_{1P}} + \phi(r, t)\right) - \frac{r^2}{\omega_{1P}^2}\right)},$$
(C.5)

 sendo

$$B = \frac{\sqrt{\frac{2P_P}{\pi}}}{\omega_P} e^{\left(\frac{-i}{\lambda_P}(2\pi z_1)\right)}.$$
 (C.6)

Desta forma, a amplitude complexa do centro do feixe de prova é dada por:

$$U_{PS}(r, z_1 + z_2, t) = \frac{i}{\lambda_P z_2} e^{-\left(\frac{i2\pi Z_2}{\lambda_P}\right)} \int_0^{2\pi} \int_0^{\infty} e^{\left(\frac{-i\pi r^2}{\lambda_P z_2}\right)} \frac{\sqrt{\frac{2P_P}{\pi}}}{\omega_P} e^{\left(\frac{-i}{\lambda_P}(2\pi z_1)\right)} e^{\left(-i\left(\frac{\pi r^2}{\lambda_P R_{1P}} + \phi(r,t)\right) - \frac{r^2}{\omega_{1P}^2}\right)} r dr d\theta.$$
(C.7)

Integrando em θ , obtemos

$$U_{PS}(r, z_1 + z_2, t) = \frac{2\pi i}{\lambda_P z_2} e^{-\left(\frac{i2\pi z_2}{\lambda_P}\right)} \int_0^\infty Be^{\left(-i\left(\frac{\pi r^2}{\lambda_P R_{1P}} + \phi(r, t)\right) - \frac{r^2}{\omega_{1P}^2}\right)} e^{\left(\frac{-i\pi r^2}{\lambda_P z_2}\right)} r dr.$$
(C.8)

Agora, fazendo a mudança de variáveis

$$g = \frac{r^2}{\omega_{1P}^2} \to dg = \frac{2r}{\omega_{1P}^2} \tag{C.9}$$

e substituindo (C.9) em (C.8), temos

$$U_{PS}(r, z_1 + z_2, t) = C \int_0^\infty e^{\left(-i\left(\frac{\pi}{\lambda_P} \left(\frac{\omega_{1P}^2}{R_{1P}} + \frac{\omega_{1P}^2}{z_2}\right)g + \phi(r, t)\right) - g\right)} e^{\left(\frac{-i\pi r^2}{\lambda_P z_2}\right)} dg,$$
(C.10)

 sendo

$$C = B \frac{i\pi\omega_{1P}^2}{\lambda_P z_2} e^{-\left(\frac{i2\pi z_2}{\lambda_P}\right)},\tag{C.11}$$

$$\omega_{1P}^2 = \omega_{0P}^2 \left(1 + \left(\frac{z1}{Zcp}\right)^2 \right), \qquad (C.12)$$

$$R_{1P} = \frac{z1^2 + Zcp^2}{z1} \tag{C.13}$$

е

$$Zcp = \frac{\pi\omega_{0P}^2}{\lambda_P},\tag{C.14}$$

na qual Z_{cp} é a distância confocal do feixe de prova. De (C.10), tem-se

$$U_{PS}(z_1 + z_2, t) = C \int_0^\infty e^{\left(-g - i\left(\frac{z_1}{Z_{cp}} + \frac{Z_{cp}}{z_2}\left(1 + \left(\frac{z_1}{Z_{cp}}\right)^2\right)\right)g + \phi(g, t)\right)} dg.$$
(C.15)

Adotando um parâmetro V de forma

$$V = \frac{z_1}{Z_{cp}} + \frac{Z_{cp}}{z_2} \left(1 + \left(\frac{z_1}{Z_{cp}}\right)^2 \right)$$
(C.16)

e fazendo a substituição em (C.15), obtemos

$$U_{PS}(z_1 + z_2, t) = C \int_0^\infty e^{-(1+Vi)g} e^{-i\phi(g,t)} dg.$$
(C.17)

Para a obtenção da fase induzida pelo feixe *laser*, precisamos descrever o perfil de temperatura induzido na amostra. A variação da temperatura na amostra levará a uma varição do índice de refração e consequentemente à uma variação do caminho óptico do feixe. A seguir, descreveremos como é a variação da temperatura e a fase induzida em amostras sem/com fotorreação, respectivamente.

C.3 Modelo teórico sem fotorreação

C.3.1 Perfil de Temperatura

A propagação do calor gerado pela absorção do feixe *laser* de excitação incidido em uma amostra é descrita pela equação de difusão de calor [63],

$$\frac{\partial T(r,z,t)}{\partial t} - D\nabla^2 T(r,z,t) = Q(r,z), \qquad (C.18)$$

sendo

$$Q(r,z) = Q_0 Q(z) e^{\frac{-2r^2}{\omega_{0e}^2}},$$
(C.19)

onde D a difusividade térmica dada por $D = \frac{k}{c\rho}$, k a condutividade térmica, c o calor específico e ρ é a densidade. Além disso, $Q_0 = \frac{2P_{exc}\phi\beta_0}{\rho c\pi\omega_{0e}^2}$, sendo P_{exc} a potência do *laser* de excitação, ϕ é a quantidade energia absorvida que é convertida em calor e β_0 é o coeficiente de absorção óptico no comprimento de onda do feixe de excitação.

Para resolver a equação (C.18), será utilizado o método das transformadas integrais, que consiste em resolver a equação (C.18) em um outro espaço diferente do espaço das coordenadas (r, z, t), resultando em uma solução mais simples. Depois, será aplicada as transformadas inversas para voltar ao espaço (r, z, t). Em nosso caso, usaremos algumas aproximações válidas no ponto de vista experimental, como o caso em que o tamanho da amostra é muito grande em comparação com o raio do laser de excitação. Também não consideraremos trocas de calor entre a amostra e o meio externo, bem como a temperatura inicial da amostra é unifome. Matematicamente, expressamos respectivamente os casos da forma:

$$T(\infty, z, t) = 0, \tag{C.20}$$

$$\frac{\partial T(r,0,t)}{\partial t} = 0 \tag{C.21}$$

е

$$T(r, z, 0) = 0.$$
 (C.22)

Além disso, para simplificar as expressões matemáticas e facilitar suas soluções, ao invés de serem usadas as coordenadas cartesianas, serão usadas coordenadas cilíndricas. Assim, o laplaciano que aparece na equação (C.18) é dado por:

$$\nabla^2 T = \frac{1}{r} \frac{\partial T(r, z, t)}{\partial r} \left(r \frac{\partial T(r, z, t)}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 T(r, z, t)}{\partial \phi^2} + \frac{\partial^2 T(r, z, t)}{\partial z^2}$$
(C.23)

Levando em consideração que o nosso sistema tem uma simetria azimutal (em ϕ), a equação (C.23) será reescrita da forma:

$$\nabla^2 T = \frac{1}{r} \frac{\partial T(r, z, t)}{\partial r} \left(r \frac{\partial T(r, z, t)}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 T(r, z, t)}{\partial z^2}.$$
 (C.24)

Note que será usada as transformadas integrais que são adequadas as condições de contorno e a simetria do sistema. Para o tempo, usaremos a transformada de Laplace. Para a condição de contorno z = 0, usaremos a transformada de Fourier Cosseno. Por fim, para a simetria radial, usaremos a transformada de Hankel.

Primeiramente vamos lembrar que a transformada de Laplace é definida por:

$$f(s) = \mathcal{L}\{f(t)\} = \int_0^\infty f(t)e^{-st}dt.$$
 (C.25)

Aplicando a transformada de Laplace na equação (C.18),

$$\mathcal{L}\left\{\frac{\partial T(r,z,t)}{\partial t} - D\nabla^2 T(r,z,t)\right\} = \mathcal{L}\left\{Q(r,z)\right\}$$

e portanto,

$$sT(r,z,s) - D\nabla^2 T(r,z,s) = \frac{Q(r,z)}{s}$$
(C.26)

Agora vamos lembrar que a transformada de Hankel de ordem n é definida por:

$$f(\alpha) = \mathcal{H}_n\{f(r)\} = \int_0^\infty f(r) J_n(\alpha r) r dr$$
(C.27)

onde J_n é a função de Bessel de ordem n. Aplicando a transformada de Hankel de ordem zero na equação (C.26),

$$\mathcal{H}_0\{sT(r,z,s) - D\nabla^2 T(r,z,s)\} = \mathcal{H}_0\left\{\frac{Q(r,z)}{s}\right\},\tag{C.28}$$

portanto,

$$sT(\alpha, z, s) + D\alpha^2 T(\alpha, z, s) = \frac{Q_0 Q(\alpha) Q(z)}{s}$$
(C.29)

com

$$Q(\alpha) = \frac{\omega_{0e}^2}{4} e^{-\frac{1}{8}\alpha^2 \omega_{0e}^2}.$$

Por fim, vamos lembrar da transformada de Fourier em cossenos, que é definida por:

$$f(\lambda) = \mathcal{F}_c\{f(z)\} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(z) \cos(\lambda z) dz$$
(C.30)

Aplicando a transformada de Fourier em cossenos na equação (C.29),

$$\mathcal{F}_c\{sT(\alpha, z, s) + D\alpha^2 T(\alpha, z, s)\} = \mathcal{F}_c\left\{\frac{Q_0Q(\alpha)Q(z)}{s}\right\},\tag{C.31}$$

portanto,

$$sT(\alpha,\lambda,s) + D\alpha^2 T(\alpha,\lambda,s) + D\lambda^2 T(\alpha,\lambda,s) = \frac{Q_0 Q(\alpha)Q(\lambda)}{s}$$
(C.32)

Reorganizando os termos e isolando $T(\alpha, \lambda, s)$ teremos,

$$T(\alpha, \lambda, s) = \frac{Q_0 Q(\alpha) Q(\lambda)}{s(s + D(\alpha^2 + \lambda^2))}$$
(C.33)

Veja que a equação (C.33) está no espaço Hankel-Fourier-Laplace. Para encontrarmos a solução do perfil de temperatura no espaço das coordenadas (r, z, t), basta aplicar agora as transformadas inversas de cada coordenada. Aplicando a transformada inversa de Laplace na equação (C.33), temos

$$T(\alpha, \lambda, t) = \frac{Q_0 Q(\alpha) Q(\lambda) \left(1 - e^{-Dt(\alpha^2 + \lambda^2)}\right)}{D(\alpha^2 + \lambda^2)}.$$
 (C.34)

Observe que o termo

$$\frac{\left(1 - e^{-Dt(\alpha^2 + \lambda^2)}\right)}{D(\alpha^2 + \lambda^2)} \tag{C.35}$$

pode ser reescrito da forma

$$\frac{\left(1 - e^{-Dt(\alpha^2 + \lambda^2)}\right)}{D(\alpha^2 + \lambda^2)} = \int_0^t e^{-D(\alpha^2 + \lambda^2)\tau} d\tau$$
(C.36)

Assim,

$$T(\alpha, \lambda, t) = \int_0^t Q_0 Q(\alpha) Q(\lambda) e^{-D(\alpha^2 + \lambda^2)\tau} d\tau$$
(C.37)

Agora, aplicando a transformada inversa de Hankel com

$$Q(\alpha) = \frac{\omega_{0e}^2}{4} e^{-\frac{1}{8}\alpha^2 \omega_{0e}^2},$$

temos,

$$T(r,\lambda,t) = \int_0^t \int_0^\infty Q_0 Q(\lambda) \frac{\omega_{0e}^2}{4} e^{-\frac{1}{8}\alpha^2 \omega_{0e}^2} e^{-D(\alpha^2 + \lambda^2)\tau} J_0(\alpha r) \alpha d\alpha d\tau$$
(C.38)

ou seja,

$$T(r,\lambda,t) = \int_0^t Q_0 Q(\lambda) \frac{\omega_{0e}^2}{4} \frac{4e^{-D\lambda^2 \tau - \frac{2r^2}{8D\tau + \omega_{0e}^2}}}{8D\tau + \omega_{0e}^2} d\tau$$
(C.39)

introduzindo uma nova variável $t_c = \frac{\omega_{0e}^2}{4D}$ na equação acima e simplificando-a, teremos²

$$T(r,\lambda,t) = \int_0^t Q_0 Q(\lambda) e^{\frac{-\omega_{0e}^2 \lambda^2 \tau}{4t_c}} \left(\frac{e^{\frac{-2r^2/\omega_{0e}^2}{1+2\tau/t_c}}}{1+2\tau/t_c}\right) d\tau$$
(C.40)

Por fim, para finalizarmos a resolução do problema, basta aplicar a transformada inversa de Fourier em cossenos na equação considerando que a atenuação obedecerá à Lei de Lambert-Beer dada por³:

$$Q(z) = e^{-\beta z} \tag{C.41}$$

ou seja, a transformada de Fourier em cossenos para o termo de fonte é

$$Q(\lambda) = \mathcal{F}_c\{e^{-\beta z}\} = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{\beta}{\beta^2 + \lambda^2}.$$
 (C.42)

Assim, a equação (C.40) será

$$T(r,\lambda,t) = \int_0^t Q_0 \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{\beta}{\beta^2 + \lambda^2} e^{\frac{-\omega_{0e}^2 \lambda^2 \tau}{4t_c}} \left(\frac{e^{\frac{-2r^2/\omega_{0e}^2}{1+2\tau/t_c}}}{1+2\tau/t_c}\right) d\tau$$
(C.43)

Para conseguir inverter a transformada de Fourier em cossenos é necessário utilizar o teorema da convolução, dado por:

$$\mathcal{F}_c^{-1}\{Q(\lambda)G(\lambda)\} = f(z) * g(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_0^\infty f(\epsilon)[g^+(z-\epsilon) + g(z+\epsilon)]d\epsilon \tag{C.44}$$

 $^{^{2}}t_{c}$ é chamado de tempo característico de formação de lente térmica.

³Este modelo teórico também é conhecido como BLM, abreviação de "Beer Lambert Model".

em que g^+ é a extensão par de g(z), $f(z) = \mathcal{F}_c^{-1}\{Q(\lambda)\} \in g(z) = \mathcal{F}_c^{-1}\{G(\lambda)\}$. Neste caso, as funções $Q(\lambda) \in G(\lambda)$ que utilizaremos são,

$$Q(\lambda) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{\beta}{\beta^2 + \lambda^2} \tag{C.45}$$

е

$$G(\lambda) = e^{\frac{-\omega_{0e}^2 \lambda^2 \tau}{4t_c}} \tag{C.46}$$

cuja as transfomadas inversas de Fourier em cossenos de $Q(\lambda)$ e $G(\lambda)$ são respectivamente

$$\mathcal{F}_c^{-1}\{Q(\lambda)\} = e^{-\beta z} \tag{C.47}$$

е

$$\mathcal{F}_{c}^{-1}\{G(\lambda)\} = \frac{e^{-\frac{t_{c}z^{2}}{\tau\omega_{0e}^{2}}}\sqrt{2t_{c}}}{\sqrt{\tau\omega_{0e}^{2}}}.$$
(C.48)

Dessa forma o teorema da convolução (C.44) fica da forma

$$f(z) * g(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_0^\infty e^{-\beta\epsilon} \left[\frac{e^{-\frac{t_c(z-\epsilon)^2}{\tau\omega_{0e}^2}}\sqrt{2t_c}}{\sqrt{\tau\omega_{0e}^2}} + \frac{e^{-\frac{t_c(z+\epsilon)^2}{\tau\omega_{0e}^2}}\sqrt{2t_c}}{\sqrt{\tau\omega_{0e}^2}} \right] d\epsilon$$

$$f(z) * g(z) = \frac{1}{2} e^{\frac{1}{4}\beta \left(\frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 - 4z}{t_c} - 4z\right)} \times \left(Erfc\left(\frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 - 2zt_c}{2\omega_{0e}\sqrt{\tau t_c}}\right) + e^{2z\beta} Erfc\left(\frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 + 2zt_c}{2\omega_{0e}\sqrt{\tau t_c}}\right) \right)$$
(C.49)

Onde Erfc é a função erro complementar⁴. Substituindo o resultado da equação (C.49) na equação (C.43), teremos

$$T_{BLM}(r,z,t) = \frac{Q_0}{2} \int_0^t e^{\frac{1}{4}\beta \left(\frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 - 4z}{t_c} - 4z\right)} e^{\frac{-\omega_{0e}^2\lambda^2\tau}{4t_c}} \left(\frac{e^{\frac{-2r^2/\omega_{0e}^2}{1 + 2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c}\right) \times \left(Erfc\left(\frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 - 2zt_c}{2\omega_{0e}\sqrt{\tau t_c}}\right) + e^{2z\beta}Erfc\left(\frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 + 2zt_c}{2\omega_{0e}\sqrt{\tau t_c}}\right)\right) d\tau. \quad (C.50)$$

o qual (C.50) é a solução da equação (C.18), que fica dependendo de uma integral numérica.

O modelo BLM é um modelo completo para a investigação da variação de temperatura em uma amostra causada por um feixe *laser* gaussiano no modo TEM_{00} . Agora, vamos considerar duas aproximações de casos limites: quando o coeficiente de absorção óptico tende a ser nulo e quando o coeficiente de absorção óptico tende ao infinito.

• Modelo de Baixa Absorção - LAM

O modelo LAM, abreviação de "Low Absorption Model", é uma aproximação utilizada quando $\beta \to 0$. Assim, a equação (C.40) terá Q(z) = 1. Aplicando a transformada de Fourier em cossenos da forma

$$Q(\lambda) = \mathcal{F}_c\{1\} = \sqrt{2\pi\delta(\lambda)} \tag{C.51}$$

 ${}^{4}Erfc(x) = 1 - Erf(x)$

onde $\delta(\lambda)$ é a função delta de Dirac. Assim, a equação (C.40) será

$$T(r,\lambda,t) = \int_0^t Q_0 \sqrt{2\pi} \delta(\lambda) e^{\frac{-\omega_{0e}^2 \lambda^2 \tau}{4t_c}} \left(\frac{e^{\frac{-2r^2/\omega_{0e}^2}{1+2\tau/t_c}}}{1+2\tau/t_c}\right) d\tau \tag{C.52}$$

Dessa forma, aplicando a transformada inversa de Fourier em cossenos na equação (C.52) teremos a solução

$$T(r,z,t) = Q_0 \int_0^t \frac{e^{\frac{-2r^2/\omega_{0e}^2}{1+2\tau/t_c}}}{1+2\tau/t_c} d\tau$$
(C.53)

• Modelo de Alta Absorção - HAM

O modelo HAM, abreviação de "High Absorption Model", é uma aproximação utilizada quando $\beta \to \infty$. Assim, a equação (C.40) terá $Q(z) \cong \frac{2}{\beta}\delta(z)$. Aplicando a transformada de Fourier em cossenos da forma

$$Q(\lambda) = \mathcal{F}_c\{\frac{2}{\beta}\delta(z)\} = \sqrt{\frac{2}{\pi}}\frac{1}{\beta}$$
(C.54)

Assim, a equação (C.40) será

$$T(r,\lambda,t) = \int_0^t Q_0 \sqrt{\frac{2}{\pi}} \frac{1}{\beta} e^{\frac{-\omega_{0e}^2 \lambda^2 \tau}{4t_c}} \left(\frac{e^{\frac{-2r^2/\omega_{0e}^2}{1+2\tau/t_c}}}{1+2\tau/t_c}\right) d\tau$$
(C.55)

Dessa forma, aplicando a transformada inversa de Fourier em cossenos na equação (C.55) teremos a solução

$$T(r,z,t) = \frac{2Q_0}{\beta} \int_0^t \sqrt{\frac{t_c}{\pi\omega_{0e}^2 \tau}} e^{\frac{-t_c z^2}{\tau\omega_{0e}^2}} \frac{e^{\frac{-2\tau^2/\omega_{0e}^2}{1+2\tau/t_c}}}{1+2\tau/t_c} d\tau$$
(C.56)

C.3.2 Diferença de fase

A diferença de fase induzida ($\Phi(r, z, t)$) no feixe de prova é devido ao gradiente de temperatura causado pelo feixe de excitação. Matematicamente a fase induzida pode ser escrita de forma aproximada por [56, 58, 59, 64]:

$$\Phi(r, z, t) = \frac{2\pi}{\lambda_P} L \frac{dn}{dT} [T(r, z, t) - T(0, z, t)]$$
(C.57)

onde $\frac{dn}{dT}$ é a variação do índice de refração da amostra em função da temperatura e L é o comprimento da amostra. Utilizando a solução da temperatura do modelo BLM dada pela equação (C.50), lembrando que $Q_0 = \frac{2P_e\phi\beta_0}{\rho c\pi\omega_{0e}^2}$, introduzindo duas novas variáveis $m = (\omega_{1p}/\omega_{0e})^2$ e $g = (r/\omega_{1p})^2$, substituindo-as na equação (C.57) e a simplificando, teremos

$$\Phi_{BLM}(g,t) = P_{exc} \frac{\theta_{th}}{2t_c} \int_0^t e^{\frac{1}{4}\beta \left(\frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 - 4z}{t_c} - 4z\right)} e^{\frac{-\omega_{0e}^2\lambda^2\tau}{4t_c}} \left(\frac{1 - e^{\frac{-2mg}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c}\right) \times \left(Erfc\left(\frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 - 2zt_c}{2\omega_{0e}\sqrt{\tau t_c}}\right) + e^{2z\beta}Erfc\left(\frac{\beta\tau\omega_{0e}^2 + 2zt_c}{2\omega_{0e}\sqrt{\tau t_c}}\right)\right) d\tau, \quad (C.58)$$

 com

$$\theta_{th} = -\frac{\phi\beta L}{k\lambda_p}\frac{dn}{dT}.$$
(C.59)

Da mesma forma, utilizando a solução da temperatura do modelo LAM dada pela equação (C.53), a diferença de fase para este modelo será,

$$\Phi_{LAM}(g,t) = P_{exc} \frac{\theta_{th}}{t_c} \int_0^t \frac{1 - e^{\frac{-2mg}{1+2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c} d\tau,$$
(C.60)

com θ_{th} dado pela equação (C.59). Por fim, utilizando a solução da temperatura do modelo HAM dada pela equação (C.56), a diferença de fase para este modelo será,

$$\Phi_{HAM}(g,t) = P_{exc} \frac{\theta_{th}}{t_c} \frac{2\sqrt{t_c}}{\beta\sqrt{\pi\omega_{0e}^2}} \int_0^t \frac{1}{\sqrt{\tau}} e^{\frac{-t_c z^2}{\tau\omega_{0e}^2}} \left(\frac{1 - e^{\frac{-2mg}{1 + 2\tau/t_c}}}{1 + 2\tau/t_c}\right) d\tau, \tag{C.61}$$

com θ_{th} também dado pela equação (C.59).

C.4 Modelo teórico com fotorreação

C.4.1 Perfil de Temperatura

Quando ocorre um processo de fotorreação de uma amostra é preciso levar em consideração o gradiente de concentração induzido pelo feixe de excitação, além do grandiente de temperatura. Assumindo, por exemplo, que ocorra uma reação de primeira ordem [65, 66], ou seja,

$$C_R + h\nu \to C_P.$$
 (C.62)

onde C_R é a concentração dos reagentes , $h\nu$ é a energia do fóton incidente na amostra e C_P é a concentração dos produtos, a concentração local do reagente é dada pela a equação de difusão de massa,

$$\frac{\partial C_R(r,t)}{\partial t} - D_m \nabla^2 C_R(r,t) = -\frac{2P_e \sigma}{\pi \omega_{0e}^2 h\nu} e^{\frac{-2r^2}{\omega_{0e}^2}} C_R(r,t), \qquad (C.63)$$

onde o D_m é o coeficiente de difusão de massa e σ é a seção de choque. A equação anterior ainda não possui uma solução analítica conhecida. Em geral, a difusão de massa é muito mais lenta em relação à difusão térmica. Assumindo uma aproximação que foi elaborada por *Pedreira et al*, onde utilizamos uma média espacial para a concentração dos reagentes, $C_R(t) = \langle C_R(r,t) \rangle$, conseguimos obter uma equação simplificada para a taxa da concentração:

$$\frac{dC_R(t)}{dt} = -k_T C_R(t). \tag{C.64}$$

Integrando em ambos os lados em relação a t, temos que $C_R(t)$ é dado por:

$$C_R(t) = C_0 e^{-k_T t}.$$
 (C.65)

Observe que esta solução é bem mais simples do que se espera para resolver a equação (C.63), que é obtida com métodos númericos. O coeficiente de absorção óptica, no caso em que ocorre foto-modificação na região iluminada, é definido como

$$\beta(r,t) = \epsilon_R C_R(r,t) + \epsilon_P C_P(r,t) \tag{C.66}$$

ou ainda

$$\beta(t) = \beta_0 \left[(1 - \epsilon) \frac{C_R(t)}{C_0} + \epsilon \right], \qquad (C.67)$$

na qual $\beta_0 = \beta(0)$ é o coeficiente de absorção óptica do reagente, $\epsilon = \epsilon_P/\epsilon_R$ é a razão entre a absorvidade molar do produto e do reagente. Substituindo (C.65) em (C.67), obtemos

$$\beta(t) = \beta_0 \left[(1 - \epsilon) e^{-k_T t} + \epsilon \right].$$
(C.68)

Analogamente à equação (C.18) utilizada para o modelo sem fotorreação, utilizaremos a equação de difusão de temperatura da forma

$$\frac{\partial T(r,t)}{\partial t} - D\nabla^2 T(r,t) = Q(r,t), \qquad (C.69)$$

com

$$Q(r,t) = Q_0 e^{\frac{-2r^2}{\omega_{0e}^2}} \beta(r,t) f(t), \qquad (C.70)$$

 \mathbf{e}

$$f(t) = (1 - \Theta(t - \chi)).$$
 (C.71)

Note que a atenuação do feixe na direção \hat{z} foi negligenciado, considerando que as amostras fotossensíveis utilizadas no experimento apresentam baixa absorção óptica. O termo $f(t) = 1 - \Theta(t - \chi)$, sendo $\Theta(t - \chi)$ a função de Heaviside⁵, representa o *laser* ligado/desligado durante um intervalo de tempo χ .

Utilizando o problema novamente em coordenadas cilíndricas, aplicando os mesmos métodos de transformadas integrais utilizadas para o modelo teórico sem fotorreação e depois utilizando as respectivas transformadas inversas, chegaremos na solução da equação de difusão de temperatura,

$$T(r,t) = Q_0 \beta_0 \left((1-\epsilon)e^{-k_T t} \int_0^t e^{k_T \tau} \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega_{0e}^2}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)}}}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)} d\tau + \epsilon \int_0^t \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega_{0e}^2}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)}}}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)} d\tau \right).$$
(C.72)

Veja que se não ocorrer fotorreação, ou seja, em que k_T seja nulo, a expressão é simplificada da forma [3]

$$T(r,t) = Q_0 \beta_0 \int_0^t \frac{e^{-\frac{2r^2/\omega_{0e}^2}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)}}}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)} d\tau.$$
 (C.73)

C.4.2 Diferença de Fase

Utilizando a expressão da diferença de fase vista na equação (C.57)e da expressão da temperatura (C.72), temos que

$$\Phi(r,t) = \frac{2\pi}{\lambda_P} L \frac{dn}{dT} Q_0 \beta_0 \left((1-\epsilon) e^{-tk_T} \int_0^t e^{\tau k_T} \frac{e^{-\frac{2\tau^2/\omega_{0e}^2}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)}}}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)} d\tau + \epsilon \int_0^t \frac{e^{-\frac{2\tau^2/\omega_{0e}^2}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)}}}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)} d\tau \right).$$
(C.74)

Sabendo que $Q_0 = \frac{2P_{exc}\phi}{\rho c \pi \omega_{0e}^2}$, $D = \frac{k}{c\rho}$, substituindo-os em (C.74) e fazendo algumas simplificações, temos que a diferença de fase é da forma

$$\Phi(g,t) = P_{exc}\frac{\theta_{th}}{t_c}(1-\epsilon)e^{-tk_T}\int_0^t \left(e^{\tau k_T}\frac{e^{-\frac{2mg}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)}}}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)}d\tau + \epsilon\frac{\theta_{th}}{t_c}\int_0^t \frac{e^{-\frac{2mg}{\left(\frac{2\tau}{t_c}+1\right)}}}{\left(\frac{2\tau}{t_c+1}\right)}\right)d\tau \tag{C.75}$$

⁵onde χ é o tempo em que o *laser* de excitação ficou ligado. Assim, para $t < \chi$, o feixe de excitação esta na amostra e a função de Heaviside é nula. Para $t > \chi$, o feixe de excitação é bloqueado pelo *shutter* e não interage com a amostra, consequentemente, a função de Heaviside é igual a 1 e o termo de fonte é removido da equação.

 com

$$\theta_{th} = -\frac{\beta_0 L\phi}{\lambda_P k} \frac{dn}{dT}.$$
(C.76)

A expressão anterior nos permite ter uma descrição aproximada da evolução do sinal de lente térmica para casos em que temos fotorreação de primeira ordem em amostras de baixa absorção óptica. Note que a equação (C.75) se torna análoga à equação (C.60) quando temos o limite de $k_T \rightarrow 0$. Uma análise mais precisa, resolvendo a equação diferencial que descreve $C_R(r, t)$, por enquanto, somente é possível de ser feita por uma análise numérica.

Referências Bibliográficas

- de Oliveira, K. T.; de Souza, J. M.; Gobo, N. R. S.; de Assis, F. F.; Brocksom, T. J. *Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas.* Revista Virtual de Química, Vol.7, Nº1, 310-335, 2015.
- [2] Price, M. A Role For Reactive Oxygen Species In Photodynamic Therapy. Wayne State University Dissertations. Paper 613, 2012.
- [3] Simplicio, F. I.; Maionchi, F.; Hioka, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. Química Nova, Vol.25, Nº5, 801-807, 2002.
- [4] Perussi, J. R. Inativação fotodinâmica de microorganismos. Química Nova, Vol. 30, Nº 4, 988-994, 2007.
- [5] Buck, S. T. G. Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica. 2009. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- [6] Daniell, M. D.; Hill, J. S. A history of photodynamic therapy, 1991. Australian and New Zealand Journal of Surgery, 61: 340-348.
- [7] Algorri, J.F.; Ochoa, M.; Roldán-Varona, P.; Rodríguez-Cobo, L.; López-Higuera, J.M. Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. Cancers, 13, 4447, 2021.
- [8] Dougherty, T. J., Activated dyes as antitumor agents. Journal of the National Cancer Institute, 52 (4), 1333-1336, 1974.
- [9] Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J., Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. Cancer Research, 36 (7 Part 1), 2326-2329, 1976.
- [10] Correia, J. H.; Rodrigues, J. A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. Pharmaceutics 2021, 13, 1332.
- [11] Auler, H.; Banzer, G., Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 1942, 53 (2), 65-68.
- [12] Gunaydin, G.; Gedik, M. E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. Frontiers in Chemistry, 9:691697, 2021.
- [13] Juzeniene A.; Moan, J. The history of PDT in Norway Part one: Identification of basic mechanisms of general PDT, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 4, 3—11, 2007.

- [14] Hua-yang Fan; Xiang-hua Yu; Ke Wang; Yi-jia Yin; Ya-jie Tang; Ya-ling Tang; Xin-hua Liang; Graphene quantum dots (GQDs)-based nanomaterials for improving photodynamic therapy in cancer treatment. European Journal of Medicinal Chemistry, Vol.182, 111620, 2019.
- [15] Freitas, C. F.; Rocha, N. L.; Pereverzieff, I. S.; Batistela, V. R.; Malacarne, L. C.; Hioka, N.; Caetano, W. Potential of triblock copolymers Pluronic[®] P-84 and F-108 with erythrosine B and its synthetic ester derivatives for photodynamic applications, 2020. Journal of Molecular Liquids, Vol. 322, 114904, 2020.
- [16] Freitas, C. F.; Montanha, M. C.; Pellosi, D. S.; Kimura, E.; Caetano, W.; Hioka, N. Biotin-targeted mixed liposomes: A smart strategy for selective release of a photosensitizer agent in cancer cells. Materials Science & Engineering C, Vol.104, 109923, 2019.
- [17] Freitas, C. F.; Pellosi, D. S.; Estevão, B. M.; Calori, I. R.; Tsubone, T. M.; Politi, M. J.; Caetano, W.; Hioka, N. Nanostructured Polymeric Micelles Carrying Xanthene Dyes for Photodynamic Evaluation. Photochemistry and Photobiology Vol.92, 790–799, 2016.
- [18] Jiayi Chen; Wentian Wu; Fangwei Zhang; Jiali Zhang; Hui Liu; Jing Zheng; Shouwu Guo; Jingyan Zhanga. Graphene quantum dots in photodynamic therapy. Nanoscale Adv., 2, 4961, 2020.
- [19] McDonagh, A. Phototherapy: From Ancient Egypt to the New Millennium. J Perinatol 21, S7 - S12 (2001).
- [20] Pellosi, D. S. Estudos Físico-Químicos do corante Eritrosina B e seus derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas, 2012. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.
- [21] Kessel, D. Photodynamic Therapy: A Brief History, Journal of Clinical Medicine, 8: 1581, 2019.
- [22] Belekov, E; Kholikov, K; Cooper, L; San, O; Er, A. O. Light induced bacterial deactivation using graphene quantum dot. Proc. SPIE 11220, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXIX, 112200E, 2020.
- [23] Souza, L. M. Fotossensibilizadores no controle de larvas do Aedes aegypti (Diptera: Culicidae), 2015. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- [24] Ormond, A.B.; Freeman, H.S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. Materials, Vol.6, N^o3, 817-840, 2013.
- [25] Escudero, A.; Carrillo-Carrión, C.; Castillejos, M. C.; Romero-Ben, E.; Rosales-Barrios, C.; Khiar, N. *Photodynamic therapy: photosensitizers and nanostructures*, Mater. Chem. Front., 2021, 5, 3788–3812.
- [26] Bergmann, E. V.; Capeloto, O. A.; Catanio, A. T. S.; Flizikowski, G. A.; Kimura, N. M.; Freitas, C. F.; Herculano, L. S.; Astrath, N. G. C.; Malacarne, L. C. *Photoactiva-tion of erythrosine in simulated body fluids*, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, vol. 259, p. 119867, 2021.

- [27] Ferreira, D. C. Sistemas híbridos formados por nanobastões de ouro e porfirinas: fotossensibilizadores promissores para terapia fotodinâmica, 2018. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.
- [28] Dias, L. D.; Corrêa, T. Q.; Bagnato, V. S. Cooperative and competitive antimicrobial photodynamic effects induced by a combination of methylene blue and curcumin. Laser Physics Letters, 18 (2021), 075601.
- [29] Algorri, J. F.; Ochoa, M.; Roldán-Varona, P.; Rodríguez-Cobo, L.; López-Higuera, J. M. Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review. Cancers 2021, 13, 3484.
- [30] Toffoli, D. J. Caracterização Espectroscópica de Complexos Hipocrelina B: Lantanídeos para uso em Terapia Fotodinâmica, 2008. Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.
- [31] Halliwell, B; Gutteridge, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical Journal, vol.219, 1-14, 1984.
- [32] Gonçalves, A. S. P. Fotogeração de espécies reativas de oxigênio induzida por fullerenos e derivados: um estudo por ressonância paramagnética eletrônica e captura de spins, 2010. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- [33] Wu, H.; Song, Q.; Ran, G.; Lu, X.; Xu, B. Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. Trends in Analytical Chemistry, Vol.30, N^o1, 2011.
- [34] Krajczewski, J.; Rucińska, K.; Townley, H. E.; Kudelski, A. Role of various nanoparticles in photodynamic therapy and detection methods of singlet oxygen. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 26, 162-178, 2019.
- [35] J. Liang; P. Wu; C. Tan; e Y. Jiang. White light-induced cell apoptosis by a conjugated polyelectrolyte through singlet oxygen generation, RSC Advances, vol.8, n^o.17, 9218–9222, 2018.
- [36] Vankayala, R.; Yu-Kuan Huang; Kalluru, P.; Chi-Shiun Chiang; Hwang, K. C. First Demonstration of Gold Nanorods-Mediated Photodynamic Therapeutic Destruction of Tumors via Near Infra-Red Light Activation, Small, 10, 8, 1612-1622, 2014.
- [37] Mertins, O.; Mathews, P. D.; Angelova, A. Advances in the Design of pH-Sensitive Cubosome Liquid Crystalline Nanocarriers for Drug Delivery Applications, Nanomaterials, 10, 963, 2020.
- [38] Tabish, T. A.; Scotton, C. J.; Ferguson, D. C. J.; Lin, L.; Veen, A. V. D.; Lowry, S.; Ali, M.; Jabeen, F.; Ali, M. Winyard, P. G.; Zhang, S. *Biocompatibility and toxicity of* graphene quantum dots for potential application in photodynamic therapy. Nanomedicine (Lond.), 13(15), 1923-1937, 2018.
- [39] Bak, S.; Kim, D.; Lee, H. Graphene quantum dots and their possible energy applications: A review. Current Applied Physics 16 (2016) 1192–1201.
- [40] Haque, E.; Kim, J.; Malgras, V.; Reddy, K. R.; Ward, A. C.; You, J.; Bando, Y.; Hossain, M. S. A.; Yamauchi, Y. Recent Advances in Graphene Quantum Dots: Synthesis, Properties, and Applications. Small Methods 2018, 2, 1800050.

- [41] https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/900713?context=product
- [42] Jin, S. H.; Kim, D. H.; Jun, G. H.; Hong, S. H.; Jeon, S. Tuning the Photoluminescence of Graphene Quantum Dots through the Charge Transfer Effect of Functional Groups. ACS Nano, Vol.7, N^o2, 1239-1245, 2013.
- [43] Rotomskis, R.; Valanciunaite, J.; Skripka, A.; Steponkiene, S.; Spogis, G.; Bagdonas, S.; and Streckyte, G. Complexes of functionalized quantum dots and chlorin e6 in photodynamic therapy. Lithuanian Journal of Physics, Vol.53, N^o1, 57–68, 2013.
- [44] Nurunnabi, M; Khatun, Z.; Huh, K. M.; Park, S. Y.; Lee, D. Y.; Cho, K. J.; Lee, Y. In Vivo Biodistribution and Toxicology of Carboxylated Graphene Quantum Dots, ACS Nano, 7, 8, 6858-6867, 2013.
- [45] Wang, X.; Sun, X.; Lao, J.; He, H.; Cheng, T.; Wang, M.; Wang, S.; Huang, F. Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 122, 638–644, 2014.
- [46] Hui, L.; Huang, J.; Chen, G.; Zhu, Y.; Yang, L. Antibacterial Property of Graphene Quantum Dots (Both Source Material and Bacterial Shape Matter). ACS Appl. Mater. Interfaces 2016, 8, 20-25.
- [47] Markovic, Z. M; Ristic, B. Z.; Arsikin, K. M.; Klisic, D. G.; Harhaji-Trajkovic, L. M.; Todorovic-Markovic, B. M.; Kepic, D. P.; Kravic-Stevovic, T. K.; Jovanovic, S. P.; Milenkovic, M. M.; Milivojevic, D. D.; Bumbasirevic, V. Z.; Dramicanin, M. D.; Trajkovic, V. S. Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. Biomaterials, Vol.33, Ed.29, 7084-7092, 2012.
- [48] Amat-Guerri, F.; López-González, M. M. C.; Matínez-Utrilla, R.; Sastre, R. Synthesis and Spectroscopic Properties of New Rose Bengal and Eosin Y Derivatives. Dye and Pigments. 1990, 12 (4), 249–272.
- [49] Estevão, B. M.; Pellosi, D. S.; De Freitas, C. F.; Vanzin, D.; Franciscato, D. S.; Caetano, W.; Hioka, N. Interaction of Eosin and Its Ester Derivatives with Aqueous Biomimetic Micelles: Evaluation of Photodynamic Potentialities. J. Photochem. Photobiol. A Chem. 2014, 287, 30–39.
- [50] Huang, Y.; Dai, W. Fundamental Aspects of Solid Dispersion Technology for Poorly Soluble Drugs. Acta Pharm. Sin. B 2013, 2013, 1–8.
- [51] Freitas, C. F. Estudos físico-químicos de derivados ésteres da Eritrosina B incorporados em sistemas lipossomais revestidos com copolímeros do tipo PEO-PPO-PEO almejando aplicações em Terapia Fotodinâmica, 2018. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.
- [52] Russo, A.; Pellosi, D. S.; Pagliara, V.; Milone, M. R.; Pucci, B.; Caetano, W.; Hioka, N.; Budillon, A.; Ungaro, F.; Russo, G.; Quaglia, F. Biotin-Targeted Pluronic[®] P123/F127 Mixed Micelles Delivering Niclosamide: A Repositioning Strategy to Treat Drug-Resistant Lung Cancer Cells. Int. J. Pharm. 2016, 511 (1), 127–139.
- [53] Rabello, B. R.; Gerola, A. P., Pellosi, D. S., Tessaro, A. L., Aparício, L. J., Caetano, W., Hioka, N. Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: systematic evaluation, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 238, 53-62, 2012.

- [54] Shen J.; Lowe, R. D.; Snook, R. D. A model for cw laser induced mode-mismatched dualbeam thermal lens spectrometry. Chemical Physics, Vol.165, 385-396, 1992.
- [55] Arnaut, L. G.; Pereira, M. M.; Dabrowski, J. M.; Silva, E. F. F.; Schaberle, F. A.; Abreu, A. R.; Rocha, L. B.; Barsan, M. M.; Urbanska, K.; Stochel, G.; Brett, C. M. A. Photodynamic therapy efficacy enhanced by dynamics: the role of charge transfer and photostability in the selection of photosensitizers, Chemistry–A European Journal, vol. 20, 5346–5357, 2014.
- [56] Gordon, J. P.; Leite, R. C. C.; Moore, R. S.; Porto, S. P. S.; Whinnery, J. R. Long-Transient Effects in Lasers with Inserted Liquid Samples, Journal of Applied Physics, Vol.36, N^o1, p. 3-8, 1965.
- [57] Sheldon, S. J.; Knight, L. V.; Thorne, J. M. Laser-induced thermal lens effect: a new theoretical model. Applied Optics, Vol.21, N^o9, p. 1663-1669, 1982.
- [58] Pedreira, P. R. B. Desenvolvimento de um protótipo de lente térmica desenvolvida no tempo para estudo de líquidos em condições transitórias em tempo real. 2005. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.
- [59] Sato, F. Desenvolvimento da Técnica de Espelho Térmico. 2009. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.
- [60] Belançon, M. P. Análise das Técnicas de Espelho Térmico e de Lente Térmica Para o Estudo de Materiais Semitransparentes e Opacos. 2009. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.
- [61] Malacarne, L. C., Et al. Time-Resolved Thermal Lens and Thermal Mirror Spectroscopy with Sample-Fluid Heat Coupling: A Complete Model for Material Characterization. Applied Spectroscopy, Vol.65, Nº1, 99-104, 2011.
- [62] Siegman, A. E. Introduction to Lasers and Masers. New York: McGraw-Hill, 1971.
- [63] Butkov, E. Física Matemática, Ed.1, Rio de Janeiro: Guanabara Dois S.A. 1978.
- [64] Colet, J. M. Aplicação da Espectroscopia de Lente Térmica para o Estudo de Fotorredução do Óxido de Grafeno. 2017. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.
- [65] Malacarne, L. C.; Savi, E.L.; Baesso, M. L.; Lenzi, E. K.; Astrath, N. G. C. Role of Photophysics Process in Thermal Lens Spectroscopy of Fluids: A Theoretical Study. The Journal of Physical Chemistry A, Vol.118, N^o31, 5983-5988, 2014.
- [66] Savi, E. L. Aplicação da espectroscopia de lente térmica para a avaliação da fotoestabilidade de óleos vegetais. 2013. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.