

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fv845a Fernando da Silveira e Silva, Vítor
Associação de vermelho neutro a óxido de grafeno / Vítor
Fernando da Silveira e Silva; orientador Cláure Nain
Lunardi Gomes; co-orientador Anderson de Jesus Gomes. --
Brasília, 2019.
60 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. Vermelho Neutro. 2. Óxido de grafeno. 3. Terapia
Fotodinâmica. I. Nain Lunardi Gomes, Cláure, orient. II. de
Jesus Gomes, Anderson, co-orient. III. Título.



Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia - FCE
Curso de Farmácia

VÍTOR FERNANDO DA SILVEIRA E SILVA

**ASSOCIAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO A ÓXIDO DE
GRAFENO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Brasília
2019**

VÍTOR FERNANDO DA SILVEIRA E SILVA

**ASSOCIAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO A ÓXIDO DE
GRAFENO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade de Brasília - UnB - Faculdade de Ceilândia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Claire Nain Lunardi Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes

Brasília
2019



VÍTOR FERNANDO DA SILVEIRA E SILVA

ASSOCIAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO A ÓXIDO DE GRAFENO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Claire N. Lunardi Gomes
Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia
Matrícula: 1026275

Orientadora: Prof.^{fa} Dra. Claire Nain Lunardi Gomes
(Universidade de Brasília/FCE)

Co-Orientador: Prof. Dr. Anderson de Jesus Gomes
(Universidade de Brasília/FCE)

Prof. Dr. Anderson J. Gomes
Matrícula 1027808
Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia

Prof. Elton Clementino da Silva
(Universidade de Brasília/FCE)

Prof. Eduardo Antônio Ferreira
(Universidade de Brasília/FCE)

Esse trabalho é dedicado a Deus, minha família e minha namorada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primordialmente a Deus pelas graças oferecidas e a oportunidade do estudo. Gratifico meus pais pelos princípios e educação transmitidos e meus irmãos pelo apoio e colaboração para crescimento pessoal ao longo dessa jornada.

Dedico minha eterna gratidão à minha orientadora professora doutora Claire Nain Lunardi Gomes por todo o suporte técnico e direcionamento na produção do trabalho em questão, bem como meu coorientador professor doutor Anderson de Jesus Gomes.

Lembro-me de regradar meus amigos e companheiros do grupo de pesquisa em nanotecnologia Felipe Sousa Siqueira e Caio Lino pela disposição e paciência para assistir ao projeto.

Devo remeçar minha namorada Jéssica Marques Benevenuti Bernardi pelo amparo contínuo e por ser meu pilar emocional durante essa monografia e toda a minha formação acadêmica.

RESUMO

A terapia fotodinâmica aparece como possibilidade para o tratamento de neoplasias, diminuindo os efeitos adversos e aumentando a eficácia terapêutica. Para isso, idealiza-se um complexo formado óxido de grafeno e o corante vermelho neutro a fim de ser usado como fotossensibilizador. O vermelho neutro tem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio na incidência de luz, que combatem as células cancerosas, enquanto o óxido de grafeno pode direcionar o composto. O trabalho ramificou-se em um estudo de mineração de dados bibliográficos e um experimental. No estudo de mineração de dados, percebeu-se um aumento abrupto de obras nos últimos anos sobre o corante, principalmente no âmbito da química e bioquímica em análise no sistema. Na parte experimental avaliou-se o comportamento espectrofotométrico do vermelho neutro após ser titulado com o nitrito, com e sem a presença de óxido de grafeno. Dessa forma, escolheu-se o método de Hildebrand como o que mais se ajustou e obteve-se as constantes de associação.

Palavras-chave: Espectrofotometria, Óxido de grafeno, Vermelho Neutro, Terapia fotodinâmica;

ABSTRACT

Photodynamic therapy appears as a possibility for the treatment of neoplasms, reducing adverse effects and increasing therapeutic efficacy. For this, a complex formed of graphene oxide and the neutral red dye is idealized to be used as photosensitizer. Neutral red has the ability to generate light-reactive oxygen species that fight cancer cells, while graphene oxide can direct the compound. The work was branched out into a study of bibliographic data mining and an experimental one. In the study of data mining, there was an abrupt increase of works in recent years on the dye, mainly in the area of chemistry and biochemistry under analysis in the system. In the experimental part, the spectrophotometric behavior of neutral red was evaluated after titration with nitrite, with and without graphene oxide. Thus, Hildebrand's method was chosen as the one that best fit and the association constants were obtained.

Keywords: Spectrophotometry, Graphene Oxide, Neutral Red, Photodynamic Therapy;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema ilustrativo de algumas estruturas de entrega de fármacos baseados em nanotecnologia.....	16
Figura 2 – Primeira parte do experimento de Gein e Novoslov, na qual é feita a extração da camada delgada de grafite	18
Figura 3 – Diversas formas com estrutura de carbono citadas a qual a folha de grafeno pode servir como base.....	20
Figura 4 – Representação espacial da fórmula do óxido de grafeno. Nota-se a funcionalização da estrutura, que lhe confere diferentes propriedades de afinidade e difusão.....	22
Figura 5 – Ilustração do recurso de terapia fotodinâmica.....	25
Figura 6 – Representação espacial da fórmula do corante vermelho neutro. . .	26
Figura 7 – Reação de ligação entre o corante VN e o NO_2^-	28
Figura 8 – Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro de UV-vis de duplo feixe e percurso realizado da luz.	29
Figura 9 – Materiais utilizados para a fração experimental da análise espectrofotométrica do Vermelho Neutro	32
Figura 10 – Solução de Vermelho Neutro com concentração 353 $\mu\text{mol/L}$	33
Figura 11 – Proporção das grandes áreas de pesquisa com presença dos descritores citados. Foram encontrados 204 artigos entre os anos de 2009-2019.	35
Figura 12 – Proporção das grandes áreas de pesquisa com presença dos descritores citados. Foram encontrados 179 artigos entre os anos de 2015-2019.	37
Figura 13 – Mapa visualização de densidade (clusters) criado no VOS Viewer com palavras chaves dos autores da amostra entre os anos de 2009 a 2019.....	38
Figura 14 – Espectros de absorção Uv-vis do vermelho neutro em concentrações crescentes (0,02-25 μM)	39
Figura 15 – Curva padrão linearizada do crescimento da absorbância em relação ao aumento da concentração do corante vermelho neutro.....	40
Figura 16 – Gráfico de sobreposição de absorbâncias após titulação com solução de NaNO_2^- . Ocorre a redução da banda referênte ao vermelho neutro e seu deslocamento para os maiores comprimentos de onda.....	41
Figura 17 – Alteração visual da coloração da solução na cubeta. A) Solução de Vermelho neutro à 120,10 $\mu\text{mol/L}$. B) Coloração rosada após adição de 500 μL de HCl a 1 Mol/L. C) Coloração azulada após fim da titulação com nitrito	42

Figura 18 – Absorbância em 530 nm com a aumento da concentração de Nitrito titulada sobre a solução de vermelho neutro com HCl.....	42
Figura 19 – Comportamento da curva de Vermelho Neutro após a adição do óxido de grafeno	43
Figura 20 – Comportamento da curva da absorbância pós acréscimo de óxido de grafeno	44
Figura 21 – Gráfico de sobreposição de absorbâncias após titulação do VN + OG com solução de NaNO ₂ -	45
Figura 22 – Curva Padrão da concentração de Nitrito titulada sobre a solução de vermelho neutro com HCl e OG em 530 nm.	46
Figura 23 – Gráficos gerados com método de Hildebrand.....	47
Figura 24 – Gráficos gerado com método de Scachard.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pesquisa bibliométrica dos artigos no período de 2009 à 2019.....	36
Tabela 2 – Variação da Absorbância do complexo vermelho Neutro + HCl + óxido de grafeno em relação ao tempo em minutos	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AG	Algoritmo Genético
CVD	Deposição química de vapor catalisada
DE	Diagnóstico de Enfermagem
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GNMs	Nanomateriais de grafeno
HCL	Ácido clorídrico
HOPG	Grafite pirolítica altamente orientada
K	Constante de associação
LAB	Laboratório
LILACS	Literatura Latino Americano em Ciências de Saúde
MEDLINE	Literatura Internacional em Ciências da Saúde
O ₂	Oxigênio
OG	Óxido de Grafeno
PDT	Photodynamic Therapy
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
TFD	terapia fotodinâmica
TPa	Terapascal
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VN	Vermelho Neutro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Justificativa	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral:	15
2.2	Objetivos específicos:	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	Sistema de transporte de fármacos	16
3.1.1	Óxido de Grafeno.....	18
3.2	Tratamento do Câncer	23
3.2.1	Terapia Fotodinâmica.....	23
3.2.1.1	Vermelho Neutro.....	25
3.2.2	Grupamento Nitrito (NO ₂ ⁻).....	28
3.3	Técnicas espectrofotométricas	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Metodologia da revisão da literatura	31
4.2	Ensaio exploratório	32
4.2.1	Equipamentos.....	32
4.2.2	Reagentes.....	33
4.2.3	Análise - Espectroscopia de Absorção Molecular (UV-vis).....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Análise de Revisão de Literatura	35
5.2	Ensaio experimental exploratório	38
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A palavra Nanotecnologia, é originária dos radicais gregos: Nano, tecno e logia, que significam anão, técnica e ciência respectivamente. Esse termo compreende diferentes técnicas adotadas para o uso de partículas e materiais com a escala bilionésima do metro, pertencente a um intervalo de 0,1 a 100 nanômetros. (BATISTA et al., 2010)

Segundo Nolasco e Santos (2018), a nanotecnologia está sendo admitida como uma temática progressista da ciência e tecnologia, que afetará demasiadamente o modo de vida da população, podendo comparar sua chegada com a revolução da eletricidade e da informação digital.

Batista et al. (2010) em seu trabalho expõe as possibilidades do uso da nanobiotecnologia na fabricação de nanobiomateriais, desenvolvimentos de exames diagnósticos em larga escala, implementação de modalidades terapêuticas (como encapsulamento de fármacos) como estudado por (DIAS et al., 2015; GOMES et al., 2011; GOMES; LUNARDI; TEDESCO, 2007), produção de métodos de prevenção e inclusive na área da nutrição humana, com uso de nanopartículas como antioxidante.

O vermelho neutro (VN) é um corante vital, capaz de proporcionar facilidade na visualização de tecidos em microscopia óptica. O corante possui como função principal o tingimento histológico de células em cultura e em organismos vivos (MAKINO; NAKAGHI, 2010). Simultaneamente, possui função de indicador de pH, como foi utilizado por Tanner, Zhang e Jr (2015) para a detecção visual de amplificação de ácidos nucleicos.

O composto também tem sido aplicado comumente em estudos de viabilidade celular e citotoxicidade, como proposto por Garcia e Menezes (2015) para avaliação de efeitos genotóxicos e citotóxicos de ligas de solda de prata em ortodontia e por Paum-Garten, Gomes-Carneiro e Oliveira (2017) para a avaliação da toxicidade acarretada pelos aditivos do tabaco na toxicidade da fumaça. Além disso, é capaz de mediar a eletrossíntese microbiana em diferentes espécies de microrganismos, como relatado por Harrington et al. (2015).

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento de neoplasias malignas na qual se associa um composto fotossensível com luz em determinado comprimento de onda e oxigênio molecular. A reação resultante deve motivar produção de espécies reativas de oxigênio que destroem as células neoplásicas por necrose ou apoptose (ALMEIDA, 2017; LUNARDI; TEDESCO, 2005; TEDESCO; ROTTA; LUNARDI, 2003). Diversas pesquisas têm sido realizadas para desenvolver fotossensibilizadores e complexos com controle de liberação que melhor se adequem às condições *in vivo*, como por exemplo às realizadas por Gomes, Lunardi e Tadesco (2007) e Gomes (2005).

Com o propósito de otimizar a terapia de atenuação dos tumores, pode-se associar o corante da classe eurodina VN a uma nanopartícula, facilitando a administração

de fármacos, proporcionando maior eficácia e permitindo uma menor quantidade de efeitos colaterais (VERISSIMO, 2016) a partir do direcionamento preciso para a região do carcinoma, gerando o aumento da disponibilidade do fármaco e a promoção da anfifilicidade do mesmo, facilitando o transporte tanto nos tecidos, quanto no sangue. Como resultado da associação de nanopartículas e a característica do tumor, tem-se o efeito de permeabilidade e retenção, que segundo Wang (2017) gera aumento do seu depósito nesse tecido desejado (LUCKY; SOO; ZHANG, 2015).

Em meio às possibilidades de molécula carreadora para a conjugação com o agente fotossensibilizador, pode-se apontar o óxido de grafeno (OG) derivado do grafeno (NOVOSELOV e colaboradores, 2004 apud SEGUNDO; VILAR, 2016).

Devido às características diferenciáveis de dureza, morfologia, condutividade térmica e elétrica, resistência mecânica, leveza, mobilidade elevada de elétrons (JOHNSON; DOBSON; COLEMAN, 2015), o grafeno possui diversas aplicações, além de ser utilizado como suporte nanotecnológico de fármacos, tendo potencial para produção de baterias (LIU et al., 2011), supercapacitores (RANDVIIR; BROWNSON; BANKS, 2014), pás de turbinas eólicas, células solares (KUILLA et al., 2010) e materiais de dissipação de calor para gerenciamento de energia super eficiente (SEGUNDO; VILAR, 2016).

Em contrapartida, para muitas dessas aplicações, inclusive na biotecnologia, é necessário que o nanoestruturado possua características de boa solubilidade e dispersividade. O grafeno *in natura* não é bem disperso em água, entretanto, segundo Shah (2015), sua transformação para óxido de grafeno proporciona tais atributos por efeito do caráter anfifílico oriundo dos grupos hidroxila e épxi ligados às bordas e no plano basal da lâmina do grafeno, sucessivamente.

Desde a descoberta, no ano de 2004 em Manchester, o grafeno, bem como o óxido de grafeno, tem sido investigado para carregar variados tipos de fármacos, tanto os de baixa solubilidade em água, quanto diferentes antibióticos, anticancerígenos, peptídeos, DNA e RNA. (LIU; CUI; LOSIC, 2013). Além disso, podem ser associados à estruturas como ftalocianinas para a o uso como fotossensibilizadores como descrito por Rocha, Gomes e Lunardi (2019).

1.1 Justificativa

Conforme discorreu Lima (2018), o tratamento do câncer ainda sofre com empecilhos causados pelas alterações genéticas, como mutações e polimorfismos gênicos desta doença. Tais modificações em determinados tecidos neoplásicos provocam a incapacidade de intervenção pelos métodos convencionais de quimioterapia e radioterapia.

Sabe-se também que além dos inconvenientes gerados pela alternativa cirúrgica, aqueles métodos apresentam consequências desconvinháveis como distribuição não

específica dos fármacos antitumorais, problemas de citotoxicidade para células saudáveis e desenvolvimento de resistência múltipla aos medicamentos (LIMA, 2018).

Tal como dissertou Moreira (2014), os fármacos padrões antitumorais têm características imunossupressoras e citotóxicas, que podem danificar também células normais e saudáveis. Contudo, os efeitos adversos podem ser minimizados se os agentes terapêuticos forem direcionados para o sítio enfermo.

Assim sendo, considera-se a alternativa de explorar o óxido de grafeno como carreador e analisar suas propriedades, por ser um material de grande potencial físico-químico, com características inovadoras, bem como do foto sensibilizador vermelho neutro e possíveis aditivos.

Logo, o estudo em questão, busca reunir informações sobre os materiais, a fim de contribuir no desenvolvimento futuro de fármacos oriundos dos mesmos e favorecer a evolução de recursos terapêuticos das neoplasias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Esse trabalho tem como objetivo principal desenvolver um suporte a base de óxido de grafeno e avaliar aspectos de associação do corante vermelho neutro (VN). A associação do corante ao suporte pode elucidar mecanismos fotofísicos e fotoquímicos ainda não avaliados.

2.2 Objetivos específicos:

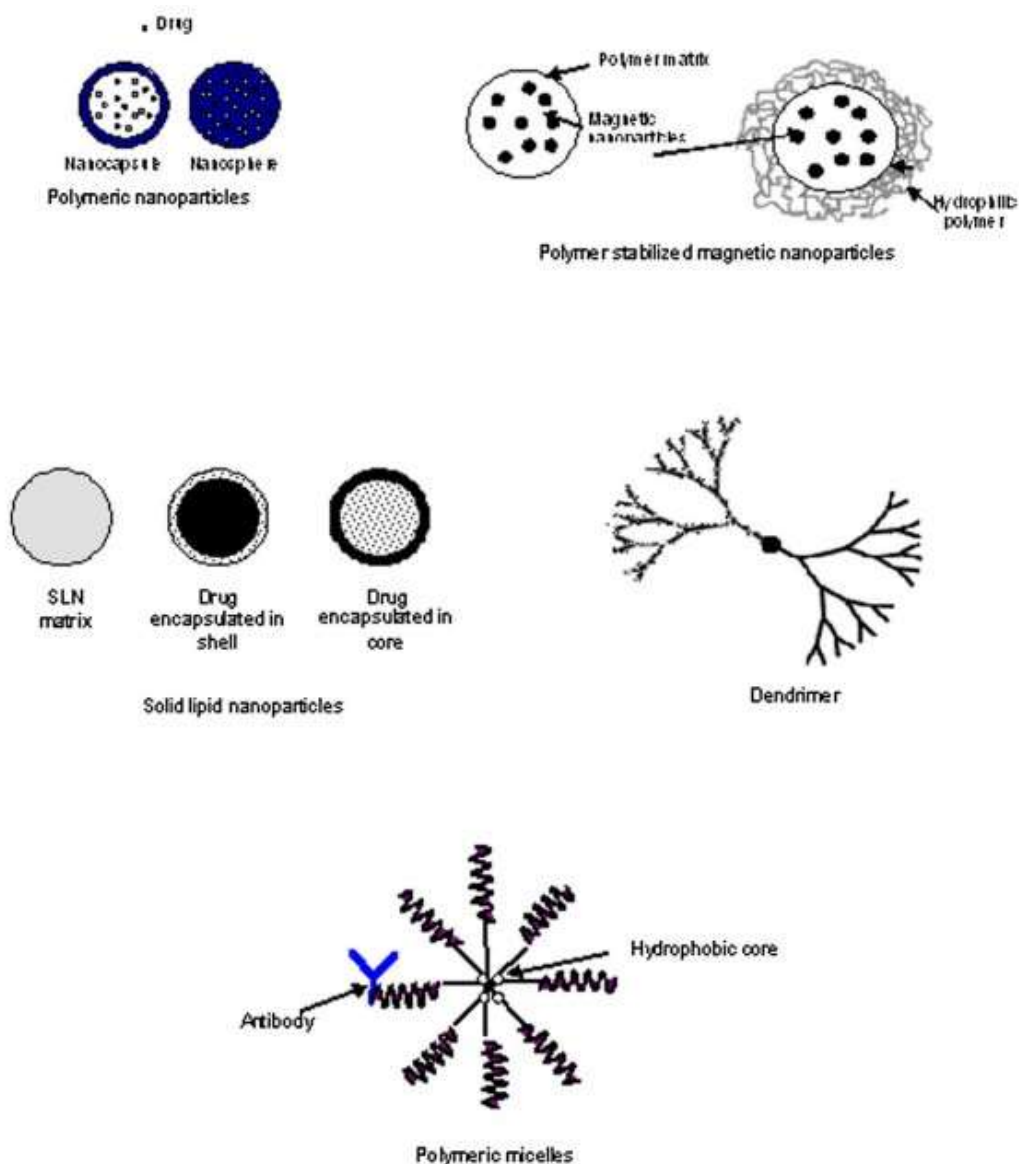
- Elaborar uma revisão da literatura a respeito do corante vermelho neutro (histórico, síntese química, usos biológicos, entre outros).
- Expor uma revisão da literatura a respeito do óxido de grafeno (histórico, síntese química, usos biológicos, entre outros).
- Fornecer uma revisão da literatura a respeito de terapia fotodinâmica (breve histórico, aspectos).
- Definir em gráfico a resposta espectrofotométrica do corante vermelho neutro consequente do aumento de sua concentração.
- Investigar o comportamento espectrofotométrico do corante vermelho neutro em associação com o nitrito e o óxido de grafeno.
- Determinar um coeficiente de associação entre o complexo vermelho neutro + óxido de grafeno e o aditivo nitrito.
- Fundamentar teoricamente e dar início à caracterização espectrofotométrica do complexo para desencadear futuros estudos sobre o composto

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Sistema de transporte de fármacos

Entende-se que ocorre uma dificuldade encontrada para que um fármaco, em sua forma padrão ou em solução aquosa alcance o alvo terapêutico em concentrações satisfatórias, atingindo com totalidade a eficácia desejada. Tal dificuldade pode ser justificada pois durante a distribuição, desde administrado até o seu objetivo, ocorre a diminuição da concentração plasmática e o fármaco atinge outros tecidos, causando ainda toxicidade (SAHOO; MISRA; PARVEEN, 2017).

Figura 1 - Algumas estruturas de entrega de fármacos baseados em nanotecnologia, sendo em sequência: 1) Nanopartículas poliméricas; 2) Nanopartículas magnéticas estabilizadas na matriz polimérica; 3) Nanopartícula em lipídios sólidos estabilizados na matriz por surfactante; 4) Dentrímeros; 5) Micelas.



Fonte: SAHOO e colaboradores (2017).

Para isso, tem sido desenvolvidos sistemas biologicamente ativos com agregados moleculares, denominados sistemas de liberação modificada de fármacos (*drug delivery*). Nesse contexto, destacam-se os compostos mais estudados: lipossomos, micelas, nanopartículas poliméricas, peptídeos, dendrímeros e os nanotubos de carbono (XAVIER, 2011). Algumas estruturas podem ser observadas na figura 1.

Nesse cenário, tem-se estudado dentro da nanotecnologia alguns nanossistemas e nanomateriais que concedem terapêuticas direcionadas com diminuição dos efeitos adversos, da concentração administrada, favorecendo assim melhora na qualidade de vida do enfermo. Além disso, os nanossistemas e os nanomateriais podem sofrer remodelamento e oferecerem uma plataforma multimodal, gerando, dessa forma, mais de uma finalidade (SANTOS, 2017).

Dentre os materiais acessíveis, devem ser destacados as nanopartículas de ouro (VERISSIMO, 2016), nanopartículas magnéticas (PAIVA, 2017), nanopartículas poliméricas (GOMES e colaboradores, 2005), nanoemulsões (BERNARDI et al., 2011), lipossomas e micelas (SANTOS, 2017).

Duarte (2018) em sua revisão sistemática abrangendo compostos nano, destacou as formulações lipossomais de doxorubicina (Doxil®) e o Abraxane®, sendo a aprovação do primeiro, um marco histórico por ser pioneiro no carreamento de diversos quimioterápicos para o tratamento de câncer de ovário. Já o Abraxane® trata-se da associação de um quimioterápico a uma macromolécula (albumina). O autor ainda destaca que alguns nanocarreadores estão em fase experimental e a criação de novos arranjos acarretarão em progresso terapêutico.

Para que o complexo nano de entrega de fármaco tenha êxito, desenvolve-se habitualmente a ligação entre carregador com ligantes de reconhecimento singular, do mesmo modo que ocorre com a transferrina, sendo imprescindível a composição de uma estrutura com grande eficácia no carregamento e de um sistema que libere a substância de forma controlada num sítio particular (WU; AN; HULME, 2015).

As nanopartículas oferecem a possibilidade de progresso na eficácia terapêutica, pois pode modular a estabilidade e liberação da droga, ampliando a duração da circulação na corrente sanguínea e resguardando-as contra degradação precoce e ataque de fagócitos (VERISSIMO, 2016b).

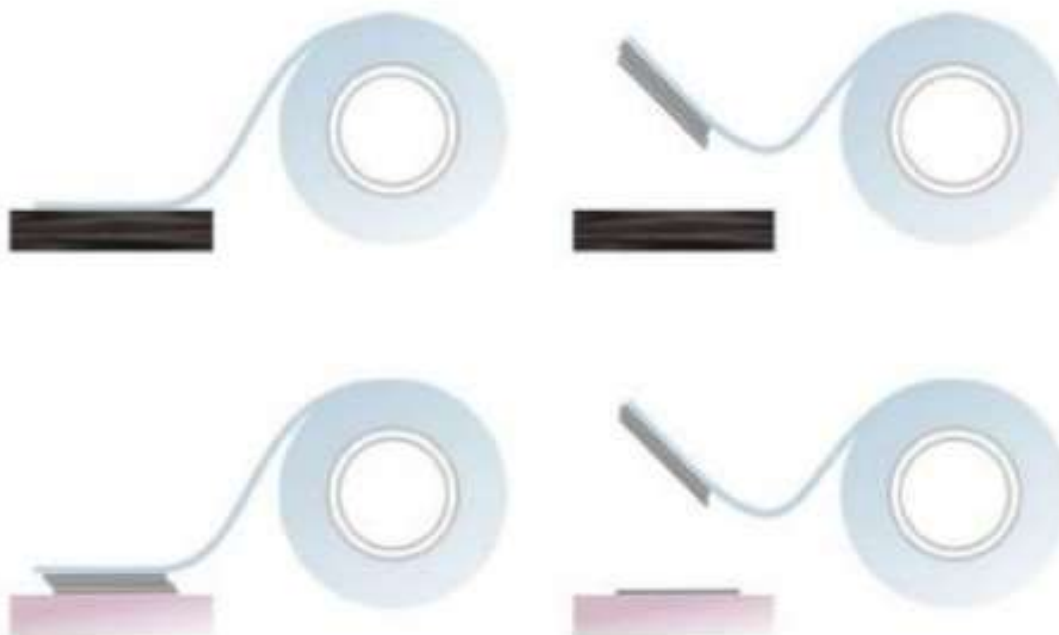
Em concordância com Vieira e Gamarra (2016), ao utilizar nanopartículas no combate ao câncer, obtêm-se diversas vantagens quando comparados aos medicamentos tradicionais, tais como a proteção do ativo contra a deterioração, a melhora da farmacocinética ou mesmo a otimização da absorção da droga no tumor. Além disso, a área externa das nanopartículas pode ser manipulada (com anticorpos, peptídeos, RNA) a fim de conduzir o carreador exclusivamente para a região atingida pelo câncer (VERISSIMO, 2016).

Outro fator significativo é a característica passiva dos tumores sólidos denominada efeito de aumento da retenção e permeabilidade, que permite que a maior permeabilidade de vasos nutra o carcinoma e promova sua expansão. Todavia, esse evento promove o depósito de macromoléculas como materiais nanoestruturados conjugados a aditivos com tamanho acima de 45 kDa, facilitando a ação do fármaco com maior especificidade (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTO, 2014; GOMES e colaboradores, 2005; LUNARDI; TEDESCO, 2005).

3.1.1 Óxido de Grafeno

Em 2010, Geim e Novoslov conquistaram o prêmio Nobel da física após aplicar uma ferramenta denominada “*scotch-tape*” para extrair folhas individuais de grafeno. Os estudiosos extraíram determinadas camadas de grafite através de fitas adesivas e imediatamente empregaram um substrato para auxiliar na desagregação do grafite, obtendo assim o grafeno, designado como uma camada só, em cristais perceptíveis a olho nu. (HU e colaboradores, 2013; YANG e colaboradores, 2013; JAWORSKI e colaboradores, 2015; FONSECA, 2011).

Figura 2 - Primeira parte do experimento de Geim e Novoslov, na qual é feita a extração da camada de grafite.



Fonte: Caetano, R. C. (2017)

Segundo Johnson, Dobson e Coleman (2015), o Grafeno, desde sua criação, teve propriedades marcantes relatadas em diversos estudos com relevância, capazes

de superar outros materiais reunidos num só composto, além de dispor de demasiado potencial para projetos de futura aplicação comercial.

Dentre as qualidades da matéria, pode-se citar sua elevada condutividade térmica de aproximadamente $5 \times 10^3 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$, que foi apontado por Yan, Nika e Balandin (2015). O poder de impermeabilidade aos gases, característico do material, que contradiz com a espessura de apenas um átomo por camada (BUNCH, 2008), altíssima mobilidade de elétrons, que corresponde a mais de $200.000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1}\text{S}^{-1}$ em densidade eletrônica de aproximadamente $2 \times 10^{11} \text{ cm}^{-2}$, como cita Bolotin (2008).

Além de ser, pelo módulo de Young, medido em TPa, considerado o material mais forte mensurado (LEE, 2008), Vieira e Gamarra (2016) constataram ainda que a área superficial do grafeno é maior do que a do grafite, tendo um peso menor que muitos outros elementos (KRÓL et al., 2015).

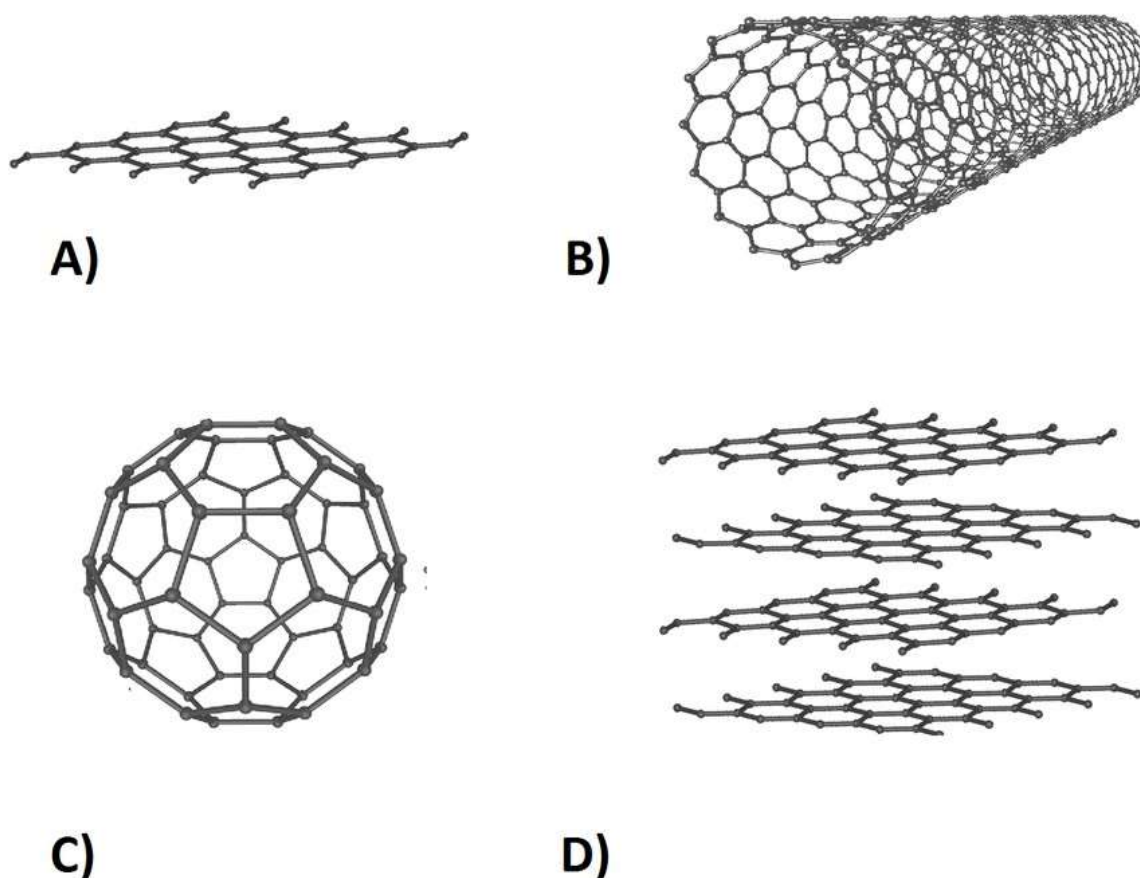
Liu, Cui e Losic (2013) afirmam ainda que os nanomateriais de grafeno (GNMs) possuem a vantagem de ter uma proporção entre peso do fármaco a ser carregado e transportador superior a de outros sistemas de distribuição de drogas, alcançando até 200%.

Entende-se que o óxido de grafeno (OG) pode ser descrito como monocamada grafítica com sítios aromáticos e alifáticos (átomos de carbono sp^2 e sp^3) incluindo grupamentos carbonila nas extremidades, além de epóxi e hidroxila no plano basal (GIORGAKILAS e colaboradores, 2016).

Segundo Smaniotto (2015), o OG diferencia-se em sua estrutura por formar uma lamela mais espessa do que a monocamada de grafeno. Enquanto a primeira possui em torno de 1 a 1,4 nm, a última cerca de 0,34 nm. Essa circunstância é explicada pela disposição dos átomos de carbono hibridizados em sp^3 na parte superior e inferior da lamela, emparelhados covalentemente aos grupos funcionais. Já o espaço entre as lamelas é consequência da umidade relativa, e diverge entre 0,6 e 1,2 nm, mantendo a característica de empilhamento entre as lamelas e a organização de colmeia mesmo como óxido de grafeno.

Caetano (2017) descreve o grafeno como uma estrutura base para a constituição de diferentes estruturas de carbono, com exceção do diamante. Os nanotubos por exemplos, podem ser retratados como uma folha de grafeno enrolada, enquanto os fulerenos são a mesma camada organizada em forma de esfera. Já o grafite, como já citado, compõe-se de várias camadas de grafeno sobrepostas, como exemplificado na figura abaixo.

Figura 3 – Diversas formas com estrutura de carbono A) Grafeno; B) Nanotubos de carbono (folha de grafeno enrolada), C) Fuleranos (esfera de carbono ao grafeno) , D) Grafite (sobreposição de diversas folhas de grafeno).



Fonte: Autor

Em comparação com as demais estruturas citadas, o grafeno possui duas superfícies laterais expostas, melhorando a capacidade de conjugação não covalente e favorecendo a combinação com fármacos em toda a dimensão, inclusive de duas ou mais drogas concomitantemente (ORECCHIONI, 2015).

O grafeno tem ainda a possibilidade de ser funcionalizado com estabilizadores a fim de beneficiar a sua biocompatibilidade. Com a adição de polímeros sintéticos, proteínas e polissacarídeos naturais, impede-se que haja a agregação do composto em ambiente fisiológico, tendo assim capacidade de agir como nanocarregador em sistemas de entrega de fármacos, com estabilidade corrigida e toxicidade reduzida (ROCHA, 2018).

Além disso, com essa estrutura é possível fazer combinações com drogas e aditivos a fim de buscar uma melhor terapêutica para determinadas doenças, como a combinação entre óxido de grafeno, polietilenoglicol e doxirrubicina, referido por ZHANG (2011).

Como descrito por Moreira (2018), tanto o grafeno, quanto o óxido de grafeno possuem atributos que lhes caracterizam como ótimos adsorventes devido às suas

ligações deslocalizadas π -elétrons que formam fortes ligações. Contudo, o segundo possui grupos hidroxila e carbonila que facilitam a interação com determinados fármacos por meio de ligações de hidrogênio, interações π - π e as interações eletrostáticas seguindo as condições do pH do meio.

O óxido de grafeno, permite uma maior flexibilidade de alteração das particularidades ópticas, elétricas e químicas a partir da manipulação do seu grau de oxidação. Essa oxidação proporciona a formação de nanoilhas de grafeno puro separadas por carbonos em hibridização do tipo sp^3 , concebendo uma estrutura congruente para interações com moléculas orgânicas, inorgânicas e biomoléculas (ROCHA, 2018).

Rocha (2018) expõe que compósitos formados entre corantes e óxido de grafeno são elaborados de forma acessível e assim usados para diversas aplicações pela facilidade que o campo atrativo que o material proporciona, devido as folhas de óxido de grafeno são capazes de adsorver fisicamente corantes cationicamente carregados.

Em contrapartida, o grafeno puro não se aplica comumente em meios biológicos, visto que as interações desse tendem a formar aglomeração que prejudicam as qualidades da matéria (KUILLA et al., 2010).

Jesus, Freire e Guimarães (2012) mencionaram três formas de se obter o grafeno que possuíam particularidades quanto à sua facilidade na utilização, qualidade e produção: microesfoliação mecânica, microesfoliação química, e o método de deposição química a vapor.

Maraschin (2016) qualifica os métodos de obtenção do grafeno em dois grupos: *top-down* e *bottom-up*. Os primeiros consistem no fracionamento do grafite em folhas individuais ou menores empilhamentos, podendo citar entre eles, a esfoliação mecânica e a esfoliação química com a redução por derivados de grafeno imediatamente.

Os métodos de *bottom-up*, relacionam-se com gênese do grafeno oriundo de moléculas orgânicas pequenas como metano e etanol. Dentre eles, temos a deposição de vapor químico (CVD) e a expansão epitaxial sobre substratos de SiC (MARASCHIN, 2016).

Segundo e Vilar (2016) dispôs e elucidou os principais métodos de síntese de grafeno em tópicos. O método de esfoliação mecânica deve-se inicialmente aprontar plataformas de 5 μm de profundidade no pico das plaquetas de HOPG (grafite pirolítica altamente orientada) utilizando ataque químico seco em plasma de oxigênio.

Em seguida, cola-se as plataformas à uma camada fotorresistiva de 1 μm por meio de uma pressão superficial, e logo se faz descamação dos flocos de grafite da plataforma com fita adesiva repetidamente, capturando-os na superfície de um disco de óxido de silício e originando filmes com várias camadas do material de até 10 μm (SEGUNDO; VILAR, 2016).

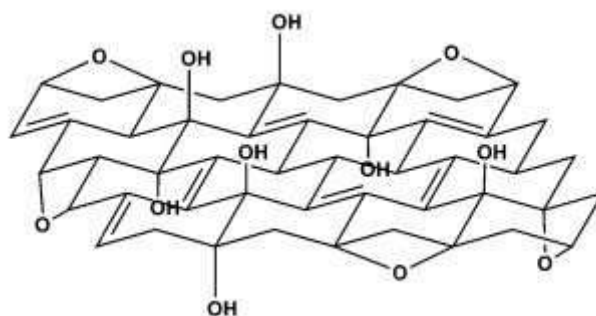
Na microesfoliação química, ocorre a atenuação das ligações de Van der Waals devido a incorporação de reagentes que, quando consumidos promovem liberação de gases entre as lamelas. Isso provoca uma sobrepressão que fraciona levemente a rede de ligações sp^2 - sp^2 gerando uma folha sp^2 - sp^3 menos estável (JESUS; FREIRE; GUIMARÃES, 2012).

Camargos, Semmer e Silva (2017), revela que a deposição química de vapor tem como essência a deterioração de percussores de carbono em fornos com atmosfera e temperatura monitorados sobre catalizadores metálicos. A deposição química é consequência do uso do substrato metálico catalizador (níquel, cobre, cobalto, rubídio) como base para composição de um filme isolado de grafeno, onde cada metal acarreta na formação de grafeno com propriedades diferentes.

A clivagem ultrassônica pode ser empregada para espargir grafite em soluções mediante ultrassom, resultando em esfoliação para produção de grafeno em grandes proporções. Já o crescimento epitaxial sobre SiC, é gerado a partir da construção do material em terminações de um mono-cristal de H-SiC por dessorção térmica de Silício (SEGUNDO; VILAR, 2016).

O óxido de grafeno em si, correspondente ao grafeno funcionalizado (figura 4), que normalmente possui melhores propriedades de compatibilidade, hidrofiliabilidade e dispersão, é habitualmente arranjado por oxidação de flocos de grafite. A inserção dos grupamentos funcionais expande os espaços interlamelares e causa mudanças na hibridação dos carbonos oxidados, de sp^2 para sp^3 (MARASCHIN, 2016).

Figura 4- Representação espacial da fórmula do óxido de grafeno. Nota-se a funcionalização da estrutura, que lhe confere diferentes propriedades de afinidade e difusão.



Fonte: Autor

Zhang (2011) em seu estudo, observou que o óxido de grafeno funcionalizado com polietilenoimina, associado à droga antineoplásica doxorrubicina e RNA de interferência resulta em uma melhora do potencial no tratamento por quimioterapia.

Todavia os níveis de oxidação diferem de acordo com o método e tipo de grafite utilizado, assim como o posicionamento e natureza dos grupamentos funcionais dependem deste grafite inicial, do intervalo de oxidação, agentes oxidantes e a temperatura empregada (MARASCHIN, 2016).

As folhas de grafeno podem também provocar efeito de fotohipertermia nas células de interesse, pois além de terem baixa toxicidade e serem um relevante transportador de fármacos, podem transformar luz visível de infravermelho em calor suficiente para tal feito (SANTOS, 2017).

Yang (2012), afirma que em ensaios *in vivo*, o óxido de grafeno reduzido tem ainda manifestado relevante potencial fototérmico relacionado à supressão de tumores.

3.2 Tratamento do Câncer

Segundo Jemal (2016) em sua obra “O Atlas do Câncer”, a doença teve seu primeiro indício entre setenta e oitenta milhões de anos atrás, pois em 2003 encontraram-se fósseis de dinossauros com células características de neoplasias. Já em hominídeos, o mais senil câncer foi encontrado por Louis Leakey no ano de 1932 e data de aproximadamente 4,2 e 3,9 milhões de anos.

No Egito antigo, em 1600 a.C. (antes de cristo), documentos relatavam o tratamento do câncer por cauterização, cevada e tâmaras, quando as pessoas justificavam a doença pelas divindades. Já na Grécia em 400 a.C, Hipócrates conseguiu diferenciar tumores malignos e benignos pela primeira vez. Milênios depois, em 1913, o físico Wilhelm Konrad Roentgen descobriu o Raio X. Tecnologia que seria utilizada anos depois para o tratamento do câncer (JEMAL, 2016).

A expressão câncer é empregada para designar uma categoria de enfermidades que atinge a população de qualquer faixa etária (entretanto tendo relação direta com o processo de envelhecimento), sendo representada pela reprodução celular desenfreada e propensão para a invasão de demais estruturas orgânicas, tendo como principais formas de tratamento, a quimioterapia e radioterapia. (SILVA, 2010).

Radioterapia é um tipo de tratamento no qual se aplica radiação ionizante que pode ser do tipo eletromagnética ou corpuscular através de um feixe que pode ionizar os átomos dos tecidos por arrancar elétrons. A ionização favorece apoptose celular por transformar as disposições moleculares mediante rupturas químicas, podendo causar alterações no material genético (cadeias de DNA ou a hidrólise da água).

Em contrapartida, segundo Paiva (2017) a quimioterapia é um tratamento do câncer promovido de forma sistêmica no organismo, empregando-se medicamentos administrados de forma continuada ou em períodos padronizados. Entre esses medicamentos, podem ser citados os quimioterápicos, bioterápicos, imunoterápicos, alvoterápicos e hormonioterápicos.

3.2.1 Terapia Fotodinâmica

As terapias que utilizam a luz (fotodinâmica e fototérmica), têm se destacado frente àquelas já citadas anteriormente para o tratamento do câncer (SANTOS, 2017).

Dutra (2013) afirma que o fotossensibilizador utilizado na terapia com luz é ativado na presença de oxigênio molecular, criando derivados citotóxicos do oxigênio que proporcionam danos à membranas e material genético.

A Terapia fotodinâmica surge como opção para o combate da moléstia com o benefício de proporcionar a diminuição dos efeitos colaterais, podendo ser utilizada para tratar também a degeneração macular da retina, psoríase, arterioclerose, acne, infestações bacterianas, fúngicas e herpes. (OLIVEIRA, 2014)

Selerra e Pogliani (2014) relatou que os achados científicos pioneiros sobre terapêutica fotodinâmica datam de 1900, na qual Oscar Raab, estudante de medicina e seu mestre Herman Von Tappeiner, constataram a letalidade do corante acridina para culturas de protozoários paramécios em Munique. Isso ocorreu devido a interação do corante com a luminosidade (SEVGI et al., 2013).

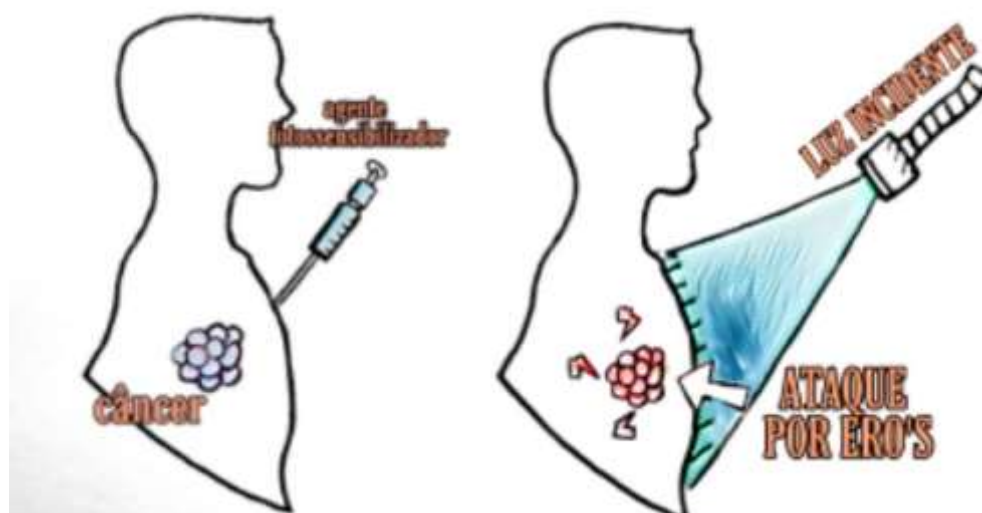
A expressão “terapia fotodinâmica” foi originado apenas em 1901, quando He-reon Henrian Von Tappeiner concluiu que para que ocorresse tais efeitos de reações acarretadas pela luz, necessitava-se de oxigênio. Sendo caracterizada então como terapia oxigênio-dependente (SELLERA; POGLIANI, 2014 apud ACKROYD et al., 2001).

O objetivo do método fotodinâmico é atingido por meio do mecanismo descrito por Selerra:

O efeito fotodinâmico da PDT ocorre quando a molécula do fotossensibilizador absorve fótons, emitidos pela fonte de luz de comprimento de onda específico e ressonante ao fotossensibilizador, passando de seu estado fundamental para um estado excitado. Nesse momento pode ocorrer a transformação de energia por processos de fluorescência ou conversão interna do estado excitado para o estado fundamental e/ou ocorrer o processo de cruzamento entre sistemas, levando a molécula para o estado excitado tripleto (LUNARDI; TEDESCO, 2005, SELLERA; POGLIANI, 2014).

Em tal condição, as moléculas do agente sensibilizador devem reagir com o meio de dois modos: os mecanismos I e II. No primeiro caso, esse mecanismo ocorre entre o fotossensibilizador e o substrato, na qual sucede transferência de elétrons, originando radicais livres, como ilustrado na figura 5. Já o outro evento tem como consequência a produção de oxigênio singlete devido o transporte energético oriundo do fotossensibilizador para o oxigênio em estado fundamental (OBAID e colaboradores, 2016; LAUBACH e colaboradores, 2008, SELLERA; POGLIANI, 2014).

Figura 5 – Ilustração do recurso de terapia fotodinâmica, na qual demonstra-se na primeira figura a administração de um agente fotossensibilizador e na seguinte a reação decorrente da radiação em determinado comprimento de onda que produz espécies reativas de oxigênio para o combate à moléstia.



Fonte: Autor

Portanto, a capacidade de obter resultados na terapia depende diretamente da eficiência da formação do oxigênio singlete/triplete, do potencial do fotossensibilizador, da quantidade de oxigênio no local de ação e da intensidade e comprimento de onda da luz empregada no processo (SANTOS, 2017).

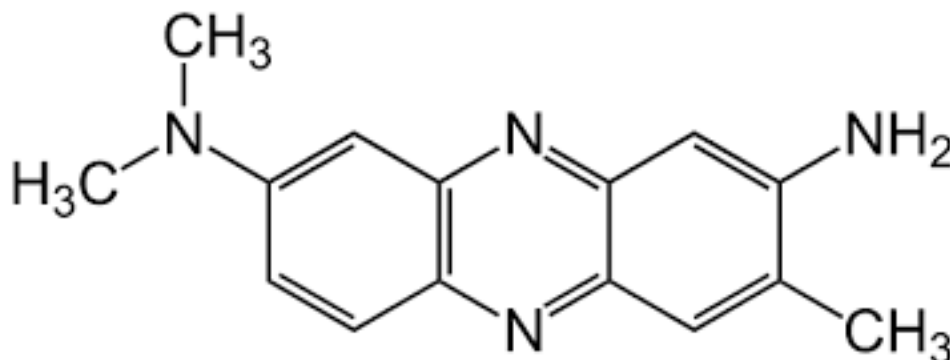
Dessa forma, faz-se necessário a escolha correta do agente fotossensibilizador, para que tenha absorção do comprimento de onda de maior potencial de produção de O_2 e penetração no tecido alvo (SANTOS, 2017).

Ressalta-se que o fármaco deve apresentar qualidades como baixa toxicidade ao organismo e seletividade pelo tecido alvo, pois são absorvidos também pelas células saudáveis (SETLIK; SILVA, 2016).

Contudo, as células tumorais, normalmente já possuem maior biodistribuição e menor taxa de remoção de fotossensibilizadores graças ao pH menor no fluido intersticial, duradoura drenagem linfática e maior permeabilidade dos vasos sanguíneos no local atingido (SETLIK; SILVA, 2016).

3.2.1.1 Vermelho Neutro

Expõe-se no relatório de segurança de produtos químicos da SIGMA-ALDRICH (2011) (GREEN, 1990), que Vermelho neutro (VN), vermelho tolueno, vermelho básico 5 ou 3-Amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina possui fórmula $C_{15}H_{17}N_4$ $C_{15}H_{17}N_4$ (como pode ser visualizado na figura 6) e peso molecular de 288,78 g/mol.

Figura 6 – Representação espacial da fórmula do corante vermelho neutro.

Fonte: Autor

Nas descrições fornecidas por Carl Roch (2018), caracteriza-se as propriedades físico-químicas do material como um pó cristalino (sólido), de coloração verde escura e inodoro. Possui pH -3 (água 10 g/l, 20°C), ponto de congelamento de 290°C, densidade aparente de 350 – 500 kg/m³ e solubilidade em água de aproximadamente 50 g/l a 25°C. Seu coeficiente de partição n-octanol/água (log K_{OW}) é de -0,33 e a temperatura de decomposição acima de 290°C.

Ainda segundo Carl Roch (2018), o corante VN permanece estável em condições ambientais normais, mas deve-se manter afastado do calor e de substâncias muito comburentes. O material não é classificado como gravemente tóxico, bem como corrosivo, susceptível à lesões oculares ou mutagênico. Todavia, em contato com a pele, olhos e vias respiratórias, pode causar ligeira irritação.

Para o manuseio seguro, deve-se evitar a formação de pó, armazenar em recipientes bem fechados e em locais secos com temperatura entre 15 e 25°C (CARL ROCH, 2018). Do ponto de vista ecológico, segundo o relatório, o vermelho básico 5 não deve ser classificado como perigoso para o ambiente aquático, contudo não deve ser eliminado despejando-se os resíduos no esgoto. O corante não tem potencial relevante de bioacumulação.

O corante VN, é um corante fenazina de característica catiônica, utilizado para coloração histológica e tem potencial como fotossensibilizador. Além disso, é usado como indicador de pH intracelular e empregado para ensaios de viabilidade celular. O corante tem a particularidade de ser solúvel em água, isso o difere da maior parte dos fármacos fotossensíveis, dando a ele, uma maior seletividade ao câncer (VERISSIMO, 2016).

Historicamente, o efeito fotodinâmico do corante vermelho básico 5 foi descrito em pesquisas por Goldhaber (1960) com a finalidade de detectar osteoclastos, para tal, foi inserido no ambiente de reabsorção óssea, demonstrando eficaz poder de contraste. Todavia, em consequência da exposição consecutiva das culturas à luz

e oxigênio, seu estudo foi interrompido pela morte das células devido ao efeito dos radicais livres descrito posteriormente por J.S. (1999)(CONN, 1977; GREEN, 1990)

Em 2007, Andrade abordou que o teste do vermelho neutro, utilizado para a viabilidade, fundamenta-se na internalização do corante pelos lisossomas das células vivas. Corante esse, que atravessa as membranas celulares por meio de difusão simples e torna-se retida devido à sua ionização pelo interação com as matrizes ácidas dos endossomos e lisossomos. Em contrapartida, as células que sofrem danos às membranas ou superfícies, perdem a capacidade de aprisionamento do corante. (ANDRADE, 2017)

Constatou-se então, uma grande gama de estudos de viabilidade e toxicidade celular, como por exemplo o estudo de Paumgarten, Gomes-Carneiro e Oliveira (2017), sobre o impacto do tabaco na toxicidade da fumaça, a pesquisa sobre a citotoxicidade de diferentes soldas elétricas utilizadas em ortodontia por Santos (2011) e o trabalho de Rogero (2015), que buscou compreender a toxicidade de nanopartículas de prata utilizando como método a incorporação de vermelho neutro.

Castro e Rodrigues (2011), relataram que o VN é um corante derivado fenazínico que tem aplicabilidade como indicador de pH e analisou os espectros do corante por espectrofotometria em pHs variados (4, 7 e 11), implicando em comprimentos de onda de 276, 450 e 530 nm, e atestando que existe correlação entre as duas grandezas. Veríssimo (2016), descreveu que a banda de absorção de luz do vermelho neutro como fotossensibilizador está na gama apropriada para ter efeito terapêutico, isto porque localiza-se no intervalo entre 550 e 700 nm, à medida que necessitaria ter o comprimento de onda superior a 600 nm.

Como relatado no trabalho de Dotto (2012), no qual verificou-se a qualidade de aplicação de nanopartículas (como nanoesferas, nanotubos, e nanocompósitos) para a remoção de corantes alimentícios, observou-se uma afinidade do corante vermelho neutro à Nanoesferas de Fe_3O_4 , com uma capacidade de adsorção de $105,0 \text{ mg.g}^{-1}$ e por nanotubos de argila, tendo adsorção de $65,5 \text{ mg.g}^{-1}$.

O trabalho ainda expõe que a maior parte dos nanomateriais necessitam de modificações para melhorar a capacidade de adsorção aos corantes, sendo aplicados diversos reagentes para reações que podem prejudicar a produção na perspectiva econômica e ambiental (DOTTO, 2012).

O encapsulamento do vermelho neutro já foi relatado em alguns trabalhos antecedentes, tal como deve ser descrito o estudo de adsorção de vermelho neutro a partir de solução aquosa de nanotubos de haloiseno, investigando-se o efeito da dose adsorvente, pH inicial, temperatura e concentração (LUO, 2010)

O encapsulamento do VN também foi pautado na produção de HE (2010), no qual fixou-se nanopartículas de Fe_3O_4 ao óxido de grafeno e testou-se a adsorção com o corante em questão e azul de metileno, bem como no trabalho feito por Veríssimo

(2016) que propôs ensaios de toxicidade sobre células tumorais para avaliar potencial como sensibilizador para fototerapia.

3.2.2 Grupamento Nitrito (NO_2^-)

Nota-se que o nitrito é um íon originado em maior parte de compostos orgânicos nitrogenados, como estrume de animais, sedimentos, resíduos orgânicos em geral e pela bioformação dos nitratos (LI, 2019)

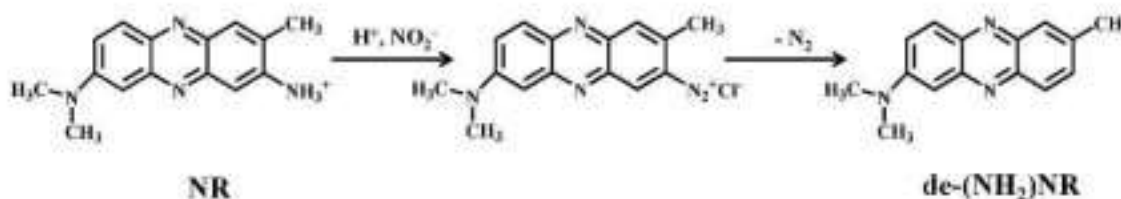
O íon nitrito é um poluidor notável em amostras de água e solo, tornando-se presente inclusive nos fertilizantes e conseqüentemente nos alimentos, sendo responsável pela antecipação da eutrofização no meio ambiente, pelo sua dispersão desencadeada por atividades antropogênicas. Logo, a espécie começou a ser investigada como parâmetro para poluição (SINGH, 2019).

Um importante método de determinação de nitrito foi exibido por Wang (2017), pela reação de nitrosação. A técnica advém pela interação da espécie química com outras indicadoras originando produtos coloridos. É possível aplicar a lei de Beer a partir do intervalo de concentração de 0 a 3,22 ppm de NO_2^- . O Autor afirma também que a absorvância máxima do produto é de 312 nm.

A combinação do corante VN, com o complemento NO_2^- foi relatado no trabalho de Du (2018), na qual projetou-se a criação sensores de fluorescência apoiados em per-6-mercaptop-beta-ciclodextrinas para a detecção de nitrito na água para caracterização da qualidade da mesma. O autor expõe que isso é possível pelo fato de que o corante compreende uma amina primária em sua disposição que ao interagir com o nitrito, concebe extinção por fluorescência.

Segundo Liu (2016), quando o nitrito é combinado com o grupamento amina primário pertencente ao vermelho neutro, como na figura 7, origina um grupo instável em pHs diferentes do neutro: o diazônio. Logo, ao liberar o nitrogênio, é modificado para a estrutura estável. Em contrapartida, na carência de NO_2 , os chamados sais de diazônio se ligam espontaneamente ao corante em sua porção amina aromática.

Figura 7 – Reação de ligação entre o corante VN e o NO_2^-



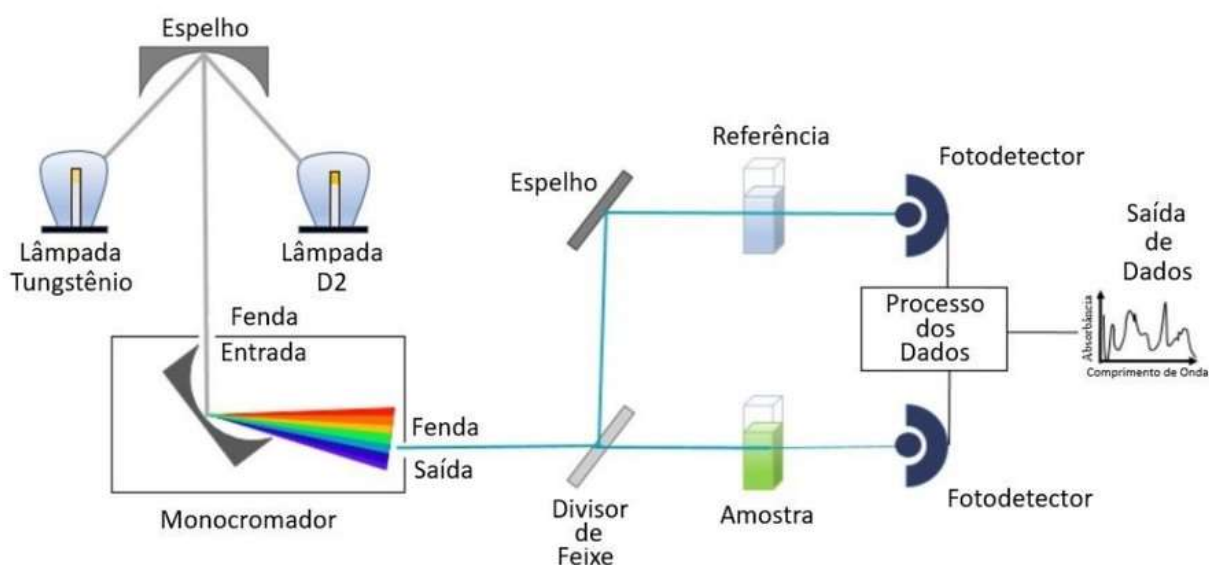
Liu, et al. (2016)

3.3 Técnicas espectrofotométricas

Para realizar análise de variados tipos de substâncias através da tendência da matéria em absorver e emitir luz, usa-se o recurso da espectroscopia UV-vis. A ferramenta utilizada possui alcance de 200 nm à 380 nm no intervalo do ultravioleta e de 380 nm à 780 nm na faixa da luz visível (ROCHA, 2018).

O espectrômetro utiliza uma fonte de luz lançada e direcionada por uma fresta até o monocromador. Essa estrutura restringe o comprimento de onda que atravessa um buraco enquanto ocorre a varredura da máquina. Ao deixar o monocromador, o feixe de luz atinge a amostra, que por consequência transmite a luz que não foi assimilada, podendo assim ser captado por um fotodetector, como demonstrado na figura 8. A técnica é econômica, fácil, versátil, sensível e precisa, tendo seu fundamento a capacidade da matéria em absorver e emitir luz. (ROCHA, 2018).

Figura 8 – Representação esquemática do funcionamento de um espectrofotômetro de UV-vis de duplo feixe e percurso realizado da luz.



ROCHA, F. S. (2018)

A luz incidida pode ir ao encontro de um grupo cromóforo, ou mesmo um grupo auxocromo. O primeiro trata-se de grupamentos covalentes insaturadas que tem a capacidade de absorver a luz do feixe por possuir energia correspondente ao comprimento de onda do ultravioleta-visível (UV-vis). Já o segundo não absorvem energia nesse intervalo e ainda podem prejudicar a absorção do cromóforo por apresentar-se no sistema (ROCHA, 2018).

Consoante ao Rocha (2018), considerando a espectroscopia de fluorescência, a essência parte do mesmo conceito citado anteriormente, mas difere de forma que o operador que designa o comprimento de onda exato que irá excitar a amostra que

logo, irradiará luz em outro comprimento, que identificado pelo detector, fornecerá um resultado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho de que se trata, desdobra-se em duas etapas. A primeira concerne uma revisão descritiva de literatura, agregando diferentes informações sobre os objetos de estudo, organizando-as e por fim realizando uma análise bibliométrica. A etapa subsequente compreende a um complemento experimental da revisão citada, na qual trata-se de uma avaliação dos aspectos fotofísicos e fotoquímicos do VN, associados ao nitrito e ao óxido de grafeno.

4.1 Metodologia da revisão da literatura

Na primeira investigação, foram selecionados artigos publicados entre os anos de 2010 e 2019, nas bases de dados: SciELO (Scientific Eletronic Library Online), PubMed, LILACS, (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e MEDLINE (Medical Literature Analysis and Retrieval Sistem on-line). Além disso, pesquisou-se relatórios técnicos e livros no motor de busca do Google Acadêmico para a produção da revisão sistemática.

Empregou-se os seguintes descritores nas línguas portuguesa e inglesa e suas combinações correspondentes: “Vermelho neutro”, “grafeno”, “óxido de grafeno”, “terapia fotodinâmica”, “nanotecnologia”, “câncer”, e “Nanocompósitos”, “Red Neutral”, “Graphene”, “photodynamic therapy”, “nanotechnology” e “Cancer” alternando os conectivos “and” e “or”.

Como critério de inclusão para a seleção dos artigos, utilizou-se: artigos em língua portuguesa, inglesa e espanhola, disponibilidade de texto completo em suporte eletrônico, publicados em periódicos nacionais e internacionais. Dos textos obtidos, excluiu-se aqueles que não se vincularem diretamente ao tema os repetidos por sobreposição de palavras-chave.

Em contrapartida, como critérios de exclusão, definiu-se os artigos elencados anteriormente ao período de 9 anos, com exceção daqueles usados para embasamento histórico, sendo excluídos aqueles que não correspondiam aos objetos de estudo já citados.

Utilizando a metodologia apoiada em big data, foi realizada mineração dos dados sobre os principais trabalhos que referiam-se ao corante vermelho neutro obtidos nas plataformas de pesquisa listadas acima construindo um arquivo único com os descritores. Nesse caso entende-se por dados os textos das palavras chaves e títulos. Após esta etapa utilizando o software VOS Viewer, construiu-se mapa de densidade bibliométrico, como resultado desta mineração de dados.

Para isso, empregou-se o banco de dados Scopus Preview utilizando os seguintes descritores: “neutral”, “red”, “dye” e “ions”, limitando primeiramente no intervalo de 2009 a 2019 e posteriormente de 2015 a 2019 a fim de obter recursos comparativos.

Logo, construiu-se o material estatístico por meio da ferramenta VOS viewer (ZHANG e colaboradores, 2017; WATAD e colaboradores, 2017; KUANG; HONG; ZENG, 2016).

4.2 Ensaios exploratórios

4.2.1 Equipamentos

- Balança analítica, marca GEHAKA, modelo AG200;
- Micropipetas automáticas com escalas variáveis de 2-20 μL , 20-200 μL e 100-1000 μL , marca Kasvi, modelo Ecopipette;
- Espectrofotômetro Ultravioleta-visível (UV-vis), marca Hitachi Hight Technologies Corporation, modelo U-3900H;
- Cubetas de Quartzo

4.2.2 Reagentes

Os materiais listados foram empregados sem prévia purificação, com exceção daqueles quando indicado pelo fabricante. Segue a lista:

- Vermelho neutro (Sigma-Aldrich)
- NaNO_2^- (Sigma-Aldrich)
- Óxido de Grafeno (Sigma-Aldrich)
- Ácido Clorídrico(Sigma-Aldrich)

4.2.3 Análise - Espectroscopia de Absorção Molecular (UV-vis)

Para a leitura no espectrofotômetro UV-VIS, diluiu-se uma massa mínima do corante Vermelho Neutro em água dentro de um balão volumétrico de 50 mililitros, conseguindo uma solução de concentração igual a 353 $\mu\text{mol/L}$. Em seguida, armazenou-se a solução do corante em pequenos frascos envoltos em papel alumínio para proteger dos efeitos degradantes da luz.

Inicialmente, acrescentou-se água às duas cubetas e realizou-se o branco pela leitura das mesmas sem o corante. Depois adicionou-se variados volumes da solução de vermelho neutro padronizada em sequência, completando o volume de 2500 μL com água destilada para aumentar gradativamente as concentrações. A cada solução nova, realizou-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-vis.

O instrumento foi programado para realizar a leitura na velocidade de 1200 nm/min para o intervalo do comprimento de onda de 200 a 800 nm.

Em seguida misturou-se 2000 µL uma solução vermelho neutro 120 µmol/L com 500 µL de HCl 1 Mol/L de e titulou-se com uma solução padrão de nitrito com contração igual a 1 milimol/L. (1000 µMol/L). Assim acrescentou-se nitrito de 5 em 5 µL e a cada medida foi realizada a leitura da absorbância.

De diferente forma, realizou-se a leitura da solução de vermelho neutro com HCl seguido da mesma com adição de 100 µL de uma solução 0,1 mg/ml de Óxido de Grafeno e realizou-se a leitura da absorbância de 5 em 5 minutos (com agitação) até 1 hora.

Foram construídos gráficos de sobreposição com as curva de calibração de absorbância versus comprimento de onda utilizado o *software GraphPad Prism 8* para o corante isolado, para as titulações, e para a variação do tempo , podendo assim determinar as curvas padrões correspondentes à concentração x absorbância e tempo x absorbância aplicando-nas regressão linear pelo mesmo *software*.

Segundo Harris (2005) a espectrofotometria pode ser utilizada a fim de determinar uma constante de equilíbrio, para isso é preciso medir as concentrações das espécies que irão se agregar. Então, determinou-se uma titulação de uma solução de “P” de volume fixo com crescentes volumes de “X”, e considerando P0 a concentração total de “P”.

Para determinar tal constante, empregou-se a equação de Scatchard:

$$[PX] / [X] = K[P] = K(P_0 - [PX])$$

Considerou-se o Vermelho neutro = “P” e os aditivos = “X”, sendo os dois as espécies que reagem formando o produto agregado VN:Aditivo = “PX” e “K” a constante.

A partir dessa expressão, é factível a construção de um gráfico em um método direto, em que se emprega nos eixos X e Y a concentração do titulado e a absorbância sucessivamente, formando uma linha reta com coeficiente angular representado por “-K”. Esse “-K” nesse sistema determina a constante de ligação para a reação (HARRIS, 2005).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de Revisão de Literatura

O método de mapeamento de palavras-chave e expressões mais empregues tem sido utilizado para determinação dos tópicos do material da investigação pelo pesquisadores. Para tal, a ferramenta digital VOS Viewer disponibiliza numerosos tipos de análises gráficas embasados na co-ocorrência dos elementos da literatura investigada. (ECK; WALTMAN, 2010)

Esse sistema basea-se em uma divisão de grupo denominado clusters, na qual apresenta uma conexão entre autores e termos utilizados para a construção e exposição de redes bibliométricas. Esses clusters agrupam todas as informações equivalentes e são retratados por diferentes colorações. (ECK; WALTMAN, 2010).

A partir da análise bibliométrica utilizando palavras chaves presentes nas publicações recuperadas da base Scopus, encontrou-se 204 artigos relacionados aos tópicos do estudo, com os descritores no intervalo definido e pôde-se agrupa-los em algumas áreas do conhecimento, sendo esses expressos pelo VOS Viewer.

Dentre as esferas mais pesquisadas constatou-se 41 artigos na área da química, 39 na área de materiais, 32 na área ambiental, 28 física e 15 engenharia.

Já entre os anos de 2015 e 2019, observou-se um acréscimo relevante na proporção da produção científica nas áreas da química e bioquímica, além da separação das áreas. (como explícito na figura abaixo), revelando um redirecionamento investigativo das funções do corante.

Percebeu-se além disso, um aumento no número de publicações da temática trabalhada, visto que o intervalo de 2015 a 2019 correspondeu a cerca de 87% dos dez anos de pesquisa.

Foi possível construir também um mapa de visualização de densidade correlacionando as palavras chaves mais comuns localizadas nos artigos citados anteriormente no período de 2009 à 2019.

A proporção do tamanho dos círculos dentro do mapa exprime a quantidade de ocorrências do item, enquanto a distância dentre eles refere-se ao grau de relação. Logo, quanto maiores, mais presentes e quanto mais juntos, mais associados nos trabalhos (ECK et al., 2010).

Notou-se que as palavras chaves que coincidiram entre a maior parte dos artigos descobertos pela pesquisa foram “caracterização”, “interação com o DNA”, “corante vermelho neutro”, “corante cationico”, e “íon metal”, reafirmando a orientação dos estudos para as áreas da química e bioquímica.

Na criação do mapa de densidade com todas as palavras chaves, ou seja, incluindo, além dos termos definidos pelos autores das publicações, os do index, tem-se um resultado mais representativo. Este mapa agrupou um número mínimo de 3 ocorrência de cada palavra chave num universo de 780 outras, das publicações selecionadas. Para cada uma das 780, as densidades dos links de co-ocorrência com outras palavras-chave foi calculado e as com maior densidade de link total foram selecionadas e apresentadas na figura 13. (ECK; WALTMAN, 2010; ECK et al., 2010)

O resultado do mapa de visualização demonstra que a temática que engloba o corante vermelho neutro juntamente com nanotecnologia é inovadora, por não ser representada com frequência nos artigos encontrados.

5.2 Ensaios experimentais exploratórios

Nesta etapa, foi explorado algumas informações obtidas da mineiração dos dados e da revisão da literatura com os termos : vermelho neutro, óxido de grafeno e íon nitrito.

Estes ensaios experimentais exploratórios foram úteis para o aprendizado mais aprofundado de técnicas espectroscópicas e suas análises.

O primeiro ensaio experimental consistiu na construção da curva de concentração (padrão) para o corante vermelho neutro em água. Assim, primeiro gráfico foi gerado a partir de 35 leituras incluindo o branco variando o volume em 10 μL de Vermelho Neutro (VN) até o valor de 150 μL . Continuou-se variando de 25 μL em 25 μL até 400 μL e de 50 μL em 50 μL até 850 μL .

Percebeu-se que à medida que a concentração do corante aumentou na cubeta, o pico da absorvância aumentou. Pico este que iniciou em 533 nm e com a concentração máxima variou levemente para 526 nm com absorvância de 0,4152 indicando um deslocamento hiperacrômico segundo Rocha (2018).

A partir das concentrações de vermelho neutro em 0,02 - 25 μM e a variação da absorvância em 526 nm, determinou-se uma curva padrão relacionando tais medidas e aplicou-se a regressão linear sobre ela. Foi traçada uma reta crescente com equação $Y = 0,015X - 1,1483^{-7}$ e $R^2 = 1$.

Em sequência, foi produzido o gráfico com base nas 15 leituras (incluindo o branco) de absorvância medidas depois da titulação do vermelho neutro com o NaNO_2^- . O volume do titulante variou progressivamente de 5 μL em 5 μL até 65 μL .

Com o acréscimo do HCl, percebeu-se um deslocamento do pico do vermelho neutro de 526 nm com absorvância 0,4152 para 533 nm com absorvância de 0,6793. E logo, notou-se que à proporção que o nitrito 0,001M foi titulado, o pico variou até 510 nm, com 541 nm aos 50 μL , demonstrando queda gradual na absorvância.

O resultado da prática confirmou o estudo de Han e colaboradores (2014), na qual em seu espectro, o VN puro em solução aquosa possuía absorvância em torno de 525 nm, mas seguido da reação com o nitrito em maiores concentrações, na presença do HCl, deslocou-se para um maior comprimento de onda. O autor afirma que a alteração da banda de absorção, bem como a mudança de cor do vermelho para o azul são consequência do grupo azônio que se forma nos anéis aromáticos, aumentando o sistema de conjugação. Esse deslocamento para comprimento de ondas mais longos é denominado batocrômico (ROCHA, 2018).

Em contrapartida, se adicionado um tampão a fim de neutralizar o pH da solução, tem-se como consequência a volta da coloração vermelha inicial e o retorno da banda de absorção, assim como a mudança gradual desse pH no trabalho foi diretamente proporcional ao movimento da banda no comprimento de onda. Isso demonstrou que a quebra do sal de diazônio depende do potencial hidrogeniônico do meio (HAN et al., 2014). A partir desses recursos foi possível consolidar a presença da reação entre o corante e o NO_2^- .

Fundamentado nessas leituras, empregando os valores de absorvância em 530 nm e a concentração de nitrito em 0-25 μ Molar, desenvolveu-se a curva padrão confrontando as duas grandezas, e aplicou-se a regressão linear. Obteve-se uma reta decrescente com equação $Y = -0,01586 X + 0,5774$ e $R^2 = 0,9824$ (Figura 18). Foi possível também constatar que os interceptos em X e Y foram 36,41 e 0,5774 sucessivamente.

Sabendo que a molécula de vermelho neutro possui apenas um sítio quelante para o nitrito, aplica-se o modelo direto para a determinação de uma constante de associação K , na qual o “- K ” corresponde ao coeficiente linear da curva de calibração após a execução da regressão linear (HARRIS, 2005), tem-se como constante de equilíbrio $1,58 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Posteriormente, elaborou-se o gráfico que demonstra o comportamento espectrofotométrico da solução de Vermelho Neutro + HCl após a adição de $100 \mu\text{L}$ de Óxido de grafeno à $0,1 \text{ mg/ml}$, bem como a deformação da curva após o período de 1 hora com medidas a cada 5 minutos até 20 minutos, e depois a cada 10.

Com a adição do óxido de grafeno, não houve variação do comprimento de onda no pico, permanecendo em 527 nm . Também foi possível notar com o acréscimo do nano composto um aumento da absorbância em todo o intervalo da faixa visível, inclusive no pico correspondente ao vermelho neutro. Esse último variou de $0,7064$ para $0,8851 \text{ nm}$ (crescimento de $25,29\%$).

No mesmo gráfico, comparou-se a absorbância em 527 nm após uma hora, revelando uma leve queda na absorbância até 40 minutos, seguido de um pequeno aumento da mesma, como demonstra a tabela abaixo:

Com isso, pode-se construir uma curva de absorvância no comprimento de 530 nm em relação ao tempo:

Então, desenhou-se o gráfico de sobreposição de curvas de titulação do composto (vermelho neutro, HCl e OG) com a solução de nitrito 0,001 M aumentando o volume gradualmente de 5 em 5 μL até 50 μL . Percebeu-se variação batocrômica do pico que antes era de 527 para 548 nm com 50 μL , decrescendo a absorvância de 0,8722 para 0,4814.

O acréscimo do OG à solução de VN demonstrou significativamente apenas um deslocamento hipercrômico de todo o intervalo da luz visível ao ultra-violeta, indicando uma sobreposição das curvas.

Por fim, tomando como referência as medidas de absorvância em 530 nm e a concentração do nitrito em μMolar , determinou-se a curva padrão entre os valores e realizou-se a regressão linear. Destarte, conseguiu-se uma reta descendente com equação $y = -0,02262 + 0,9150x$ e $R^2 = 0,9806$. Os interceptos em x e y foram 40,46 e 0,9150 sucessivamente.

Outra vez, a partir do pressuposto que o nitrito teria possibilidade de se ligar em apenas um sítio e segundo Harris (2005), uma constante de associação pode ser definida sendo “-K” o coeficiente angular da reta traçada a partir da regressão linear da mesma, $K = 2,26 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Nesta etapa das análises também foram avaliados os modelos Benesi-Hildebrand e Scatchard na busca de melhor ajuste matemático e tentativa de explicação da forma de associação do VN+GO na presença de nitrito, comparando com o mesmo processo na ausência de GO. (PRADO e colaboradores, 2016, FISCHER; MEDZIHRADSKY, 1980, MEYTS; ROTH, 1975).

O modelo de Benesi-Hildebrand é uma abordagem matemática usada na físico-química para a determinação da constante de equilíbrio K e a estequiometria das interações sem ligação. Equação de Benesi-Hildebrand para formação de complexo 1:1 entre molécula hospedeira (*host*) e hospede (*guest*)(YANG et al., 2000).

Fundamentado no gráfico de Benesi-Hildebrand (ou gráfico duplo recíproco) da figura 24, calcula-se a constante de associação empregando a Equação:

$$1/(A-A_0) = 1/(K_a \times (A_{max} - A_0) \times [\text{NaNO}_2^-]) + 1/(A_{max} - A_0)$$

Na qual: A é a intensidade da absorção mensurada, A_0 a absorbância do vermelho neutro sem o nitrito e A_{max} a intensidade máxima medida do complexo (ELMORSI, 2017). A constante de associação calculada foi de $9,96 \times 10^{-2}$, na presença de GO, enquanto na ausência foi de $9,64 \times 10^{-2}$.

Outro modelo de análise gráfica é o de Scatchard. Foi utilizado quando a tecnologia ainda não era capaz de simplificar a regressão não linear para facilitar a compreensão dos gráficos, ele corresponde à curva de ligação linearizada. Recentemente, é possível usar a regressão não linear para regular os dados da ligação (CHENPRAKHON, 2010).

Nesse caso, levando em consideração a isometria simples de ligação de Langmuir 1:1 da reação do vermelho neutro com o nitrito, tem-se a equação:

$$Y = C + B_{max} \cdot X / (K_d + X)$$

Onde, X é a concentração do titulante (Nitrito), Y o sinal da absorbância do vermelho neutro, C o sinal quando a concentração do titulante for igual à 0, $B_{max} + C$

corresponde ao último sinal de absorvância, com a ocupação dos sítios de ligação e K_d a constante de equilíbrio buscada. A curva tem formato de hipérbole quadrada e cruza C nas ordenadas (eixo Y) e possui uma assíntota orinzontal em $Y = C + B_{max}$ (CHENPRAKHON, 2010).

Calculando a constante de associação com esse método, encontrou-se $K_d = 2,57$ para a titulação na presença da nanopartícula e $K_d = 11,78$ no procedimento sobre o VN sem GO.

Das análises realizadas, os valores de R^2 para o modelo de scatchard foram de 0,9106 e 0,8699, os valores obtidos no modelo de Benesi-Hildebrand foram ambos $R^2 = 0,9999$ e o ajuste direto foi 0,9824 e 0,9836. O modelo de Hildebrand mostrou melhor valor de correlação R^2 sendo o modelo que ajusta melhor os parâmetros encontrados.

Levando em consideração que o método de Hildebrand obteve R^2 mais próximo de 1, tem-se maior confiabilidade para comparar as duas constantes de associação. Assim, notou-se que as mesmas possuíram uma variação pequena, de apenas 0,032, demonstrando que o óxido de grafeno não prejudicou a ligação do VN com o nitrito. Isso ter ocorrido pelo fato do óxido de grafeno não possuir forças covalentes para se ligar ao VN, tendo como principais forças de ligação do tipo π - π .

6 CONCLUSÃO

Foi possível com o presente trabalho, produzir um referencial teórico que compreendesse os principais temas necessários para introduzir a investigação sobre a formação de um novo complexo do corante vermelho neutro com a nanopartícula óxido de grafeno para ser usada futuramente como recurso terapêutico no tratamento de câncer através da terapia fotodinâmica.

Percebeu-se nesse conglomerado de literatura que o desenvolvimento de nano partículas tem revolucionado tanto as áreas da engenharia e materiais, quanto servido de alternativas para capacitar sistemas diferenciados de liberação de fármacos a fim de minimizar efeitos adversos e promover aumento da eficácia do tratamento.

Notou-se que o vermelho neutro foi muito estudado no passado com o objetivo de tingimento histológico com ensaios de viabilidade celular, todavia estudos recentes perceberam novas funções ao corante como a de sensor para nitrito e como futuro pretendente à fotossensibilizador na TFD.

Por meio das análises bibliométricos, notou-se um aumento súbito na produção de artigos nos últimos cinco anos, na qual a maior parte deles envolveram a área da química e da bioquímica, materiais e ambiental, percebendo uma relação dos autores atuais com a temática dos novos sensores de nitrito e os estudos das suas propriedades farmacológicas.

Conclui-se que o método matemático que mais se adequou ao comportamento da curva de titulação com NO_2^- em ambas as circunstâncias foi o de Hildebrand, podendo assim ser utilizado para comparar as constantes de associação (K). Diante disso, foi possível fazer uma análise comparativa da ligação do VN com o nitrito na presença e na ausência do óxido de grafeno a partir das práticas exploratórias, concluindo por meio da variação de K e visualização dos gráficos que a presença do óxido de grafeno não prejudica a associação do corante com o aditivo NO_2^- .

O trabalho foi desenvolvido a fim de introduzir a idealização de um sistema. Logo, depreende-se que serão necessários novos ensaios para progredir nos estudos de caracterização do composto, seguidos de testes experimentais *in vitro* e *in vivo* para enfim viabilizar a futura utilização do VN como terapia no combate às neoplasias.

REFERÊNCIAS

- ACKROYD, R. et al. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*. v. 74, n. 5, p. 656 – 669, 2001.
- ALMEIDA, R. M. S. et al. ANÁLISE HISTOLOGICA DE TUMORES MAMARIOS SUBMETIDOS À TERAPIA FOTODINÂMICA. **XX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, XVI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação e VI Encontro de Iniciação à Docência**, São Paulo, 2017.
- ANDRADE, M. Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células Vero. **Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**, p. 1 – 7, 2017.
- BATISTA, R. S. et al. Nanociência e nanotecnologia como temáticas para discussão de ciência, tecnologia, sociedade e ambiente. **Ciência & Educação**, SciELO Brasil, v. 16, n. 2, p. 479 – 490, 2010.
- BERNARDI, D. S. et al. **Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase**. 2011. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-11042011-140431/>.
- BOLOTIN, K. I. et al. Ultrahigh electron mobility in suspended graphene. **Solid State Communications**, v. 146, n. 9 - 10, p. 351 – 355, 2008.
- BUNCH, J. S. et al. Impermeable atomic membranes from graphene sheets. **Nano letters**, v. 8, n. 8, p. 2458 – 2462, 2008.
- CAETANO, R. C. Grafeno: características, propriedades e aplicações. 2017.
- CAMARGOS, J. S. F.; SEMMER, A. D. O.; SILVA, S. N. D. Características e aplicações do grafeno e do óxido de grafeno e as principais rotas para síntese. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 3, n. 8, p. 1118 – 1130, 2017.
- CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTI, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quim Nova**, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.
- CARL ROCH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos- FISPQ: Vermelho Neutro**. [S.l.], 2018. Disponível em: https://www.carlroth.com/downloads/sdb/pt/T/SDB_T122_PT_PT.pdf. Acesso em: 02/11/2019.
- CASTRO, G. V. de; RODRIGUES, T. Estudo espectroscópico de corantes fenazínicos: aspectos fotoquímicos e radicalares. In: **I Encontro de Iniciação Científica-2011**. [S.l.: s.n.], 11.
- CHENPRAKHON, P. et al. Measuring Binding Affinity of Protein Ligand Interaction Using Spectrophotometry: Binding of Neutral Red to Riboflavin-Binding Protein. **Journal of chemical education**, v. 87, n. 8, p. 829 – 831, 2010.
- CONN, H. J. **HJ Conn's Biological stains: a handbook on the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory**. [S.l.]: Williams & Wilkins, 1977.

- DIAS, J. S. et al. Chlorambucil encapsulation into PLGA nanoparticles and cytotoxic effects in breast cancer cell. **Journal of Biophysical Chemistry (Print)**, v. 6, p. 1 – 1, 2015.
- DOTTO, G. L. Bioissorção de corantes alimentícios utilizando nanopartículas de *Spirulina platensis*. 2012.
- DU, X. et al. The Trace Detection of Nitrite Ions Using Neutral Red Functionalized SH- β -Cyclodextrin@ Au Nanoparticles. **Sensors**, v. 18, n. 3, p. 681 – 681, 2018.
- DUARTE, A. V. et al. Progressos da nanotecnologia no tratamento tumoral: uma revisão sistemática. **Id on line revista multidisciplinar e de psicologia**, v. 12, n. 40, p. 2 – 2, 2018.
- DUTRA, D. A. M. et al. Avaliação do fotossensibilizador azul de metileno em diferentes formulações para uso em terapia fotodinâmica. 2013.
- ECK, N. J. V.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, v. 84, p. 523 – 538, 2010.
- ECK, N. J. V. et al. A Comparison of Two Techniques for Bibliometric Mapping: Multidimensional Scaling and VOS. **Journal of the American Society for Information Science and Technology**, v. 61, p. 2405 – 2416, 2010.
- ELMORSI, T. M. et al. A dual functional colorimetric and fluorescence chemosensor based on benzo [f] fluorescein dye derivatives for copper ions and pH; kinetics and thermodynamic study. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 253, p. 437 – 450, 2017.
- FISCHEL, S. V.; MEDZIHRADSKY, F. **Scatchard analysis of opiate receptor binding**. [S.l.]: Elsevier, 1980. 91 – 94 p.
- FONSECA. Mini-curso: introdução as propriedades físicas e estruturais do grafeno e dos nanotubos de carbono. In: **introdução as propriedades físicas e estruturais do grafeno e dos nanotubos de carbono**. Rio de Janeiro: UNIVERIDADE FEDERAL FLUMINENSE, INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS, 2011.
- GARCIA, R. D. P.; MENEZES, L. M. de. **Efeitos citotóxicos e genotóxicos das ligas de solda de prata em ortodontia**. 2015. Dissertação (Mestrado) — Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Disponível em: <http://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/6297>.
- Georgakilas, V., Tiwari, J. N., Kemp, K. C., Perman, J. A., Bourlinos, A. B., Kim, K. S., & Zboril, R. (2016). Noncovalent functionalization of graphene and graphene oxide for energy materials, biosensing, catalytic, and biomedical applications. **Chemical reviews**, 116(9), 5464-5519.
- GOLDHABER. **Calcif Biological Systems: Behaviour of bone in tissue culture**. **Amer. Assoc. Advanc. Sci**, Washington D.C, v. 1, p. 349 – 372, 1960.

GOMES, A. J.; LUNARDI, C.; TEDESCO, A. Characterization of biodegradable poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with bacteriochlorophyll-a for photodynamic therapy. *Photomedicine & Laser Surgery*. **Photomedicine & Laser Surgery**, v. 25, n. 5, p. 428 – 435, 2007.

GOMES, A. J. et al. Photobiological and Ultrastructural Studies of Nanoparticles of Poly(lactic co-glycolic acid)-Containing Bacteriochlorophyll-a as a Photosensitizer Useful for PDT Treatment. **Drug Delivery**, v. 12, p. 159 – 164, 2005.

GOMES, A. J. et al. Biodegradable nanoparticles containing benzopsoralens: An attractive strategy for modifying vascular function in pathological skin disorders. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 121, p. 1348 – 1354, 2011.

GREEN, F. J. **Sigma-Aldrich handbook of stains, dyes, and indicators**. [S.l.]: Aldrich Chemical Co., 1990.

HAN, J. et al. Upconversion nanoparticles for ratiometric fluorescence detection of nitrite. **Analyst**, v. 139, n. 12, p. 3032 – 3038, 2014.

HARRINGTON, T. D. et al. Neutral red-mediated microbial electrosynthesis by *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Zymomonas mobilis*. **Bioresource technology**, v. 195, p. 57 – 65, 11 2015. ISSN 0960-8524. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4659424/>.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6ª. ed. Rio de Janeiro - RJ: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora SA, 2005.

HE, F. an et al. The attachment of Fe₃O₄ nanoparticles to graphene oxide by covalent bonding. **Carbon**, v. 48, n. 11, p. 3139 – 3144, 2010.

HU, C. et al. Spontaneous Reduction and Assembly of Graphene oxide into Three-Dimensional Graphene Network on Arbitrary Conductive Substrates. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 3, p. 2065 –, 2013. ISSN 2045-2322. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3691888/>.

JAWORSKI, S. et al. In vitro and in vivo effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. **International Journal of Nanomedicine**, Dove Medical Press, v. 10, p. 1585 – 1596, 2015. ISSN 1176-9114. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4346365/>.

JEMAL, A. et al. The cancer atlas. **American Cancer Society**, 2016.

JESUS, K. A. D.; FREIRE, E.; GUIMARÃES, M. J. O. Grafeno: aplicações e tendências tecnológicas. 2012.

JOHNSON, D. W.; DOBSON, B. P.; COLEMAN, K. S. A manufacturing perspective on graphene dispersions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 20, p. 5 – 6, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135902941500093X>.

J.S., S. **Preliminary Observations on the Effect of Photodynamic Therapy on Bone Resorption in Mouse Calvaria Organ Cultures Using Neutral Red as the Photosensitizer**; 1999. Dissertação (Mestrado) — Harvard School of Dental Medicine. Boston, MA.

KRÓL, P. et al. Composites prepared from the waterborne polyurethane cationomers—modified graphene. Part I. Synthesis, structure, and physicochemical properties. **Colloid and Polymer Science**, Springer Berlin Heidelberg, v. 293, p. 421 – 431, 2015. ISSN0303-402X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306739/>.

KUANG, Y.; HONG, M.; ZENG, J. Big data research analysis based on bibliometrics. **Hans Journal of Data Mining**, v. 6, n. 3, p. 125 – 137, 2016.

KUILLA, T. et al. Recent advances in graphene based polymer composites. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1350 – 1375, 2010.

LAUBACH, H. et al. In-vivo singlet oxygen dosimetry of clinical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. **Journal of biomedical optics**, v. 13, n. 5, p. 050504 –, 2008. ISSN 1083-3668. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2994192/>.

LEE, C. et al. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. **science**, v. 321, n. 5887, p. 385 – 388, 2008.

LI, G. et al. Recent Developments on Graphene-Based Electrochemical Sensors toward Nitrite. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 166, n. 12, p. 881 – 895, 2019.

LIMA, A. L. P. et al. Meta-análise de dados sobre a utilização de nanopartículas de carbono para o tratamento tumoral. In: **Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq**. [S.l.:s.n.], 2018.

LIU, J.; CUI, L.; LOSIC, D. Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. **Acta biomaterialia**, v. 9, n. 12, p. 9243 – 9257, 2013.

LIU, W. R. et al. Characterization and electrochemical behavior of graphene-based anode for Li-ion batteries. **The Open Materials Science Journal**, v. 5, p. 236 – 241, 2011.

LIU, Y. et al. A fluorescent nanoprobe based on metal-enhanced fluorescence combined with Förster resonance energy transfer for the trace detection of nitrite ions. **RSC advances**, v. 6, n. 33, p. 27395 – 27403, 2016.

LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chemical reviews**, v. 115, p. 1990 – 2042, 2015.

LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Synergic photosensitizers: a new trend in photodynamic therapy. **Current Organic Chemistry**, Bentham Science Publishers, v. 9, n. 8, p. 813 – 821, 2005.

LUO, P. et al. Study on the adsorption of Neutral Red from aqueous solution onto halloysite nanotubes. **Water research**, v. 44, n. 5, p. 1489 – 1497, 2010.

MAKINO, L. C. U.; NAKAGHI, L. S. O. U. **Estrutura, ultraestrutura e histoquímica do**

aparelho digestório do Prochilodus lineatus. Análise da diversidade da microbiota intestinal de Prochilodus lineatus e Pterygoplichthys anisitsi. 2010. Tese (Doutorado) — Universidade Estadual Paulista (UNESP). Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/100186>.

MARASCHIN, T. G. et al. Preparação de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido e dispersão em matriz polimérica biodegradável. 2016.

MEYTS, P. D.; ROTH, J. Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis. **Biochemical and biophysical research communications**, Elsevier, v. 66, n. 4, p. 1118 – 1126, 1975.

MOREIRA, C. L. Revisão bibliográfica da adsorção do atenolol: materiais e parâmetros. 2018.

MOREIRA, J. R. L. A Nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no Tratamento do Câncer de Mama. 2014.

NOLASCO, L. G.; SANTOS, N. dos. Avanços nanotecnológicos e os desafios regulamentares-10.12818/p.0304-2340.2017.v71p375. **Revista da faculdade de direito da ufmg**, n. 71, p. 375 – 420, 2018.

NOVOSELOV, K. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, Manchester, UK, v. 306, p. 366 – 669, 2004.

OBAID, G. et al. Photonanomedicine: A Convergence of Photodynamic Therapy and Nanotechnology. **Nanoscale**, v. 8, n. 25, p. 12471 – 12503, 7 2016. ISSN 2040-3364. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4956486/>.

OLIVEIRA, K. T. et al. D. Conceitos fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do tipo Porfirinas, clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310 – 335, 2014.

ORECCHIONI, M. et al. Graphene as cancer theranostic tool: progress and future challenges. **Theranostics**, v. 5, n. 7, p. 710 –, 2015.

PAIVA, J. M. de. Nanoestruturas de óxido de grafeno magnético: modificação e funcionalização de superfície para terapia fotodinâmica e fototérmica. 2017.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; OLIVEIRA, A. C. A. X. de. The impact of tobacco additives on cigarette smoke toxicity: a critical appraisal of tobacco industry studies. **Cadernos de saude publica**, v. 33, 2017.

PRADO, C. R. A. do et al. **Estudo cinético e termodinâmico da interação de nanopartículas de ouro com compostos de coordenação.** 2016. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Uberlândia. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17945>.

RANDVIIR, E. P.; BROWNSON, D. A.; BANKS, C. E. A decade of graphene research: production, applications and outlook. **Materials Today**, v. 19, n. 9, p. 426 – 432, 2014].

ROCHA, F. S. Interação de ftalocianinas de zinco com óxido de grafeno: estudo das

propriedades fotoquímicas. 2018.

ROCHA, F. S.; GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N. Graphene oxide– metallophthalocyanine hybrids with enhanced singlet oxygen generation. **Materials Research Bulletin**, v. 114, p. 45 – 51, 2019.

ROGERO, S. O. et al. Toxicidade da nanopartícula de prata (NPAg): estudo comparativo entre suspensões de NPAg obtidas por diferentes métodos. **Anais da**, v. 4, 2015.

SAHOO, S. K.; MISRA, R.; PARVEEN, S. **Nanoparticles**: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. [S.l.]: Pan Stanford, 2017. 73 – 124 p.

SANTOS, M. S. C. dos. . Entrega de fotossensibilizadores mediada por nanofolhas de óxido de grafeno para terapias fotodinâmica e fototérmica combinadas no tratamento de carcinoma mamário in vitro e in vivo. 2017.

SANTOS, R. L. dos et al. Cytotoxicity of electric spot welding: an in vitro study. **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 16, n. 3, p. 57 – 59, 2011.

SEGUNDO, J. E. D. V.; VILAR, E. O. Grafeno: Uma revisão sobre propriedades, mecanismos de produção e potenciais aplicações em sistemas energéticos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 11, n. 2, 2016.

SELLERA, F. P.; POGLIANI, F. C. Terapia fotodinâmica: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 1, p. 5 – 13, 2014.

SETLIK, J.; SILVA, R. C. O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não-melanoma. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 7, n. 4, p. 195 – 206, 2016.

SEVGI, M. et al. Topical Antimicrobials for Burn Infections – An Update. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 8, n. 3, p. 161 – 197, 12 2013. ISSN 1574-891X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4018441/>.

SHAH, R. et al. Progression from Graphene and Graphene Oxide to High Performance Polymer-Based Nanocomposite: A Review. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 54, n. 2, p. 173 – 183, 2015.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos_FISPQ**: Vermelho Neutro. [S.l.], 2011. Disponível em: <http://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Vermelho%20neutro.pdf>. Acesso em: 02/11/2019.

SILVA, L. B. Condições de vida e adoecimento por câncer. **Libertas**, v. 10, n. 2, 2010.

SEVGI, M. et al. Topical Antimicrobials for Burn Infections – An Update. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 8, n. 3, p. 161 – 197, 12 2013. ISSN 1574-891X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4018441/>.

SHAH, R. et al. Progression from Graphene and Graphene Oxide to High Performance Polymer-Based Nanocomposite: A Review. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, v. 54, n. 2, p. 173 – 183, 2015.

SIGMA-ALDRICH. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos_FISPQ**: Vermelho Neutro. [S.l.], 2011. Disponível em: <http://sites.ffclrp.usp.br/cipa/fispq/Vermelho%20neutro.pdf>. Acesso em: 02/11/2019.

SILVA, L. B. Condições de vida e adoecimento por câncer. *Libertas*, v. 10, n. 2, 2010.

SINGH, P. et al. A review on spectroscopic methods for determination of nitrite and nitrate in environmental samples. *Talanta*, v. 191, p. 364 – 381, 2019.

SMANIOTTO, A. et al. Obtenção, caracterização e funcionalização seletiva de óxido de grafeno com espécies sulfuradas e fragmentos orgânicos. 2015.

TANNER, N. A.; ZHANG, Y.; JR, T. C. E. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques*, Future Science, v. 58, n. 2, p. 59 – 68, 2015.

TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C.; LUNARDI, C. N. Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy. *Current Organic Chemistry*, Bentham Science Publishers, v. 7, n. 2, p. 187 – 196, 2003.

VERISSIMO, T. V. et al. In vitro cytotoxicity and phototoxicity of surface-modified gold nanoparticles associated with neutral red as a potential drug delivery system in phototherapy. *Materials Science and Engineering*, v. 65, p. 199 – 204, 2016.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Avanços na utilização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. *Einstein (São Paulo)*, v. 14, n. 1, p. 99 – 103, 2016

WANG, Q. et al. Methods for the detection and determination of nitrite and nitrate: A review. *Talanta*, v. 165, p. 709 – 720, 2017.

WATAD, A. et al. Is autoimmunology a discipline of its own? A big data-based bibliometric and scientometric analyses. *Autoimmunity*, v. 50, n. 4, p. 269 – 274, 2017.

WU, S.; AN, S. S. A.; HULME, J. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. *International journal of nanomedicine*, v. 10, n. Spec Iss, p. 9 – 2015.

XAVIER, A. C. F. et al. A Nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no Tratamento do Câncer de Mama. 2011.

YAN, Z.; NIKA, D. L.; BALANDIN, A. A. Thermal properties of graphene and few-layer graphene: applications in electronics. *Systems*, v. 9, n. 1, p. 4 – 12, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1049/iet-cds.2014.0093>.

YANG, C. et al. The performance of the Benesi-Hildebrand method in measuring the binding constants of the cyclodextrin complexation. *Analytical sciences*, The Japan Society for Analytical Chemistry, v. 16, n. 5, p. 537 – 539, 2000.

YANG, K. et al. Preparation and functionalization of graphene nanocomposites for biomedical applications. **Nature protocols**, v. 8, n. 12, p. 10.1038/nprot.2013.146 –, 12 2013. ISSN 1754-2189. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3878091/>.

YANG, K. et al. The influence of surface chemistry and size of nanoscale graphene oxide on photothermal therapy of cancer using ultra-low laser power. **Biomaterials**, v. 33, n. 7, p. 2206 – 2214, 2012.

ZHANG, W. et al. Big data analysis of global advances in pharmaceuticals and drug delivery 1980–2014. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1201 – 1208, 2017.

ZHANG, W. et al. Synergistic effect of chemo-photothermal therapy using PEGylated graphene oxide. **Biomaterials**, v. 32, n. 33, p. 8555 – 8561, 2011.