

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS DE GRADUAÇÃO EM FÍSICA E ASTRONOMIA

Vitor Luca Moura Marmo

**Síntese e Caracterização de Nanossondas Bifuncionais com Clorina E6 e  
Cetuximabe para Aplicação em Terapia Fotodinâmica**

**Synthesis and Characterization of Bifunctional Nanoprobes with Chlorin E6 and  
Cetuximab for Application in Photodynamic Therapy**

São José dos Campos, SP

2025

Vitor Luca Moura Marmo

**Síntese e Caracterização de Nanossondas Bifuncionais com Clorina E6 e  
Cetuximabe para Aplicação em Terapia Fotodinâmica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, como requisito final para a obtenção do título de mestre em física e astronomia.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Raniero

São José dos Campos, SP

2025

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Marmo, Vitor Luca Moura  
Síntese e Caracterização de Nanossondas Bifuncionais com  
Clorina E6 e Cetuximabe para Aplicação em Terapia Fotodinâmica /  
Vitor Luca Moura Marmo; orientador, Prof. Dr. Leandro José  
Raniero. - São José dos Campos, SP, 2025.  
1 CD-ROM, 110 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do  
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Física  
e Astronomia.

Inclui referências

1. Física e Astronomia. 2. Fotoquimioterapia. 3. Nanossonda.  
4. Clorina e6. 5. Cetuximab. I. Raniero, Prof. Dr. Leandro José ,  
orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-  
Graduação em Física e Astronomia. III. Título.

Eu, Vitor Luca Moura Marmo, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 25 de Março de 2025.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 28 / fevereiro / 2025

uma semente na terra, somente o futuro poderá evidenciar o prosperar de uma

**VITOR LUCA MOURA MARMO**

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOSSONDAS BIFUNCIONAIS COM CLORINA  
E6 E CETUXIMABE PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Física e Astronomia, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Andreza Ribeiro Simioni	<i>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreza Ribeiro Simioni</i>
Prof. Dr. Leandro José Raniero	<i>Prof. Dr. Leandro José Raniero</i>
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Lucia Vieira	<i>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucia Vieira</i>
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Andrea Santos Liu - IFSP	<i>Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea Santos Liu</i>

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 28 de fevereiro de 2025.

## **Agradecimentos**

Aqui sem as convenções acadêmicas deixo meus sentimentos fluírem sem intervenções da razão na qual me apoio tanto. Vou começar com minha família, todos me incentivam e estão sempre me apoiando. Nunca houve questionamentos ou descrenças sobre minhas escolhas. Creio que isto seja importante para o desenvolvimento do meu afeto crescente em relação a minha família. Minha mãe e meu pai em especial sempre estiveram ali por mim em momentos que minha mente estava afundada no profundo oceano do medo e da ansiedade. Eles conseguiram me ajudar mostrando que mesmo na escuridão mais profunda, sempre há uma luz. Eles me ensinaram que por mais difícil que seja se você lutar com todo seu potencial, você pode mudar a realidade distorcida criada em sua mente inquieta. Por isso sou eternamente grato a eles.

Minha namorada Jéssica foi de extrema importância nesta jornada que escolhi para minha vida. Ela me ajudou de corpo e alma em diversos aspectos. Ela viu em mim qualidades e entendeu meus defeitos, me encorajou a enfrentar meus medos. Como os cacos de vidro de uma taça estilhaçada eu havia perdido as esperanças de mudar a realidade. Ela me encorajou ao ponto do caos existente retornar a ordem preexistente. A consertar e a mudar. Assim como minha mãe havia feito, ela mudou muito minha visão do mundo a minha volta. Me fez vencer diversos desafios e com um sorriso gratificante no seu rosto dizer "Eu te amo", frase essa muitas vezes associada a um vazio sentimento de amor, mas não quando proclamada por ela. Era palpável seu amor por mim e o meu por ela. Este amor floresceu mesmo com minha mente distorcida, cheia de ansiedade e medo. Mas mesmo uma frágil planta pode rachar o concreto e florescer como um símbolo de vitória e esperança. Dessa forma deixo aqui meus sinceros agradecimentos a Jéssica por tudo que ela fez e ainda continua fazendo por mim.

Aos professores, sempre me ensinando e me mostrando como a busca por conhecimento pode ser extremamente fascinante. Estes me fizeram adquirir um profundo amor pela pesquisa, por aquilo que irá num futuro ajudar a sociedade a prosperar, não há mérito ou aprovação imediata, mas assim como um homem planta uma semente na terra, somente o futuro poderá evidenciar o prosperar de uma

formosa árvore. Dessa forma, meus professores, meus mentores foram essenciais para o enriquecimento do meu conhecimento e para o amadurecimento de minha vida acadêmica. A professora Andreza foi a responsável por me apresentar todo esse mundo gigantesco da pesquisa e torná-lo tão interessante, tão belo, tão emocionante. E a me encorajar para não ser intimidado pelas dificuldades que se revelam constantes neste universo acadêmico. Me ensinou a ser forte e independente, a não esperar que alguém o ajude, mas que você mesmo consiga desvendar estes mistérios e vencer. Agradeço a você prof, de coração e alma. Ao professor Leandro, por ser aquele que me ensinou uma gama de conhecimentos e me proporcionou entender assuntos complexos sobre diversos espectros da ciência. Em meu curto período em seu laboratório, eu fui capaz de evoluir rapidamente no âmbito acadêmico. Aprender sobre diversos temas, equipamentos, técnicas, modelos. Sua capacidade de ensinar é realmente impressionante, assim como sua capacidade de inventar formas inusitadas para resolver problemas. Sei que ainda sou um aluno com conhecimento limitado mas espero um dia conseguir obter uma parte de sua sabedoria, montar meu próprio laboratório e despargir o conhecimento sobre aqueles que desejam obtê-lo, fomentando assim a pesquisa e a ciência assim como aqueles que eu admiro.

Aos meus amigos, que sempre estiveram comigo nos momentos lúdicos de minha vida. Sempre se divertindo, rindo e apreciando estes pequenos fragmentos de uma essência mais leve, mais voltada para esquecer todos os problemas e viver o momento. Em que podemos nos ajudar em momentos de dificuldade, mas também lembrar de nunca perder o sorriso. Agradeço imensamente a vocês por me fazerem sentir algo além das quatro paredes de um laboratório.

Para finalizar, com igual peso devo agradecer a espiritualidade. Algo que nunca imaginei me aprofundar ou me interessar. Agora estou mais focado em manter uma constância com o lado etéreo. Lentamente evoluindo e apreciando cada momento que me é oferecido. Agradeço a Eles pela proteção, orientação e por nunca me abandonarem mesmo eu negligenciando as evidências apresentadas tão fortemente em meu ser. Agradeço por tudo de coração e alma.

Aqui então deixo minhas palavras fluírem no rio das emoções, seguirem seu curso até o coração daqueles que eu desejo meu profundo agradecimento.

## Resumo

O receptor do fator de crescimento epidérmico superexpresso (EGFR) em cânceres de pulmão, mama, colo do útero e colorretal está associado a um risco aumentado de mortalidade, destacando a importância de abordagens terapêuticas direcionadas. Portanto, a terapia fotodinâmica (TFD) utilizando nanossondas bifuncionais (NB) pode aumentar a seletividade e induzir a morte celular em tumores. Isto se deve à afinidade do anticorpo monoclonal IgG cetuximabe (CX) e à capacidade do fotossensibilizador clorina e6 (ce6) de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) que induzem células tumorais à morte. Este trabalho teve como objetivo sintetizar NB que consistem em um sistema de nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com CX e ce6. Para sintetizar este sistema foi necessário modificar a estrutura do CX e ce6 utilizando carbodiimida, permitindo a funcionalização com as AuNPs. As caracterizações das NB foram realizadas utilizando as técnicas de espectroscopia UV-visível, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), espalhamento dinâmico de luz (DLS), espalhamento eletroforético da luz (ELS) e espectroscopia de fluorescência. A absorção UV-visível revelou a permanência da banda de Soret e da banda Q em 390 nm e 667 nm, respectivamente, no NB. Os espectros de FTIR mostraram vibrações referentes à estrutura da ce6 e CX que não foram alteradas durante a reação da carbodiimida e o aparecimento da banda amida formada entre os compostos. Obtendo resultados promissores em testes *in vitro* na linhagem celular MDA-MB-468. Assim, os resultados indicam que as NB sintetizadas possuem potencial para aplicação na TFD direcionada contra tumores com superexpressão de EGFR.

**Palavras-chave:** Terapia fotodinâmica; nanossonda; clorina e6; cetuximabe

## Abstract

The overexpressed epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung, breast, cervical, and colorectal cancers is associated with an increased risk of mortality, highlighting the importance of targeted therapeutic approaches. Therefore, photodynamic therapy (PDT) using bifunctional nanoprobess (NB) can enhance selectivity and induce cell death in tumors. This is due to the affinity of the monoclonal IgG antibody cetuximab (CX) and the ability of the photosensitizer chlorin e6 (ce6) to produce reactive oxygen species (ROS) that induce tumor cell death. This study aimed to synthesize NB consisting of a gold nanoparticle (AuNP) system functionalized with CX and ce6. To synthesize this system, it was necessary to modify the structure of CX and ce6 using carbodiimide, allowing functionalization with AuNPs. The characterization of NB was performed using UV-visible spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), dynamic light scattering (DLS), electrophoretic light scattering (ELS), and fluorescence spectroscopy techniques. UV-visible absorption revealed the persistence of the Soret band and the Q band at 390 nm and 667 nm, respectively, in NB. FTIR spectra showed vibrations related to the structure of ce6 and CX that were not altered during the carbodiimide reaction and the appearance of the amide band formed between the compounds. Promising results were obtained in *in vitro* tests on the MDA-MB-468 cell line. Thus, the results indicate that the synthesized NB has potential for application in PDT targeted against tumors with EGFR overexpression.

**Palavras-chave:** Photodynamic therapy; nanoprobess; chlorin e6; cetuximab

## Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura molecular da clorina e6 .....	18
Figura 2: Ilustração do confinamento quântico em um (poço), dois (fio) ou três (ponto) eixos. ....	22
Figura 3: Representação da diminuição do volume em relação ao número de átomos e espaçamento entre os orbitais de um sólido semiconductor qualquer .....	24
Figura 4: Representação do aumento da razão área superficial/volume com a diminuição do diâmetro da partícula .....	25
Figura 5: Esquema da interação de uma AuNP de diâmetro entre 1 e 1.5 nm em uma célula saudável.....	26
Figura 6: Relação entre o diâmetro das AuNPs e sua temperatura de fusão .....	27
Figura 7: Gráfico demonstrando a diminuição da condutividade térmica (eixo y) em função do diâmetro da partícula em nm (eixo x).....	28
Figura 8: Demonstração da mudança de coloração de nanopartículas de CdSe devido ao seu tamanho em função de um espectro na região do UV-visível .....	29
Figura 9: Excitação uniforme de apenas um polo (esquerda) e multipolar (direita) dos elétrons livres em nanopartículas metálicas. ....	30
Figura 10: Diminuição da banda de RPS devido ao aumento das partículas de ouro .....	31
Figura 11: Teoria do orbital molecular (TOM) para formação de ligação entre os elementos enxofre (S) e ouro (Au) .....	34
Figura 12: Primeira etapa da reação para formação do ouro monovalente e dicarboxilato de acetona.....	35
Figura 13: Segunda etapa da reação para formação do complexo intermediário e sua desproporção.....	36
Figura 14: Esquematização teórica da reação de formação de AuNPs esféricas por redução utilizando citrato .....	37
Figura 15: Representação de uma dupla camada elétrica da AuNP em uma solução qualquer.....	38
Figura 16: Representação da teoria do orbital molecular para exemplificar os estados eletrônicos tripleto e singleto dos gases oxigênio e nitrogênio. ....	40
Figura 17: Representação das orientações do momento angular de spin possíveis	

para estados eletrônicos tripleto e singleto.....	41
Figura 18: Possíveis transições eletrônicas para os diferentes orbitais moleculares e elétrons não ligantes.....	42
Figura 19: Representação de dois estados eletrônicos S1 e S2 para demonstrar o relaxamento vibracional e a conversão interna juntamente com o conceito de níveis vibracionais e rotacionais.....	43
Figura 20: Efeito da fluorescência na água tônica devido a presença da molécula quinina.....	44
Figura 21: Reação de quimioluminescência presente nas pulseiras luminescentes de festas, com exemplos de três diferentes corantes: verde, azul e amarelo esverdeado. ....	45
Figura 22: Diagrama de Perrin-Jablonski.....	46
Figura 23: Diagrama de Perrin-Jablonski com sua aplicação na produção de oxigênio singleto com finalidade de obter a morte celular.....	48
Figura 24: Reações do mecanismo tipo 1 para produção de EROs .....	49
Figura 25: Reação que envolve a produção de oxigênio singleto partindo do mecanismo tipo I .....	49
Figura 26: Representação da TOM para o estado tripleto e os possíveis estados singletos do oxigênio molecular.....	54
Figura 27: Esquema das caracterizações que foram realizadas na ce6, no CX, nos ligantes ce6 e CX, e na NS bifuncional.....	57
Figura 28: Esquemática da síntese do NHS-ester .....	58
Figura 29: Esquemática da síntese do ligante pela reação de carbodiimida.....	59
Figura 30: Esquemática da purificação do ligante após a síntese.....	60
Figura 31: Esquemática da reação de carbodiimida inicial para formação do NHS-ester .....	61
Figura 32: Esquemática da reação de carbodiimida para formação do ligante CX .....	62
Figura 33: Esquemática da purificação do ligante CX.....	63
Figura 34: Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das AuNP .....	71
Figura 35: Espectro de absorção na região do UV-visível da AuNP .....	72
Figura 36: Espectro de absorção na região do UV-visível da ce6 .....	73
Figura 37: Espectro de emissão na região do UV-visível da ce6.....	74
Figura 38: Espectro de FTIR da molécula ce6.....	75

Figura 39: Estrutura da ce6 com as denominações utilizadas na tabela X.....	76
Figura 40: Estrutura molecular do ligante ce6 com cores indicativas.....	78
Figura 41: Espectro normalizado de absorção na região do UV-visível da clorina E6 e do ligante ce6 .....	78
Figura 42: Espectro normalizado de emissão de fluorescência na região do UV-visível da clorina E6 e do linker clorina e6.....	79
Figura 43: Espectro de FTIR do ligante clorina e6.....	80
Figura 44: Espectro de absorção na região do UV-vísivel utilizando o perfil A280 do Cetuximabe e seus sobrenadantes.....	82
Figura 45: Espectro de FTIR do medicamento erbitux.....	84
Figura 46: Espectro de FTIR dos excipientes do medicamento erbitux .....	85
Figura 47: Espectros de FTIR do medicamento erbitux, excipientes do erbitux e do erbitux puificado.....	87
Figura 48: Espectro de absorção na região do UV-vísivel utilizando o perfil A280 do Cetuximabe e seus sobrenadantes.....	88
Figura 49: Espectros de absorção na região do UV-vísivel dos excipientes e os sobrenadantes do cetuximabe .....	89
Figura 50: Espectro de absorção na região do UV-vísivel utilizando o perfil A280 do linker cetuximabe e seus sobrenadantes (a) e do linker cetuximabe e seus reagentes (b).....	90
Figura 51: Espectros de FTIR do Cetuximabe, do alfa ácido lipóico e do ligante CX92	
Figura 52: Espectro normalizado de absorção na região do UV-vísivel das nanossondas bifuncional, bifuncional lavada e clorina e6 .....	93
Figura 53: Espectro normalizado de absorção na região do UV-vísivel das nanossondas bifuncional, bifuncional lavada e clorina e6 .....	94
Figura 54: Espectro normalizado de emissão de fluorescência na região do UV-vísivel das nanossondas bifuncional e clorina e6 .....	95
Figura 55: Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanossondas clorina e6 e nanossonda bifuncional .....	96
Figura 56: Espectros de FTIR da nanossonda bifuncional e da nanossonda ce6	98
Figura 57: Tempo de internalização da NB na linhagem celular MDA-MB-468	99
Figura 58: Gráfico demonstrando a redução da viabilidade celular conforme há o aumento da concentração das NB irradiadas, as NB que não foram irradiadas não apresentam mudança significativa .....	100

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Atribuições de bandas do espectro FTIR da molécula Ce6 (Mohsenian <i>et al.</i> 2019; Yeu <i>et al.</i> 2021; Pavia <i>et al.</i> 2001; Gladkova <i>et al.</i> 2020) .....	76
Tabela 2: Atribuições de bandas do espectro FTIR do ligante Ce6 (Mohsenian <i>et al.</i> 2019; Yeu <i>et al.</i> 2021; Pavia <i>et al.</i> 2001; Gladkova <i>et al.</i> 2020; Castilho <i>et al.</i> 2017) .....	80
Tabela 3: Atribuições de bandas do espectro FTIR do Erbitux (Kong <i>et al.</i> , 2007; Krimm <i>et al.</i> 1986; Gremlich, 2001; Schrader, 1995; Wartewig, 2003; Ji <i>et al.</i> 2020; Stuart 2004) .....	83
Tabela 4: Atribuições das bandas do espectro FTIR dos excipientes do Erbitux (Kong <i>et al.</i> , 2007; Krimm <i>et al.</i> 1986; Gremlich, 2001; Schrader, 1995; Wartewig, 2003; Ji <i>et al.</i> 2020; Stuart 2004) .....	85
Tabela 5: Comparação dos espectros do Erbitux <sup>®</sup> , excipientes e Cetuximabe.....	86
Tabela 6: Atribuições de bandas do espectro FTIR do ligante CX (Kong <i>et al.</i> , 2007; Krimm <i>et al.</i> 1986; Gremlich, 2001; Schrader, 1995; Wartewig, 2003; Ji <i>et al.</i> 2020; Stuart 2004).....	91
Tabela 7: Bandas características do espectro de FTIR referente à nanossonda bifuncional .....	97

## Lista de Equações

Equação 1: Energia de Fermi para férmions nas três dimensões.....	23
Equação 2: Equação de Gibbs-Thomson .....	26
Equação 3: Equação para a frequência do plasma .....	30
Equação 4: Condições para ocorrer ressonância .....	31
Equação 5: Frequência de ressonância para um metal qualquer .....	32
Equação 6: Condições e aproximação da equação 5 para esferas .....	32
Equação 7: Multiplicidade para estado singleto .....	41
Equação 8: Multiplicidade para estado tripleto.....	41
Equação 9: Absortividade molar da AuNPs por meio da aproximação de Navarro ...	63
Equação 10: Lei de Lambert-Beer .....	64
Equação 11: Transformação da dimensionalidade para partículas.L <sup>-1</sup> .....	64
Equação 12: Quantidade necessária de ce6 para recobrir uma partícula de diâmetro d .....	64
Equação 13: Concentração necessária para o recobrimento das AuNPs.....	65
Equação 14: Equação da reta para definir a concentração do ligante diluído .....	65
Equação 15: Transformação da dimensionalidade da concentração para mol.L <sup>-1</sup> .....	66
Equação 16: Fórmula da diluição .....	66
Equação 17: Fórmula para descobrir o volume necessário para recobrir 1L de AuNPs .....	66
Equação 18: Cálculo final para obter o valor de volume para recobrir 1 mL de AuNPs .....	66
Equação 19: Cálculo da atividade mitocondrial em porcentagem para ensaio de MTT .....	69
Equação 20: Cálculo da viabilidade celular em porcentagem para ensaio de TB.....	70

## Lista de Abreviaturas e Siglas

TFD: Terapia fotodinâmica

FS: Fotossensibilizador(es)

AuNPs: Nanopartículas de ouro

ce6: Clorina E6

CX: Cetuximabe

EGFR: Receptor fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*)

EGF: Fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor*)

TGF- $\alpha$ : Fator de crescimento transformador alfa (*transforming growth factor –  $\alpha$* )

NB: Nanossonda bifuncional

DLS: Espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*)

ELS: Espalhamento eletroforético da luz (*electrophoretic light scattering*)

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy*)

ISO: Organização Internacional de Normalização (*international organisation for standardisation*)

nm: nanômetros

LEDs: Diodo emissor de luz (*light-emitting diodes*)

HOMO: orbital ocupado mais energético (*highest occupied molecular orbital*)

RPS: Ressonância plasmônica de superfície

TOM: Teoria do orbital molecular

$\sigma$ : Ligação sigma

$\sigma^*$ : Ligação sigma antiligante

N.L: Elétrons não ligantes

Au<sup>3+</sup>: Ouro trivalente

Au<sup>1+</sup>: Ouro monovalente

Au<sup>0</sup>: Ouro fundamental

HpD: Hematoporfirina

LUMO: Orbital não ocupado de menor energia (*lowest unoccupied molecular orbital*)

S: Momento angular total de spin

S<sub>0</sub>: orbital molecular de maior energia ocupado singleto

S<sub>n</sub>: Estado singleto excitado qualquer

S<sub>1</sub>: Estado singleto do orbital molecular não ocupado de menor energia

T<sub>1</sub>: Estado tripleto excitado

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FR: Fenton Reaction

HWR: Haber-Weiss Reaction

HO•: Radical hidróxido

HO<sup>-</sup>: Íon hidróxido

FRAP: Recuperação da fluorescência após fotobranqueamento (*fluorescence recovery after photobleaching*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DDS: Sistema de entrega de fármacos (*drug delivery system*)

EPR: Efeito de retenção e permeabilidade aumentados (*enhanced permeability and retention effect*)

EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

Sulfo-NHS: N hydroxysulfosuccinimide

DH: Diâmetro hidrodinâmico

PZ: Potencial zeta

MTT: azul de tiazolil Brometo de tetrazólio

TB: azul de tripan

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1</b>	OBJETIVO GERAL .....	20
<b>2.2</b>	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>NANOMATERIAIS</b> .....	<b>22</b>
3.1.1	Propriedade de reatividade aumentada .....	23
3.1.2	Propriedade térmica.....	26
3.1.3	Propriedade óptica.....	28
<b>3.2</b>	<b>NANOPARTÍCULA DE OURO</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3</b>	<b>TERAPIA FOTODINÂMICA</b> .....	<b>39</b>
3.3.1	Mecanismos físicos da TFD.....	39
3.3.2	Aplicação dos mecanismos físicos.....	47
3.3.3	Espécies reativas de oxigênio.....	48
3.3.4	Fotossensibilizadores e seus medicamentos derivados ao longo da história... 50	
<b>3.4</b>	<b>NANOSSONDAS</b> .....	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>NANOPARTÍCULA DE OURO</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>LIGANTES</b> .....	<b>57</b>
4.2.1	Ligante ce6.....	58
4.2.2	Ligante CX .....	60
<b>4.3</b>	<b>NANOSSONDA</b> .....	<b>63</b>
<b>4.4</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS</b> .....	<b>67</b>
4.4.1	Análise de Espectroscopia no UV-Visível .....	67
4.4.2	Análise de emissão de fluorescência .....	67

4.4.3	Análise de DLS .....	68
4.4.4	Análise de FTIR .....	68
4.4.5	Ensaio do tempo de internalização das NB.....	69
4.4.6	Ensaio de citotoxicidade das NB e TFD .....	69
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>5.1</b>	<b>CARREADOR: NANOPARTÍCULA DE OURO.....</b>	<b>71</b>
<b>5.2</b>	<b>LIGANTES CARBODIIMIDA .....</b>	<b>73</b>
5.2.1	Ligante ce6.....	73
5.2.2	Ligante CX .....	81
<b>5.3</b>	<b>NANOSSONDAS .....</b>	<b>92</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>101</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>102</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer continua a ser um dos maiores desafios globais à saúde, representando a segunda principal causa de morte no mundo (1). Este termo abrange diferentes doenças malignas que tem em comum o crescimento exacerbado de células no organismo sendo governados majoritariamente por seus receptores (2,3). Sendo assim, o tumor maligno invade os tecidos adjacentes, podendo fazer metástase para órgãos como coração, fígado, pulmão, dentre outros. Diante da gravidade dessa doença, a busca por tratamentos mais eficazes e menos prejudiciais aos pacientes é essencial.

As terapias alternativas de tratamento do câncer, como procedimento clínico, têm sido pouco exploradas ao longo dos anos, apresentando um maior enfoque em métodos tradicionais, como a quimioterapia, radioterapia e a cirurgia. No entanto, estes tratamentos possuem inúmeras desvantagens e efeitos colaterais para o paciente (4).

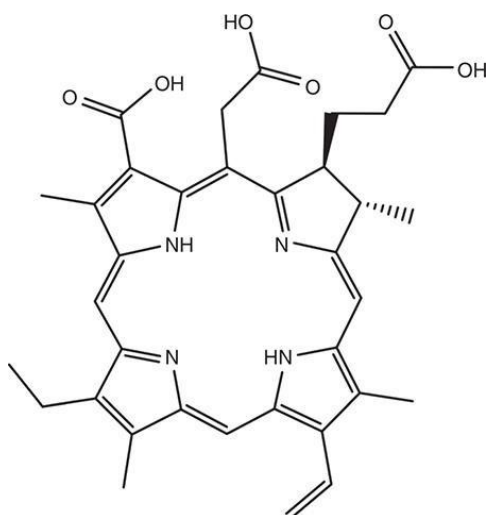
A terapia fotodinâmica (TFD) tem se destacado como forma alternativa de tratamento por apresentar poucas reações adversas e melhores resultados em alguns casos, quando comparado com a quimioterapia e a radioterapia (5). Na TFD há a necessidade da administração de fotossensibilizador (FS) por via intravenosa, oral ou tópica. Este FS para poder ser aplicado deve possuir características fotofísicas favoráveis, como: elevada taxa de produção de oxigênio singlete; alto rendimento quântico de fosforescência; baixa toxicidade na ausência de luz; fotossensibilidade não prolongada no organismo; farmacocinética favorável (adequada eliminação do corpo); alta afinidade e penetração no tecido afetado em detrimento do tecido saudável (seletividade) e principalmente, baixa agregação em soluções, preferencialmente aquosas/biológicas (6). Entretanto, nem todos os FS possuem tais características, logo a sua associação com a nanotecnologia pode contribuir para sua aplicabilidade.

Neste contexto, nanopartículas possuem a capacidade de realizar uma adsorção química ou física com os FS, esta funcionalização é capaz de conferir um aumento da solubilidade em meios aquosos/biológicos (7). Devido às propriedades físicas dos nanomateriais, nanopartículas de ouro (AuNPs)

obtiveram os melhores resultados para serem utilizadas concomitantemente com FS (8). Ainda assim, há um grande problema com a seletividade passiva da formulação, sendo necessária a utilização de uma seletividade ativa com biomoléculas como: anticorpos, aptâmeros, carboidratos, enzimas, folato, peptídeos e vitaminas (9).

A clorina e6 (ce6) (figura 1) é um FS que possui absorção na região do UV-visível do espectro eletromagnético em 660 nm, sendo portanto, capaz de absorver uma luz incidente que pode penetrar na pele com maior facilidade, pois seu comprimento de onda está dentro da janela terapêutica. Indicando que comprimentos de onda entre 600 a 1000 nm possuem uma maior penetração no tecido. Valores maiores tem maior probabilidade de serem absorvidos pelas moléculas de água e valores menores pela hemoglobina, reduzindo assim sua eficácia (10,11). Sua solubilidade é baixa em meios aquosos/biológicos, mas devido a presença de 3 grupos carboxílico na extremidade da molécula é possível realizar a reação de carbodiimida e posteriormente com um átomo de enxofre livre, funcionalizá-la com as AuNPs, aumentando assim sua solubilidade em meios aquosos/biológicos (12,13,14).

Figura 1: Estrutura molecular da clorina e6



Fonte: O autor

Cetuximabe (CX) é um anticorpo monoclonal do tipo IgG1 presente no medicamento Erbitux<sup>®</sup>, conhecido por sua alta afinidade pelo receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (15,16). Essa afinidade permite que o CX se

ligue ao EGFR das células tumorais, fazendo-o ser internalizado. J. Baselga evidenciou que o CX apresenta maior afinidade pelo EGFR em comparação com o próprio fator de crescimento epidérmico (EGF) e com o fator de crescimento transformador alfa (TGF- $\alpha$ ) (15). Além disso, o medicamento possui um processo de purificação relativamente simples, e o CX contém grupos amina que permitem sua funcionalização com AuNPs por meio da reação de carbodiimida (17).

Nanossondas bifuncionais (NB) são aquelas formulações que possuem carreadores que são funcionalizados por dois diferentes compostos. Portanto, a combinação do FS e da biomolécula funcionalizados na nanopartícula confere uma NB. Nesta dissertação, é proposta uma formulação que contém as AuNPs estabilizadas com citrato, funcionalizadas com ce6 e CX, que foi purificado a partir do medicamento Erbitux<sup>®</sup> para aplicação na TFD. A combinação desses compostos demonstra uma ação seletiva e capaz de induzir a morte de células tumorais, destacando-se como um sistema eficaz e aplicável para tratamento alternativo do câncer por meio da TFD.

As NB foram analisadas por espectrofotometria no UV-visível e espectroscopia de fluorescência para suas propriedades fotofísicas. Utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) para determinação do diâmetro hidrodinâmico da partícula, juntamente com a técnica de espalhamento eletroforético da luz (ELS) para determinação da estabilidade. A técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para determinação das ligações químicas formadas e rompidas no processo de funcionalização das NB. Por fim, ensaio de internalização e análise de atividade mitocondrial utilizando o composto MTT. (18-21).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar NB compostas de AuNPs funcionalizadas com ce6 e CX. Realizar ensaio de internalização, análise de MTT e TB in vitro na linhagem celular MDA-MB-468.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as AuNPs pelo método de redução química por citrato e caracterizar seu diâmetro hidrodinâmico e seu potencial zeta, e seu pico proveniente da ressonância plasmônica de superfície;
- Modificar a estrutura da ce6 e do CX para sintetizar os ligantes por meio da reação de carbodiimida para serem posteriormente funcionalizados na AuNPs. Caracterizá-los por FTIR para evidenciar as ligações formadas, espectrofotometria no UV-visível para demonstrar a permanência de suas características fotofísicas e, no caso específico do ligante ce6, realizar uma análise de fluorescência para evidenciar seu potencial terapêutico;
- Sintetizar as NB e caracterizá-las por espectrofotometria no UV-visível e espectroscopia de fluorescência para suas propriedades fotofísicas. Utilizando a técnica de DLS para determinação do diâmetro hidrodinâmico da partícula, juntamente com a técnica de ELS e FTIR para determinação das ligações químicas formadas e rompidas no processo de funcionalização das NB.

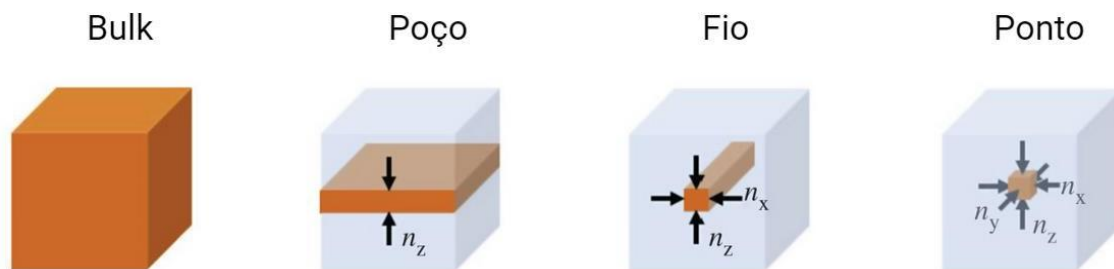
- Realizar os testes biológicos de ensaio de internalização e análise de atividade mitocondrial com o composto MTT e com o composto TB para evidenciar a capacidade de induzir morte celular das NB.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 NANOMATERIAIS

De acordo com a Organização Internacional de Normalização (ISO), materiais com dimensões na escala nanométrica estão dentro da faixa de 1 nanômetros (nm) a 100 nm. Estes materiais podem apresentar confinamentos quânticos a níveis nanométricos em uma, duas ou até três dimensões. Sendo uma dimensão denominado de poço quântico, duas dimensões fio quântico e, em todas as dimensões do espaço, ponto quântico (figura 2) (22).

Figura 2: Ilustração do confinamento quântico em um (poço), dois (fio) ou três (ponto) eixos.



Fonte: Adaptado de Edvinsson (23).

Em relação a suas aplicações, materiais com confinamento em uma única dimensão (poço quântico) podem ser utilizados como semicondutores para formação de díodo emissor de luz (LEDs) de alto desempenho e fotodetectores (24,25). Com duas dimensões de confinamento se caracteriza o fio quântico, este possui estruturas como nanofios para uma detecção de alta performance de raios-X (26), nanotubos de carbono que são utilizados em diversas áreas como eletrônica, biomedicina e como sensores químicos (27); e nanobastões que possuem utilizações voltadas para a medicina (28,29).

Os pontos quânticos são confinados em todos os eixos, sendo então todas as suas dimensões em tamanho nanométrico. Regido pela mecânica quântica por completo, estes pontos são, de uma maneira mais prática, nanopartículas esféricas e possuem uma utilização na área de tratamento de

câncer, utilizando a TFD e fototérmica como uma forma alternativa de induzir apoptose e necrose em células cancerígenas (30,31,32). Sua aplicabilidade na oncologia se dá pelo fato destes materiais possuírem propriedades singulares, que são conferidas à materiais em dimensões nanométricas, por serem regidos pelos princípios da mecânica quântica em todas as dimensões espaciais (33).

### 3.1.1 Propriedade de reatividade aumentada

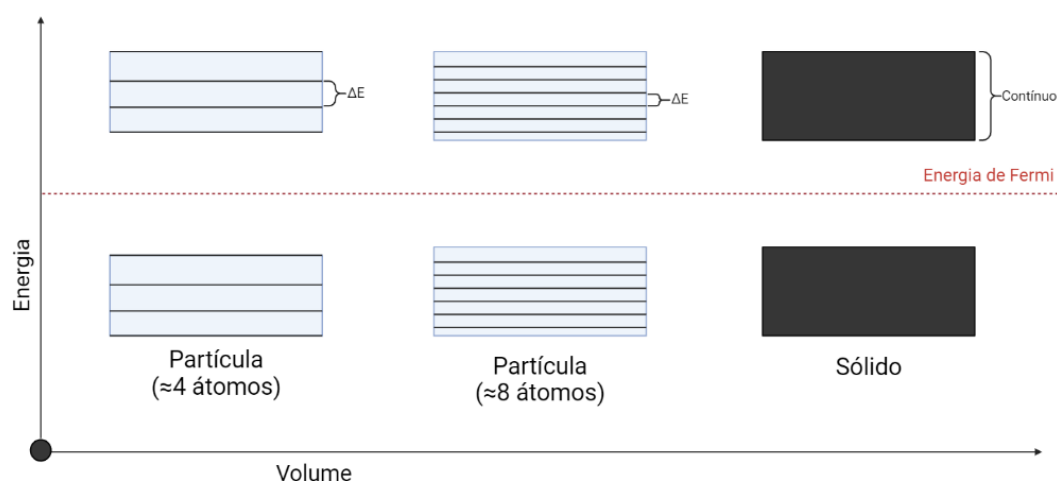
O nível de Fermi está relacionado à energia dos estados ocupados em um sistema quântico. Considerando o gás de Fermi em três dimensões, correlacionando a proporcionalidade do número de elétrons e o volume de esfera ( $V$ ), sendo  $h$  a constante de Planck,  $m$  a massa do elétron e  $N$  é o número de elétrons (34), pode-se escrever a equação 1.

Equação 1: Energia de Fermi para férmions nas três dimensões

$$\epsilon_F = \frac{h^2}{8m} \left( \frac{3N}{\pi V} \right)^{\frac{2}{3}}$$

Dado que a energia de Fermi permanece constante para um determinado material, a redução do volume da partícula implica uma diminuição no número de elétrons disponíveis, o que, por sua vez, resulta em um menor número de átomos constituindo essa partícula. Isto implica em um aumento do espaçamento entre os estados energéticos de um material. De acordo com a figura 3 é possível observar uma maior distância entre os estados energéticos conforme o número de átomos aumenta evidenciando este espaçamento energético (35).

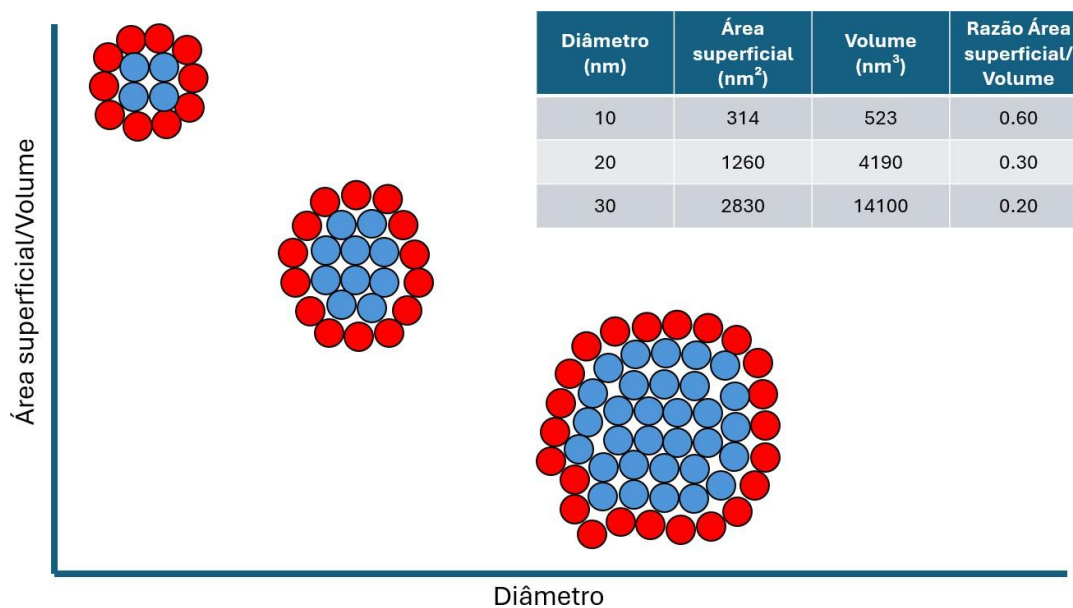
Figura 3: Representação da diminuição do volume em relação ao número de átomos e espaçamento entre os orbitais de um sólido semiconductor qualquer



Fonte: O autor

O material, portanto, apresentará menos átomos. Obtendo uma razão área superficial/volume alta, proporcionando uma reatividade maior. A figura 4 demonstra valores arbitrários para partículas de 10, 20 e 30 nm em relação com sua razão área superficial/volume. Como a reatividade está relacionada diretamente com a energia do sistema, pode-se afirmar que átomos na superfície possuem uma energia maior que os átomos que estão no centro do material, desta forma buscando interações que façam sua energia diminuir, preenchendo seus orbitais vazios e conseqüentemente estabilizando a molécula como um todo. Esta interação é bem conhecida na química, onde ao aumentar a razão área superficial/volume haverá um aumento na reatividade daquele composto (36).

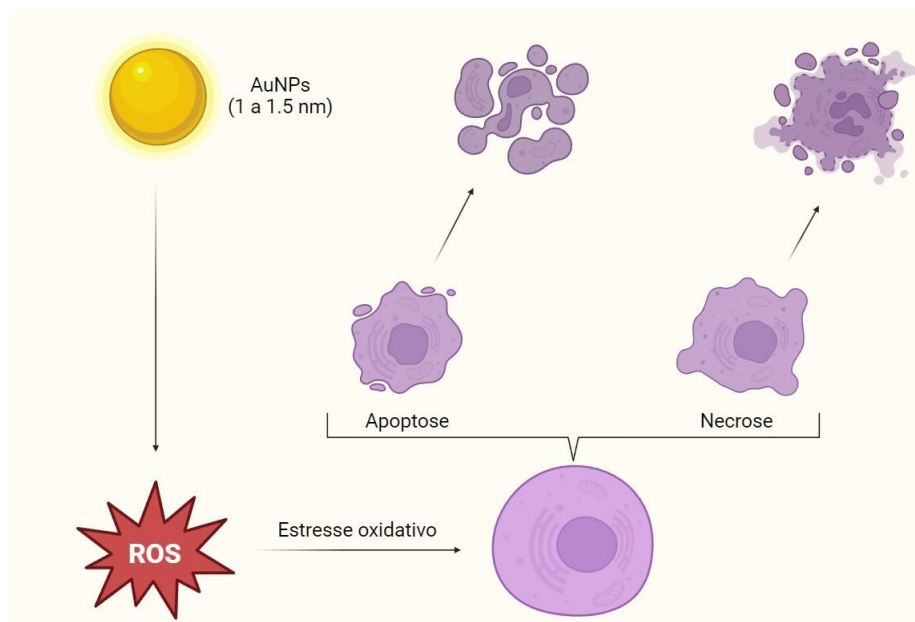
Figura 4: Representação do aumento da razão área superficial/volume com a diminuição do diâmetro da partícula



Fonte: O autor

Neste contexto, as AuNPs têm um aumento de reatividade em função do da diminuição do diâmetro. Teste *in vivo* mostraram que diâmetros de 1,0 a 1,5 nm (35,36) apresentam toxicidade acentuada, podendo ser até 100 vezes mais tóxicas que partículas com diâmetros de 15 nm (38). Teoricamente, independentemente do diâmetro, as capacidades oxidativas destas partículas deveriam realizar uma morte programada da célula ao presenciarem um estresse oxidativo acentuado (figura 5) (39). No entanto, é observado que partículas maiores que 10 nm não causam danos significativos às células. A hipótese mais aceita é que as nanopartículas de ouro (AuNPs) induzem estresse oxidativo, e as células, para evitar a morte celular, utilizam vias autofágicas (40). Nesse processo, as AuNPs são envoltas por uma membrana dupla, formando um autofagossomo, que transporta esse material para os lisossomos, onde é degradado, atuando assim como um mecanismo de sobrevivência celular. Como a reatividade das AuNPs com diâmetro maior que 10 nm não é suficientemente elevada para bloquear essas vias autofágicas, não é observado morte celular.

Figura 5: Esquema da interação de uma AuNP de diâmetro entre 1 e 1.5 nm em uma célula saudável ou cancerígena



Fonte: O autor

### 3.1.2 Propriedade térmica

A diminuição do ponto de fusão das partículas ocorre devido à redução no número de interações intermoleculares na superfície das mesmas à medida que seu tamanho diminui. Com menos átomos interagindo na superfície, é necessária uma quantidade menor de energia para romper as interações do nanomaterial em comparação com o macroscópico. (41). Esta mudança pode ser evidenciada pela equação de Gibbs–Thomson descrita pela equação 2:

Equação 2: Equação de Gibbs-Thomson

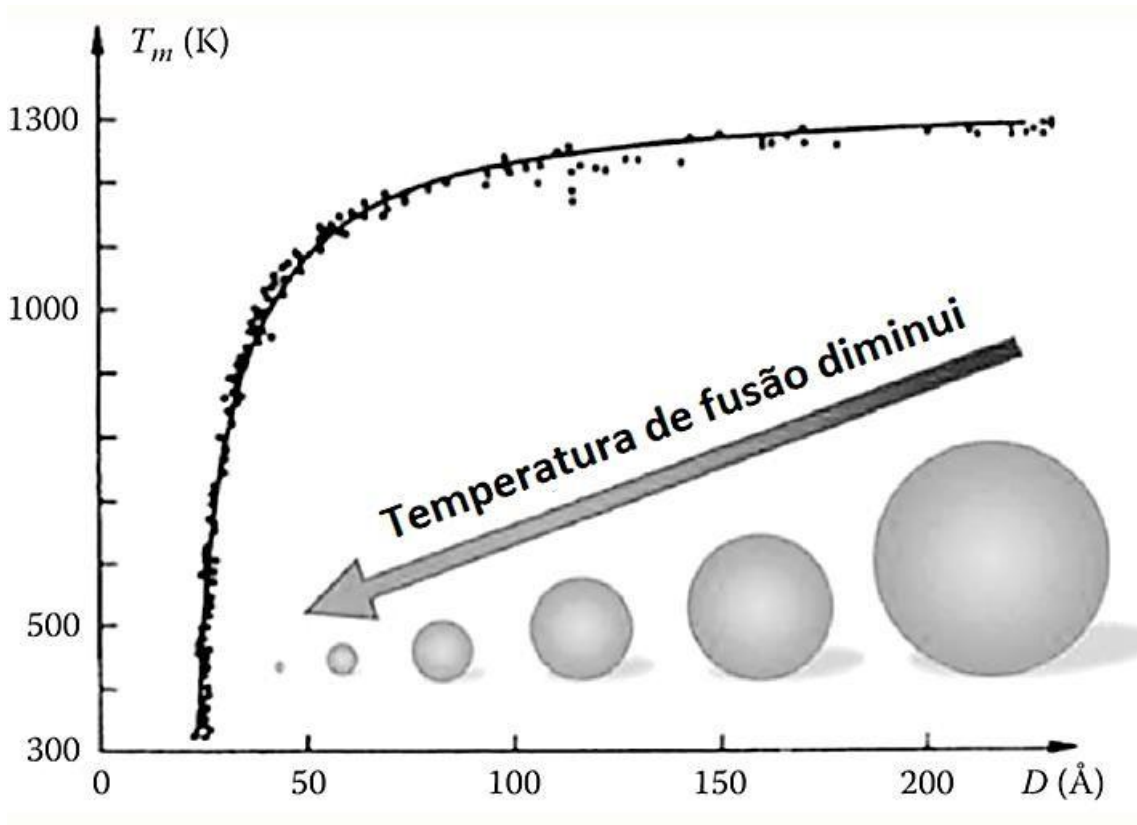
$$T_F(d) = T_{FM} \left( 1 - \frac{4\sigma_{sl}}{H_{cf} \rho_s d} \right)$$

onde  $T_F$  é a temperatura de fusão da partícula em um determinado diâmetro,  $T_{FM}$  é a temperatura de fusão do material macroscópico,  $\sigma_{sl}$  energia de interface sólido-líquido,  $H_{cf}$  é o calor latente de fusão,  $\rho_s$  é a densidade do sólido,  $d$  que é o diâmetro da partícula (42). Portanto, ao diminuir o diâmetro da partícula, tem-

se um número cada vez menor multiplicando o  $T_{FM}$ , conseqüentemente uma menor  $T_F$ .

A figura 6 demonstra uma relação do diâmetro das AuNPs com sua temperatura de fusão.

Figura 6: Relação entre o diâmetro das AuNPs e sua temperatura de fusão

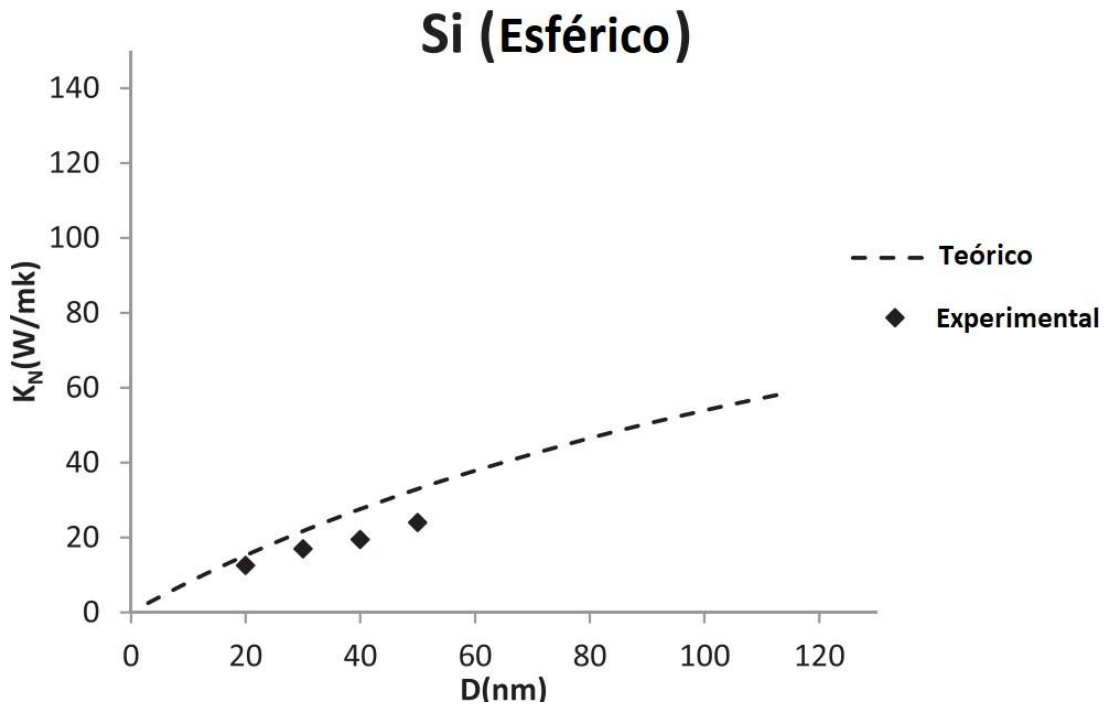


Fonte: Adaptado de Yang, Wong e Yuen (42).

Outro fator é a diminuição da condutividade térmica dos nanomateriais por conta do espalhamento dos fónons. Fónons são vibrações que se encontram na rede cristalina de um material. O espalhamento de fónons ocorre quando os átomos das nanoestruturas estão confinados e, dessa forma, limitados para vibrar na rede cristalina. Devido ao aumento da razão área superficial/volume, há uma maior probabilidade de ocorrer o espalhamento dos fónons provenientes da superfície e esta interação fónon-fónon acaba dificultando a transferência de calor do material (43). Komal e Monika (44) realizaram um estudo teórico com referências empíricas para construir a relação do diâmetro com a condutividade

térmica. A figura 7 apresenta um gráfico evidenciando esta relação utilizando uma partícula esférica de silício como exemplo., concluindo a perda da condutividade com a redução do diâmetro das nanoestruturas.

Figura 7: Gráfico demonstrando a diminuição da condutividade térmica (eixo y) em função do diâmetro da partícula em nm (eixo x)



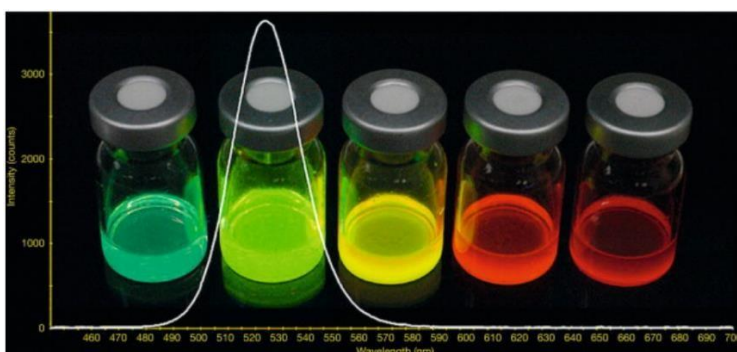
Fonte: Rawat e Goyal (44).

### 3.1.3 Propriedade óptica

As nanoestruturas podem apresentar mudanças de suas propriedades ópticas em função do tamanho. Dentre estes destaca-se as nanoestruturas de materiais semicondutores, que começam a interagir com fótons por meio da absorção na região do UV-visível, uma vez que a diminuição de seu tamanho dá origem ao confinamento quântico, que resulta em um aumento da banda proibida do material, deslocando a absorção para comprimentos de onda menores (*blueshift*) e, conseqüentemente, para energias maiores (45,46). Esse fenômeno de confinamento quântico e o aumento da banda proibida explicam a mudança de cor que ocorre em alguns materiais, conforme suas dimensões são reduzidas. Por exemplo, o seleneto de cádmio é um material inorgânico que apresenta uma

coloração preta ou vermelho-escuro, mas à medida que seu tamanho decresce, sua coloração pode variar de azul a vermelho (figura 8) (47). Essa variação em toda a região do UV-visível ocorre em virtude do confinamento quântico, ao reduzir o tamanho do material, permite que comprimentos de onda menores sejam absorvidos, resultando em uma mudança completa no espectro de absorção do material.

Figura 8: Demonstração da mudança de coloração de nanopartículas de CdSe devido ao seu tamanho em função de um espectro na região do UV-visível



Fonte: Mohammad Azad Malik (47).

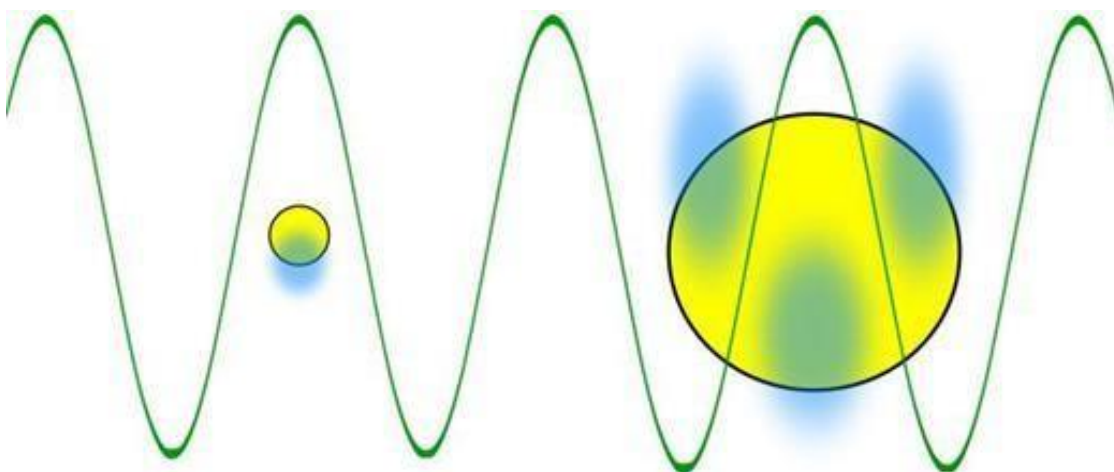
Materiais condutores também apresentam mudanças na banda proibida em função da alteração do tamanho, devido ao confinamento quântico. Contudo, a principal causa da mudança de coloração em dimensões nanométricas destes materiais é a ressonância plasmônica de superfície (RPS) (48). Quando um campo eletromagnético interage com uma nanopartícula condutora, ocorre uma oscilação dos elétrons livres confinados na superfície do material. Essa oscilação de cargas positivas e negativas, induzida pelo campo eletromagnético incidente, dá origem à separação de cargas e induz um momento de dipolo, um fenômeno análogo ao comportamento de plasmas. A frequência de oscilação desse dipolo (frequência do plasma), será amplificada quando coincidir com a frequência da onda eletromagnética interagindo com o material em dimensões de interferência, fenômeno conhecido como ressonância. A frequência do plasma é dada pela equação 3:

Equação 3: Equação para a frequência do plasma

$$\omega_p = \sqrt{\frac{N e^2}{\epsilon_0 m}}$$

sendo  $\omega_p$  a frequência do plasma formado na superfície da nanopartícula,  $N$  a densidade de elétrons,  $e$  a carga elementar do elétron,  $\epsilon_0$  a constante de permissividade no vácuo,  $m$  a massa do elétron. Para que os elétrons oscilem em ressonância é necessário que a partícula seja muito menor que a onda eletromagnética incidente, esta oscilação ocorrerá uniformemente em toda a partícula. A figura 9 demonstra de forma esquematizada que partículas  $\geq 100$  nm acabam possuindo diferentes polos de oscilação, além do alargamento da banda no espectro devido a elétrons oscilando em diferentes frequências (49).

Figura 9: Excitação uniforme de apenas um polo (esquerda) e multipolar (direita) dos elétrons livres em nanopartículas metálicas.

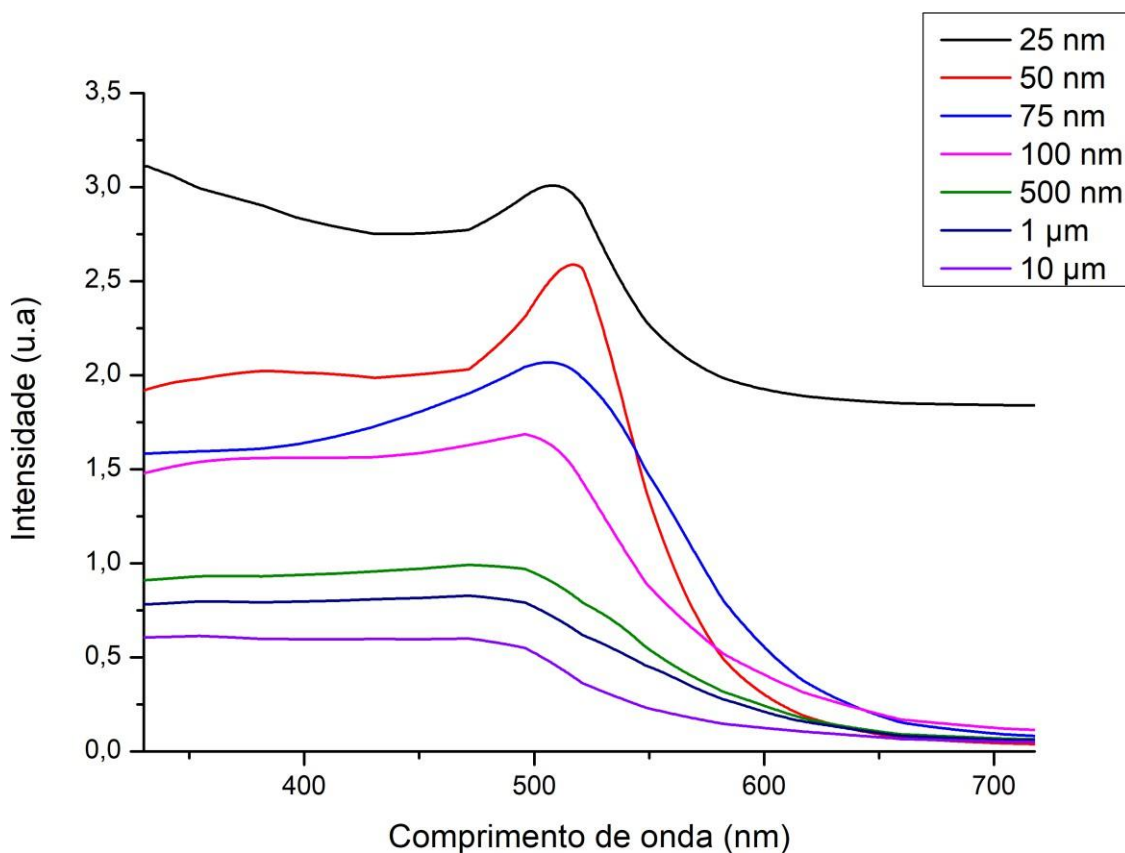


Fonte: Locarno e Brinks (52).

A figura 10 demonstra a diminuição da intensidade da banda do coeficiente de absorção conforme há um aumento do diâmetro da partícula. Quando o diâmetro atinge o valor de 500 nm é possível observar que sua banda de ressonância é praticamente negligente, isto ocorre por conta do tamanho da partícula ser praticamente do tamanho da onda incidente na qual seria realizado a ressonância, causando assim diferentes polos e tornando a banda cada vez mais

larga e com menos alterações significativas em sua vibração característica. A figura 10 foi plotada utilizando os dados do programa MiePlot v462, na qual realiza aproximações matemáticas para obtenção de valores de coeficiente de extinção, coeficiente de espalhamento e coeficiente de absorção. Seus parâmetros foram alterados para: esferas de ouro de diâmetro variável, monodispersas e imersas em um meio aquoso com índice de refração referente a 25°C.

Figura 10: Diminuição da banda de RPS devido ao aumento das partículas de ouro



Fonte: O autor

Levando em consideração que, para a intensidade da polarização aumentar e formar um momento de dipolo consistente, a condição de ressonância precisa obedecer às seguintes considerações em uma dada direção:

Equação 4: Condições para ocorrer ressonância

$$Re[\epsilon_m(\omega_{ress})] = -\frac{1-L_i}{L_j} \epsilon_h, \quad Im[\epsilon_m(\omega_{ress})] \approx 0$$

sendo  $\epsilon_m$  a constante dielétrica do metal,  $\omega_{ress}$  a frequência da ressonância plasmônica,  $L_j$  o fator de despolarização relacionado à morfologia da partícula,  $\epsilon_h$  é a constante dielétrica do meio na qual a partícula está imersa. Portanto, a frequência de ressonância tem dependência na forma geométrica da nanopartícula, assim como no meio dielétrico no qual ela está imersa. Lembrando que a parte real de uma onda eletromagnética está relacionada com a sua interação construtiva, seja ela espalhamento, reflexão ou refração. Já a parte imaginária é relacionada com as perdas de energia da onda eletromagnética. Uma fórmula generalizada de um metal qualquer pode ser descrita na equação 5:

Equação 5: Frequência de ressonância para um metal qualquer

$$\omega_{ress} \approx \frac{\omega_p}{\sqrt{\epsilon_{m,\infty} + \frac{1-L_j}{L_j} \epsilon_h}}$$

No caso de esferas, há uma igual contribuição para cada dimensão espacial (x,y,z), portanto sua despolarização se torna  $L_j = 1/3, \forall j$  (50, 51), a equação acima será reduzida para:

Equação 6: Condições e aproximação da equação 5 para esferas

$$Re[\epsilon_m(\omega_{ress})] = -2\epsilon_h, \quad Im[\epsilon_m(\omega_{ress})] \approx 0, \\ \omega_{ress} \approx \frac{\omega_p}{\sqrt{\epsilon_{m,\infty} + 2\epsilon_h}}$$

Na região do UV-visível, esta equação só pode ser satisfeita por poucos materiais. Para ocorrer a ressonância, a parte imaginária (referente as perdas de energia) precisa ser necessariamente baixa, ou seja, sua constante dielétrica precisa ser baixa. Por este motivo materiais metálicos condutores são excelentes para gerar a RPS, como: ouro, prata e cobre (52).

As AuNPs se destacam por possuírem uma RPS na região do UV-visível com alta absorção dada a sua alta condutividade (baixa constante dielétrica),

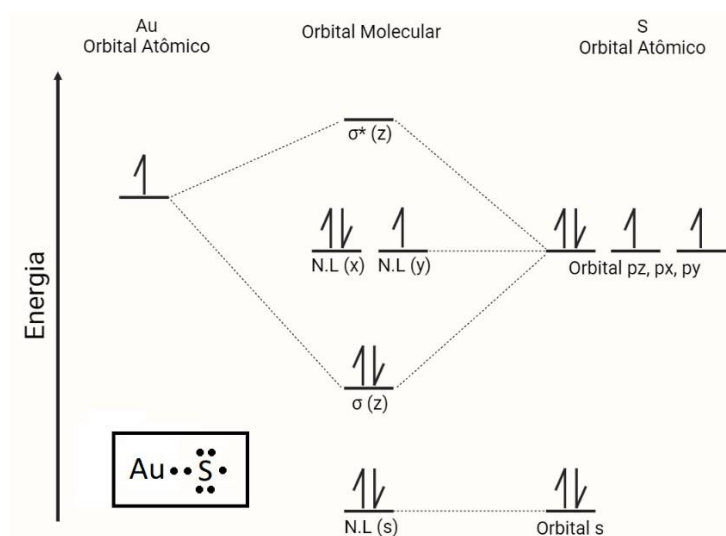
obtendo uma parte imaginária próxima a zero e pelo fato de sua constante dielétrica em água proporcionar uma ressonância em regiões próximas ao vermelho (53).

### 3.2 NANOPARTÍCULA DE OURO

As AuNPs esféricas possuem propriedades singulares, que pode ser aplicada em diversas áreas da química, ciência dos materiais, física e medicina (50). Suas propriedades físicas de magnetização e condução elétrica são pouco exploradas, pois são inferiores em relação a outros nanomateriais (54). Por outro lado, as propriedades térmicas em virtude da RPS têm se mostrado eficiente em terapias para indução de morte de células tumorais (55). Entretanto, as propriedades ópticas é o diferencial das AuNPs. Por pertencer aos metais nobres, elas absorvem frequências de ressonância na região do UV-visível, o que facilita tanto a identificação visual por meio de sua coloração, quanto uma distinção precisa de seu espectro de absorção (52).

AuNPs tem uma boa afinidade química com elementos do grupo 16 da tabela periódica, evidenciando sua capacidade de funcionalização. O ouro possui configuração eletrônica dos elétrons mais externos ao núcleo de  $6s^15d^{10}$ , tendo a possibilidade de formar uma ligação covalente com átomos, como o enxofre (grupo 16) que possui uma configuração eletrônica de  $3s^23p^4$ . Portanto, de acordo com a teoria do orbital molecular (TOM), o orbital atômico do ouro (s) realiza uma sobreposição em relação ao eixo z do orbital p do enxofre ( $p_z$ ), formando uma sobreposição adequada para a formação de uma ligação sigma ligante ( $\sigma$ ) e antiligante ( $\sigma^*$ ) (Figura 11). Os elétrons não ligantes (N.L) estão no mesmo nível de energia na qual iniciaram, pois não ofereceram uma sobreposição adequada para a formação de uma ligação química. Com base nesta teoria, o enxofre possui a capacidade de se ligar a outro elemento, formando estruturas Au-S-R, sendo R uma cadeia qualquer (56).

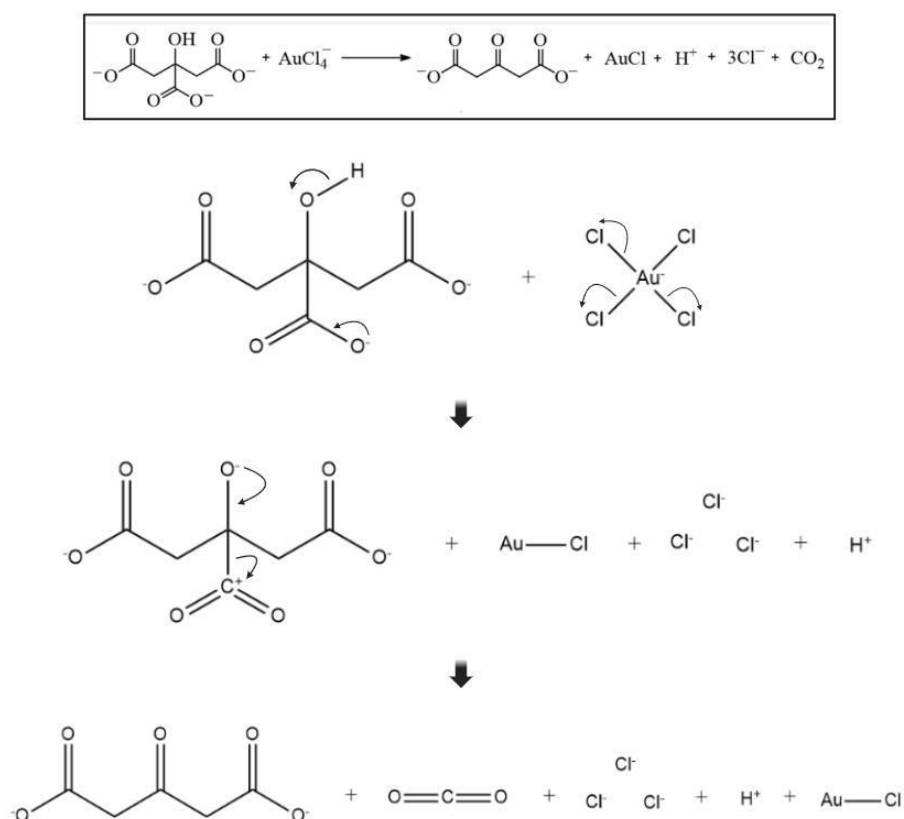
Figura 11: Teoria do orbital molecular (TOM) para formação de ligação entre os elementos enxofre (S) e ouro (Au)



Fonte: O autor

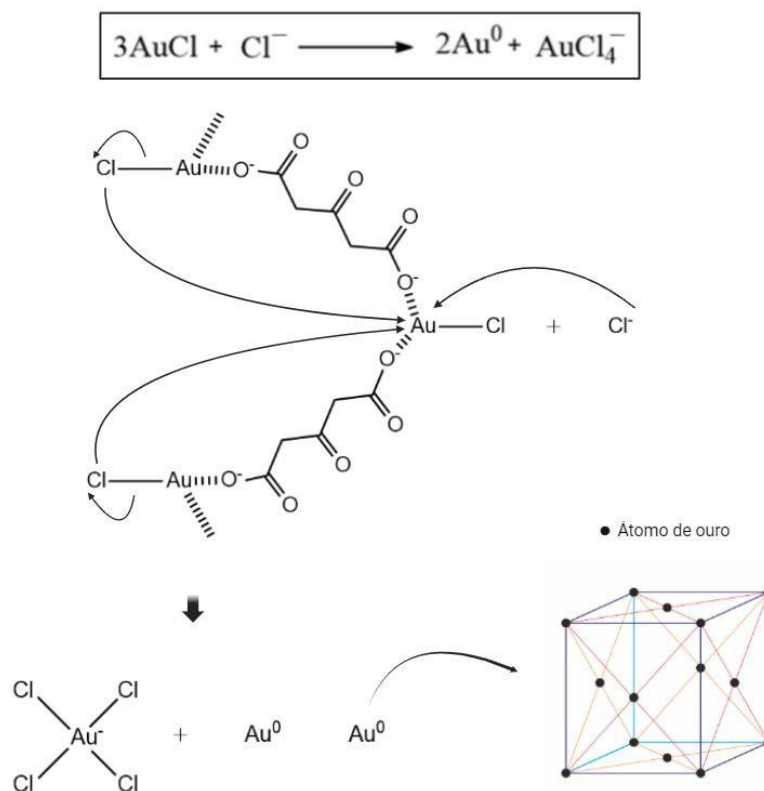
A reação de síntese das AuNPs e seus mecanismos são notoriamente estudados em diversos trabalhos acadêmicos (57-60). A síntese mais descrita utiliza o método de Turkevich (61), que vem sendo modificada e adaptada por outros pesquisadores (62,63). Esta reação consiste na redução do ouro trivalente para formar o ouro fundamental pela ação do citrato de sódio. Na primeira etapa desta reação, o ouro trivalente ( $\text{Au}^{3+}$ ) proveniente do cloreto de ouro (III) ( $\text{AuCl}_4^-$ ) será reduzido a ouro monovalente ( $\text{Au}^{1+}$ ), simultaneamente o citrato será oxidado para dicarboxilato de acetona. A figura 12 demonstra o mecanismo da reação da primeira etapa, os reagentes sendo o cloreto de ouro (III) e o íon citrato e os produtos formados como o dicarboxilato de acetona, dióxido de carbono, íon  $\text{H}^+$ , íon  $\text{Cl}^-$  e cloreto de ouro (I).

Figura 12: Primeira etapa da reação para formação do ouro monovalente e dicarboxilato de acetona



Na segunda etapa da reação (figura 13), segundo Turkevich *et al.* (61) e Abid (64), o dicarboxilato de acetona funcionam como agente organizador, formando um complexo com o cloreto de ouro (I). Este complexo pode ser formado com apenas a interação de duas moléculas de dicarboxilato de acetona com o cloreto de ouro (I) (59). Após a formação deste complexo, as três moléculas de cloreto de ouro (I) irão reagir com apenas um íon de cloreto, realizando uma reação de desproporção, formando o ouro fundamental e o cloreto de ouro (III). Reações de desproporção são aquelas nas quais o composto sofre redução e oxidação ao mesmo tempo. Sendo assim, o ouro monovalente ( $\text{Au}^{1+}$ ) se tornou ouro fundamental ( $\text{Au}^0$ ) e ouro trivalente ( $\text{Au}^{3+}$ ).

Figura 13: Segunda etapa da reação para formação do complexo intermediário e sua desproporção

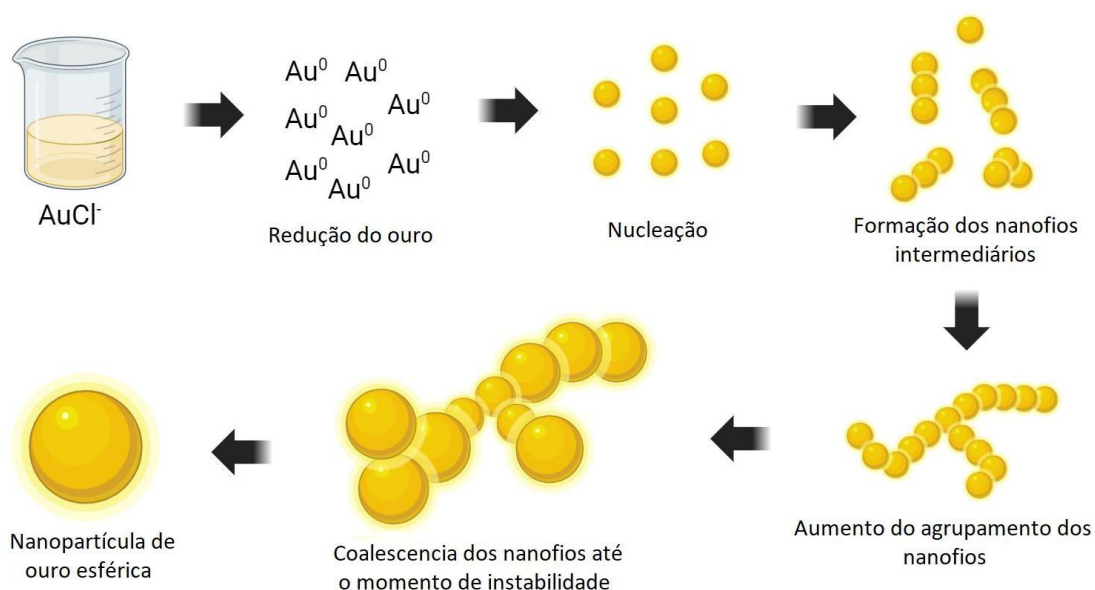


Fonte: O autor

Durante o processo de síntese, é possível observar uma mudança de coloração da solução devido a morfologia e o tamanho das partículas alterarem durante a síntese, mudando assim sua frequência de RPS. Inicialmente, a solução de cloreto de ouro III possui uma cor amarela, mas ao adicionar o citrato há uma redução do ouro trivalente para o ouro fundamental, causando a mudança do amarelo para uma solução transparente. Após a redução, este ouro fundamental irá sofrer o processo de nucleação, onde os átomos irão se agrupar e se rearranjar em um padrão de estrutura cristalina. No caso do ouro, temos geralmente a formação da célula unitária cúbica de face centrada (figura 13) e são caracterizados como pequenos grupos de aglomerados. Depois deste processo de nucleação, há o crescimento destes aglomerados por meio de coalescência até atingirem um agrupamento em forma de nanobastões, sendo esta uma etapa intermediária na formação e estabilização das AuNPs. A rápida mudança de cor de transparente para um azul bem escuro está relacionada a

esta etapa, onde os nanobastões são formados, gerando a cor azul escuro, e rapidamente sofrem coalescência até atingirem a instabilidade e reagrupados para nanopartículas esféricas, sendo estabilizadas eletrostaticamente pelo citrato. A figura 14 demonstra o diagrama teórico da formação das nanopartículas, por meio dos processos de coalescência, nucleação e clivagem dos nanofios formados na reação (57).

Figura 14: Esquemática teórica da reação de formação de AuNPs esféricas por redução utilizando citrato



Fonte: O autor

Ao aumentar o número do agrupamento de nanofios por coalescência, a solução torna-se mais escura e, ao perder estabilidade, se rompe em pequenos aglomerados esféricos, dando origem a coloração avermelhada na qual as AuNPs estarão estáveis eletrostaticamente (58).

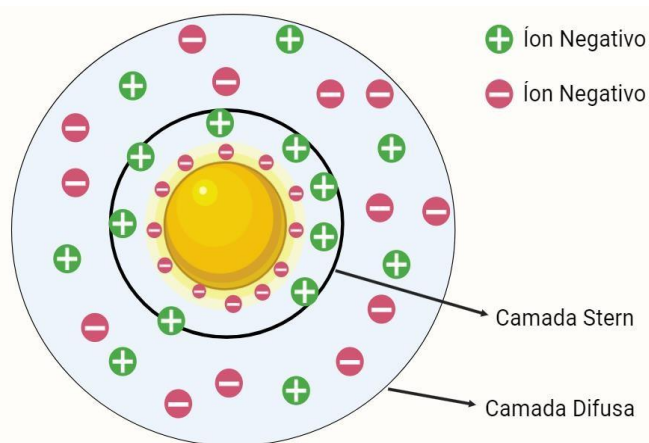
A estabilização coloidal das partículas envolve a criação de um mecanismo de repulsão eficiente, sendo capaz de superar as forças de interações intermoleculares presentes na solução, evitando assim a aglomeração das partículas. Existem dois tipos principais de estabilização, ou mecanismos de repulsão: a estabilização eletrostática e a estabilização estérica.

Em uma solução coloidal, a superfície da partícula é recoberta por moléculas depositadas em virtude da ação de forças intermoleculares. Esta

distribuição de cargas dá origem a uma diferença de potencial entre a superfície da nanoestrutura e as moléculas não ligadas, podendo assumir um valor positivo ou negativo. No caso das nanopartículas de ouro (AuNPs), o citrato adsorvido confere uma carga negativa. Assim, a camada adjacente à superfície da partícula é conhecida como camada de Stern, composta por contra-íons (com carga oposta à carga superficial), atraídos em virtude da força eletrostática. Mais externamente a partícula ainda existe uma outra camada denominada de camada de dispersão. Essa camada contém íons livres, tanto positivos quanto negativos, com uma maior concentração de contra-íons próximos à partícula. À medida que a distância em relação à partícula aumenta, a concentração de contra-íons diminui gradualmente. A figura 15 apresenta uma representação das camadas Stern e difusa, e a predominância das cargas negativas provenientes dos íons do citrato de sódio e a existência de cargas parciais positivas de moléculas como a água, com uma AuNPs no centro da figura.

A repulsão eletrostática ocorre quando as duplas camadas elétricas ao redor de duas partículas se aproximam a uma distância em que essas camadas começam a se sobrepor. Nesse ponto, a repulsão eletrostática entre as partículas evita a agregação, promovendo a estabilização da dispersão (65).

Figura 15: Representação de uma dupla camada elétrica da AuNP em uma solução qualquer



Fonte: O autor

A repulsão estérica é produzida por moléculas com cadeias longas adsorvidas na superfície de uma partícula, geralmente polímeros ou surfactantes. A espessura da camada formada deve apresentar uma distância

tal que ao interagir, resulte em uma repulsão intensa entre as cadeias longas do adsorvido. Esta repulsão estérica é eficaz na estabilização de dispersões coloidais contra agregação. A combinação da repulsão eletrostática e estérica pode ocorrer, por exemplo, ao usar misturas de surfactantes iônicos e polímeros não iônicos ou ao usar polieletrólitos. Este mecanismo de estabilização é conhecido como eletroestérico (66).

### 3.3 TERAPIA FOTODINÂMICA

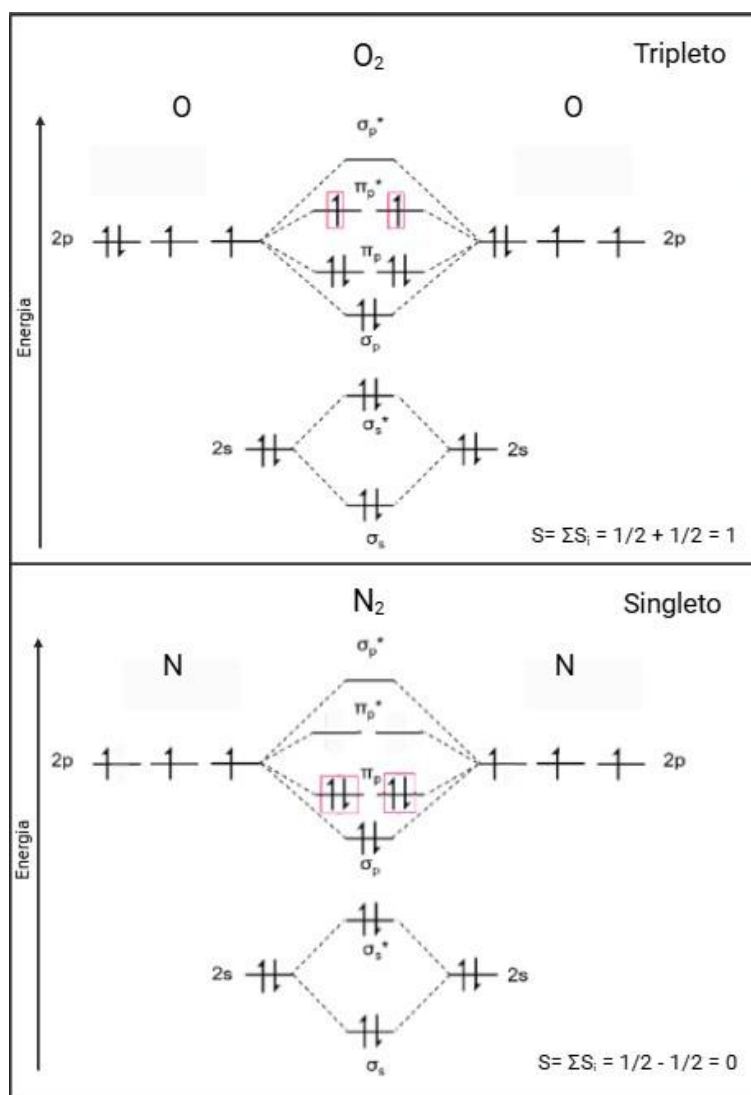
A Terapia Fotodinâmica (TFD) tem se destacado como um dos mais importantes tratamentos alternativos utilizados no combate de doenças tóxicas: neoplásicas, herpes, doenças bacterianas, fúngicas e tratamentos odontológicos (67). Em 1961, pode-se destacar os achados de Lipson e Baldes, quando escolheram quinze pacientes com diferentes tipos de câncer e lhes administraram um derivado de hematoporfirina (HpD), via intravenosa. Eles observaram que os tecidos tumorais contendo HpD emitiam fluorescência, quando expostos a ondas eletromagnéticas na região do vermelho (68). Esta radiação combinada com a presença do HpD permitia o tratamento do tumor, por meio da afinidade química com o tecido tumoral e a fototoxicidade (69). Então o HpD, posteriormente foi classificado como um fotossensibilizador (FS) de primeira geração, dando início a um tratamento alternativo do câncer, a TFD.

#### 3.3.1 Mecanismos físicos da TFD

Nos processos físicos de excitação, há dois orbitais que são levados em consideração: o orbital ocupado de maior energia (HOMO) e, o orbital não ocupado de menor energia (LUMO). Ambos se referem ao estado fundamental de uma molécula. Portanto, quando dois elétrons de spins opostos sofrem uma excitação para o HOMO, em princípio eles não sofrerão alteração na orientação do seu spin. Então, seu momento angular total de spin ( $S$ ) permanecerá com valor de 0. Tendo em vista, que  $S$  é calculado pelo valor fixo do número quântico de spin para férmions de  $\frac{1}{2}$ . ( $-1/2$  para uma orientação oposta do momento angular), sendo assim, um estado eletrônico singleto teria um momento angular

total de spin com valor de 0 ( $S = \sum S_i = 1/2 - 1/2 = 0$ ) sendo dois spins de orientações opostas. De forma análoga, spins de mesmas orientações teriam um valor de S de 1 ( $S = \sum S_i = 1/2 + 1/2 = 1$ ). Sendo representados pela TOM na figura 16 ambos os valores de S para a molécula O<sub>2</sub> e para N<sub>2</sub> (70,71,72).

Figura 16: Representação da teoria do orbital molecular para exemplificar os estados eletrônicos tripleto e singleto dos gases oxigênio e nitrogênio.



Fonte: O autor

A multiplicidade se refere as possíveis orientações do momento angular de spin de um elétron. O valor de multiplicidade do estado singleto, onde  $S = 0$ , temos:

Equação 7: Multiplicidade para estado singleto

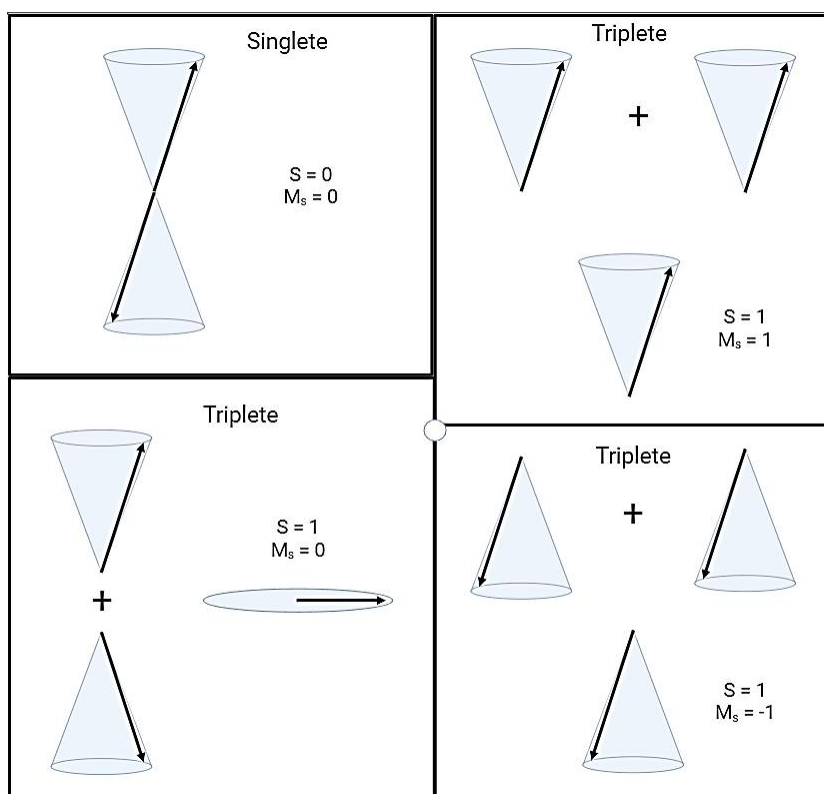
$$M = 2S + 1 = 1$$

Portanto, o estado singleto possui apenas uma única orientação de seu momento angular de spin. Agora o estado eletrônico tripleto possui três orientações de momento angular (figura 17), tendo em vista que seu  $S = 1$  (71):

Equação 8: Multiplicidade para estado tripleto

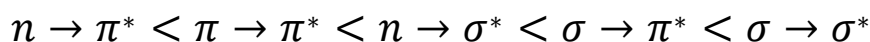
$$M = 2S + 1 = 3$$

Figura 17: Representação das orientações do momento angular de spin possíveis para estados eletrônicos tripleto e singleto.



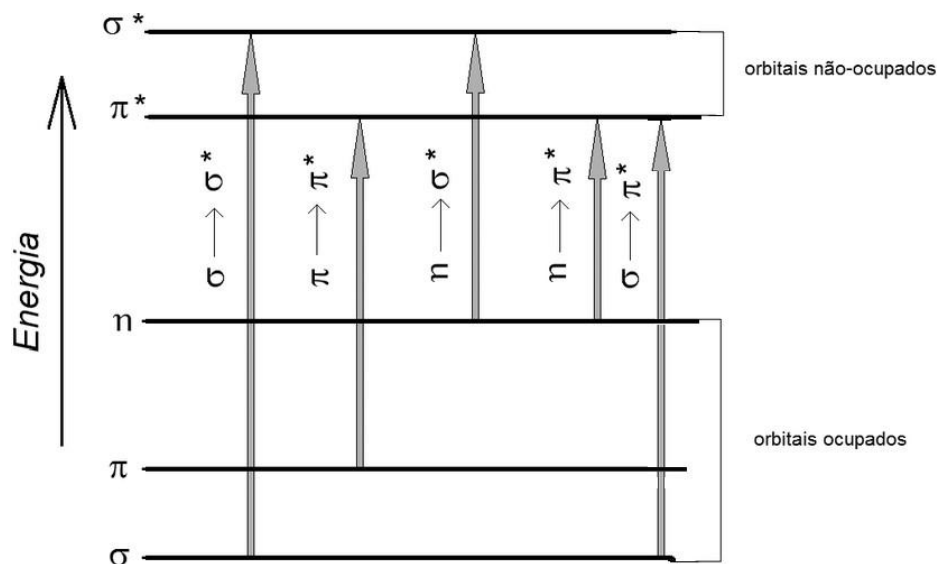
Fonte: O autor

Quando os elétrons absorvem fótons, eles são excitados para o LUMO, e posteriormente irão liberar esta energia retornando para o HOMO. Inicialmente, a molécula absorve a radiação incidente de comprimento de onda específico, ocasionando transições eletrônicas, sendo sua ordem energética descrita abaixo (73):



Sendo  $n$  elétrons não ligantes,  $\pi$  são ligações provenientes da sobreposição do eixo  $x$  e  $y$  dos orbitais do subnível  $p$ ,  $d$  e  $f$ ;  $\sigma$  são ligações provenientes de sobreposições frontais (axiais) de orbitais  $s$ ,  $p_z$ ,  $d_z$ ,  $f_z$ .  $\pi^*$  e  $\sigma^*$  são LUMO, sendo muitas vezes relacionados aos orbitais antiligantes. A figura 18 apresenta o diagrama das transições eletrônicas, de acordo com seu orbital de origem e a diferença entre as energias envolvidas em cada transição (74).

Figura 18: Possíveis transições eletrônicas para os diferentes orbitais moleculares e elétrons não ligantes.

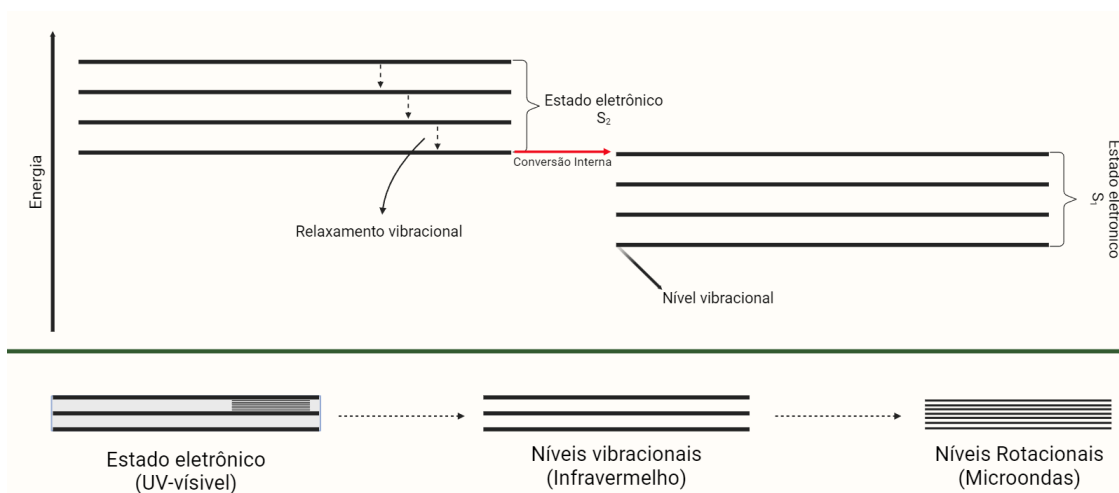


Fonte: O autor

Após o fóton ser absorvido, o elétron tem probabilidade de ser excitado e ao decair para estados eletrônicos mais baixos, realizará um relaxamento vibracional. Neste relaxamento, parte da energia absorvida tem a probabilidade de ser convertida em vibração e colisão entre as moléculas, dispersando a energia do sistema. Posteriormente, liberando energia em comprimentos de onda na região do infravermelho até atingir o nível vibracional mais baixo daquele estado eletrônico. Quando atingir este nível, ele então realizará um processo de conversão interna. Processo este onde o elétron irá transicionar não radioativamente (sem emissão de fótons) de um nível vibracional mais baixo de

seu estado eletrônico atual para um nível vibracional  $n$  de um estado eletrônico de menor energia, mantendo assim uma transição isoenergética entre estados eletrônicos de mesma multiplicidade. A figura 19 demonstra um diagrama de energia ilustrando a transição interna de  $S_2$  para  $S_1$ , com seu devido relaxamento vibracional, dando ênfase as características do estado eletrônico e seus diversos níveis vibracionais e, ressaltando que entre os níveis energéticos dos estados vibracionais existem os níveis rotacionais (71,75). A diferença entre os níveis de energia de uma mesma interação física está associada a um comprimento de onda em uma região específica do espectro eletromagnético, sendo está descrita entre parênteses na figura 19.

Figura 19: Representação de dois estados eletrônicos  $S_1$  e  $S_2$  para demonstrar o relaxamento vibracional e a conversão interna juntamente com o conceito de níveis vibracionais e rotacionais.



Fonte: O autor

Do estado eletrônico  $S_1$  para  $S_0$ , há uma distância (*gap*) de energia muito acentuado. Então para transições eletrônicas entre estes estados há a emissão de fótons. Portanto, conversão interna do nível eletrônico  $S_1$  para  $S_0$  acompanhada da emissão de fótons é chamada de fluorescência. A fluorescência possui uma energia sempre menor que a energia de absorção, tendo em vista que parte desta energia é perdida em forma de vibrações moleculares. Um exemplo prático da emissão de fluorescência é nos sinais e placas de trânsito que ficam luminescentes com a luz dos faróis, já que eles excitam as moléculas e imediatamente há o surgimento de luz pelas placas. Este fenômeno imediatamente cessa com a ausência de luz, já que a fluorescência é

um processo de alta velocidade, obtendo valores de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  segundos (76,77). Outro exemplo é a quinina, substância presente em águas tônicas que ao serem irradiadas na região do ultravioleta emitem luminescência (figura 20).

Figura 20: Efeito da fluorescência na água tônica devido a presença da molécula quinina

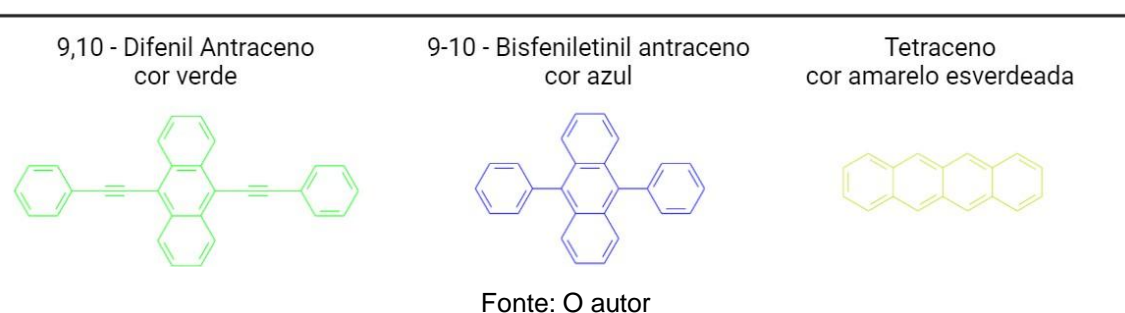
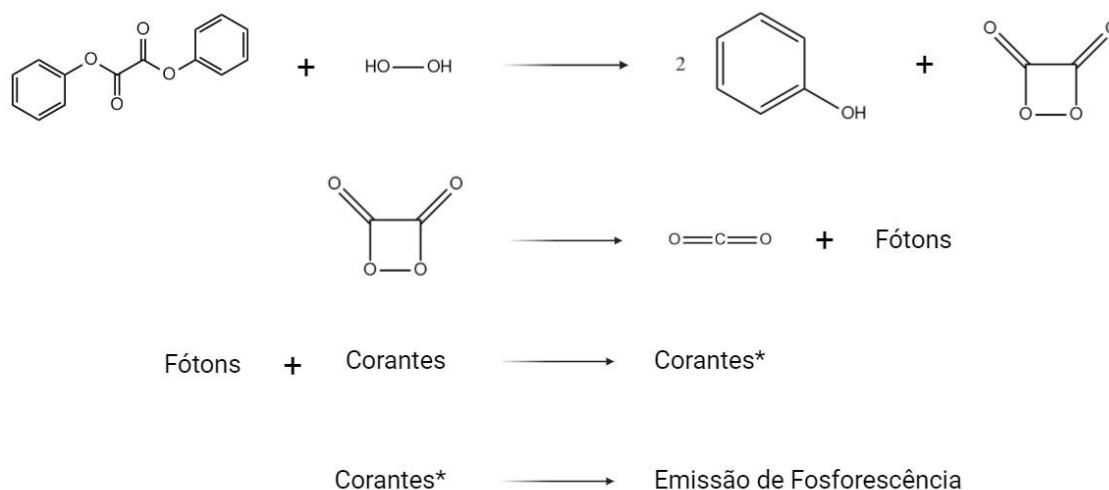


Fonte: O autor

Ao atingir o estado eletrônico  $S_1$  há a probabilidade de ocorrer um cruzamento intersistema, ao invés de voltar ao seu estado fundamental  $S_0$ . Este processo se caracteriza pela transição não radioativa entre duas vibrações isoenergéticas pertencentes a estados eletrônicos de diferentes multiplicidades. Esta transição intersistema ( $S_1$  para  $T_1$ ) é a princípio proibida, mas o acoplamento spin-órbita (acoplamento do momento magnético do orbital com o momento magnético do spin) grande o suficiente poderá permitir esta transição (70). A emissão de fótons para retornar ao estado singlete fundamental  $S_0$  é denominada fosforescência, sendo que o processo de relaxação eletrônica se torna mais lenta, variando de  $10^{-4}$  segundos até vários minutos. Como sua energia é menor que a emissão de fluorescência, seu espectro eletromagnético apresenta comprimentos de onda maiores (71,76). Um exemplo de fosforescência são as pulseiras luminosas utilizadas em festas que por um processo de quimioluminescência emitem fosforescência por algumas horas. Quando se entorta o tubo, uma ampola de vidro bem fino é quebrada liberando água oxigenada, esta então reage com o oxalato de difenila. Ao se decompor o oxalato de difenila produz dois fenóis e um peróxido cíclico. O peróxido cíclico por ser instável, se decompõe rapidamente em duas moléculas de dióxido de carbono liberando energia suficiente para excitar as moléculas de corante presentes na pulseira. Por consequência, cada pulseira possui corantes

diferentes para obter uma cor diferente ao realizar a reação (77). A figura 21 demonstra a reação de quimioluminescência de pulseiras luminescentes de festas, juntamente com compostos utilizados para a coloração como: difenil antraceno, bisfeniletinil antraceno e tetraceno.

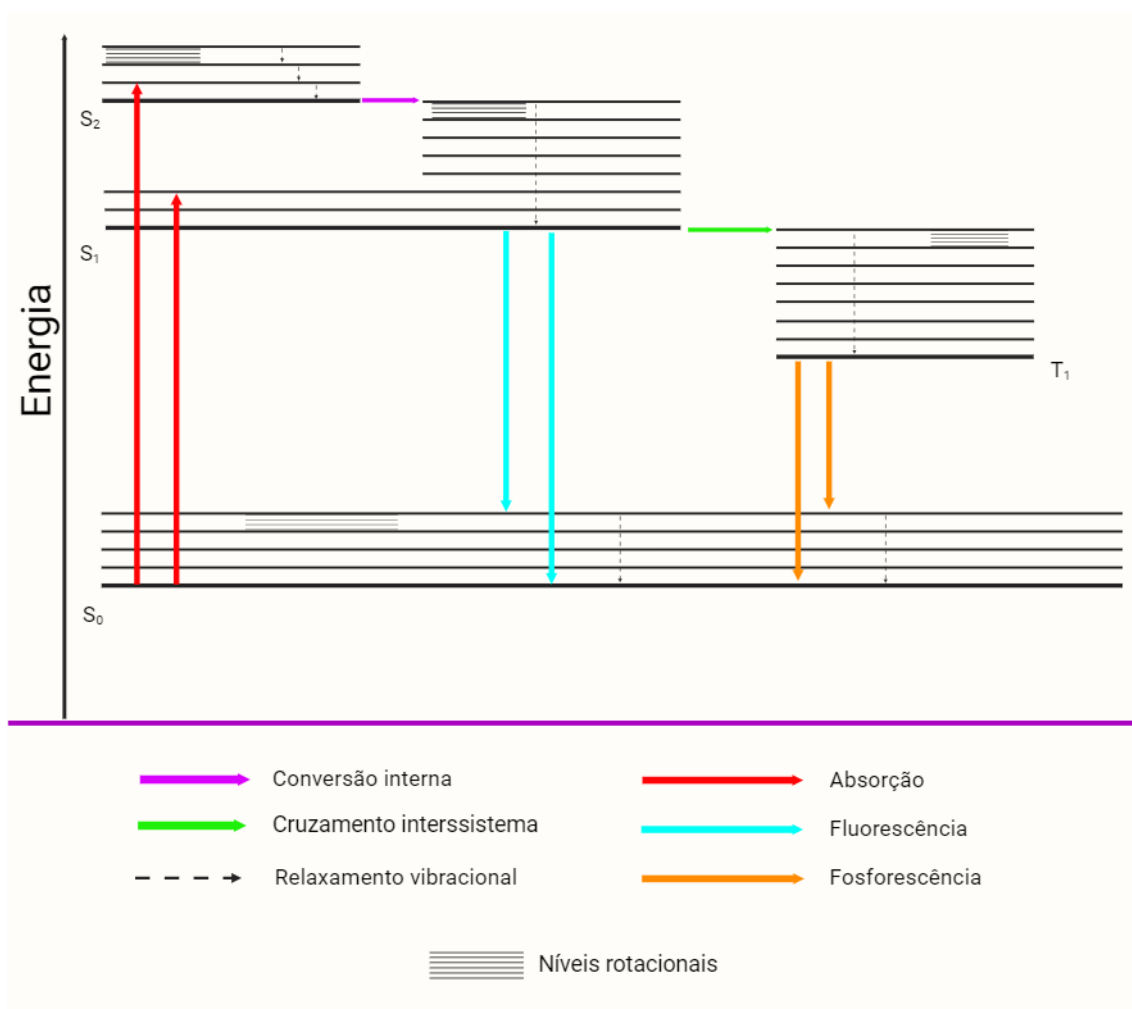
Figura 21: Reação de quimioluminescência presente nas pulseiras luminescentes de festas, com exemplos de três diferentes corantes: verde, azul e amarelo esverdeado.



Todos estes processos físicos previamente descritos, são esquematizados no diagrama de Perrin-Jablonski (figura 22). Onde existem os níveis eletrônicos, níveis vibracionais e níveis rotacionais; as suas devidas emissões e sua absorção, juntamente com as conversões interna e intersistema. A probabilidade de um elétron realizar uma das rotas demonstradas pelo diagrama é chamada de rendimento quântico. Cada caminho (rota) possui um rendimento quântico específico, denotado por  $\Phi$ , cuja soma totaliza 1 ( $\sum^N \Phi_i = 1$ ) (100%), ou seja, se uma molécula apresenta um rendimento quântico de fluorescência de  $\Phi_F = 0,75$ , isso indica que 75% dos elétrons tem maior probabilidade de decair pelo processo de fluorescência.

Enquanto que 25% irão decair por outra rota. É importante destacar que, ao considerar apenas duas rotas, como fluorescência e fosforescência, a relação se estabelece como  $\Phi_F = 0,75$  para fluorescência e  $\Phi_P = 0,25$  para fosforescência por exemplo, mantendo a soma igual a 1. Nesse contexto, todas as outras rotas não são contabilizadas na análise do rendimento quântico. Assim, a representação dos rendimentos quânticos é dependente das rotas analisadas. O rendimento quântico, portanto, permite uma compreensão clara das diferentes possibilidades de transição dos elétrons, garantindo que a soma dos rendimentos quânticos de todas as rotas consideradas seja sempre igual a 1 (71,78).

Figura 22: Diagrama de Perrin-Jablonski

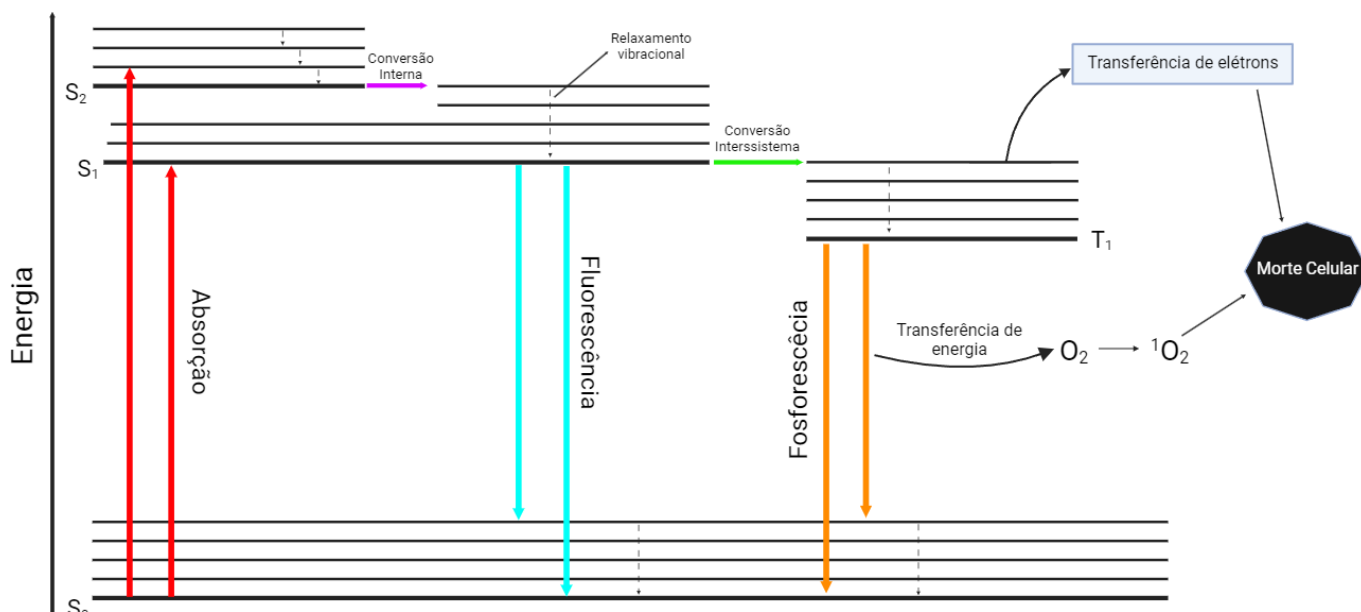


Fonte: O autor

### 3.3.2 Aplicação dos mecanismos físicos

Ao aplicar o diagrama de Perrin-Jablonski na TFD, podemos observar três essenciais: emissão de fótons em comprimentos de onda específicos para absorção do FS, moléculas fotossensibilizantes e a presença concomitante do oxigênio molecular. Inicialmente, o FS absorve um fóton em um determinado comprimento de onda e passa do seu HOMO singlete ( $S_0$ ) para um estado excitado qualquer ( $S_n$ ), retornando ao estado singlete LUMO ( $S_1$ ) por conversões internas e por relaxamento vibracional. Posteriormente existe a probabilidade de ocorrer duas transições: 1) a de menor probabilidade, quando os elétrons retornaram ao seu estado  $S_0$  com emissão de fluorescência; 2) a de maior probabilidade, os elétrons terão um acoplamento de spin-órbita e realizam um cruzamento intersistema, passando de um estado eletrônico de diferente multiplicidade, denominado como estado tripleto excitado ( $T_1$ ). Dessa forma, o retorno para o seu estado  $S_0$  pode ser efetuado emitindo fosforescência. Na TFD a energia proveniente do fóton emitido na fosforescência é capaz de ser absorvido pelo oxigênio molecular. Quando este mecanismo acontece, há uma fotoexcitação do  $O_2$  do estado tripleto, para o seu estado singlete, alterando a sua multiplicidade. Esta alteração então o transforma em uma das espécies reativas de oxigênio (EROs) (79,80,81) (figura 23). As EROs, especificamente o oxigênio singlete, são extremamente reativos e em contato com a estrutura celular, pode induzir a morte por apoptose ou por necrose (82).

Figura 23: Diagrama de Perrin-Jablonski com sua aplicação na produção de oxigênio singleto com finalidade de obter a morte celular

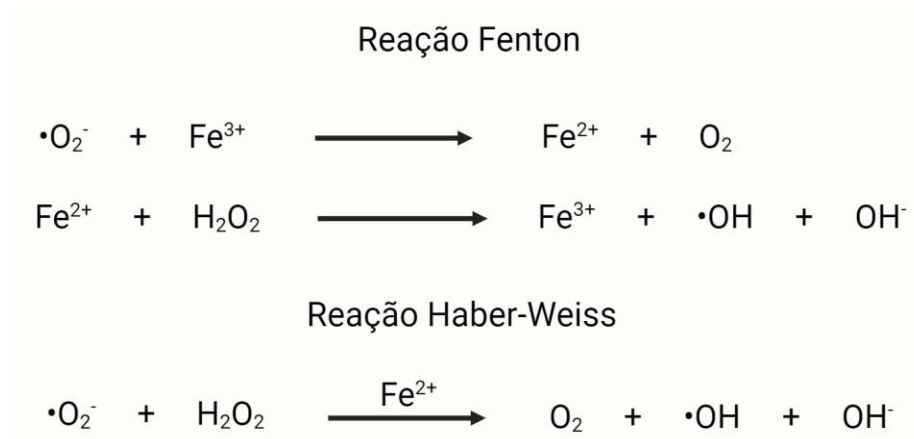


Fonte: O autor

### 3.3.3 Espécies reativas de oxigênio

A presença de oxigênio molecular é essencial para que haja a produção de oxigênio singleto por meio de dois tipos de mecanismos associados a TFD. O mecanismo tipo I, consiste na transferência de elétron entre o FS no seu estado tripleto e o  $O_2$ , gerando as EROs (83). Neste mecanismo, inicialmente são gerados os ânions superóxidos ( $O_2^{\cdot-}$ ), que por si só não causam nenhum dano significativo na célula, e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que é importante em sistemas biológicos porque pode atravessar a membrana celular com facilidade e não pode ser removido da célula, sendo necessário para sua sobrevivência (82,83). Estas moléculas irão participar de duas grandes reações que irão induzir a morte celular no caso específico do mecanismo tipo I, são elas a *Fenton Reaction* (FR) e a *Haber-Weiss Reaction* (HWR) (figura 24).

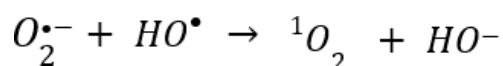
Figura 24: Reações do mecanismo tipo 1 para produção de EROs



Fonte: O autor

Nas células há um nível considerável de íons de ferro e cobre que podem realizar uma reação de oxirredução com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Esta reação é conhecida como FR, onde há a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  (íon férrico) para o  $\text{Fe}^{2+}$  (íon ferroso) e uma liberação de oxigênio molecular. A partir da formação de  $\text{Fe}^{2+}$  pode ocorrer dois caminhos diferentes: 1)  $\text{Fe}^{2+}$  reage com o peróxido de hidrogênio, formado na transferência de elétrons, continuando assim a FR; 2)  $\text{Fe}^{2+}$  será um catalisador na HWR, para diminuir a energia de ativação da reação do superóxido com o peróxido de hidrogênio. Independente do caminho que o íon ferroso seguirá, sempre haverá a formação de radical hidróxido ( $\text{HO}\bullet$ ) e de íon hidróxido ( $\text{HO}^-$ ) (84,85). A finalidade dessas reações na morte celular é a produção de oxigênio singlete, pois por uma transferência de elétrons do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para o  $\text{HO}\bullet$  há a formação de oxigênio singlete. A fórmula química pode ser descrita pela figura 25 (86).

Figura 25: Reação que envolve a produção de oxigênio singlete partindo do mecanismo tipo I



Fonte: O autor

No mecanismo tipo II ocorre a produção de oxigênio singlete diretamente por transferência de energia. Embora as duas reações aconteçam de forma concomitante, a transferência de energia ocorre com maior probabilidade, quando comparada com a transferência de elétrons. Este mecanismo é muito

mais simples do ponto de vista químico, que o mecanismo tipo I. No entanto envolve a alteração da multiplicidade do spin da molécula, tornando-a tripleto em virtude da energia recebida.

O oxigênio singlete formado pelo mecanismo tipo I ou tipo II, possui um tempo de meia-vida efêmero de aproximadamente  $3 \mu\text{s}$  (87). Este tempo curto auxilia no processo da TFD, pois impede que o oxigênio singlete ataque células saudáveis que estão adjacentes a célula cancerígena, pois irão voltar ao seu estado fundamental antes de atingi-las (83).

### 3.3.4 Fotossensibilizadores e seus medicamentos derivados ao longo da história

A utilização de corantes e pigmentos como agentes terapêuticos na TFD tem sido amplamente discutida desde o início do século, devido a sua capacidade de absorção na região do UV-visível e, por participarem de reações fotoquímicas. Dentre os FS, destacam-se os derivados da porfirina, que foram os primeiros a serem aplicados na TFD, para o tratamento de diferentes tipos de tumores, sendo classificados como FS de primeira geração (88). As porfirinas são compostos cíclicos que possuem uma estrutura composta por quatro anéis pirrólicos interligados. Essa configuração confere às porfirinas a capacidade de absorver fótons na região do UV-visível, e com a presença de grupos funcionais substituintes na estrutura da porfirina é possível realizar modificações químicas para aumentar sua solubilidade, capacidade de funcionalização e até mesmo alterar suas propriedades ópticas. Essas alterações estruturais podem otimizar a sua fototoxicidade e a produção de oxigênio singlete (89).

As clorinas são derivados da clorofila e apresentam uma estrutura semelhante à das porfirinas, mas com uma saturação adicional em uma das ligações duplas do anel pirrólico. A diminuição da conjugação eletrônica resulta em propriedades ópticas distintas, seu espectro de absorção sofre um deslocamento da absorção para comprimentos de onda maiores (*redshift*), consequentemente, um aumento da banda proibida. Portanto, as clorinas têm um espectro de absorção que se estende para comprimentos de onda maiores, na faixa de 650-670 nm. Permitindo sua ativação em regiões mais profundas do tecido (90). Essa característica é particularmente vantajosa em aplicações

clínicas, onde é desejável atingir lesões tumorais localizadas em camadas mais profundas da pele ou em tecidos subjacentes (90,91). Estas moléculas possuem um rendimento quântico de oxigénio singleto superior à das porfirinas, com valores de 0,67 (92). Uma desvantagem da clorina é seu elevado índice de fotobranqueamento. Devido à sua alta afinidade pelas EROs, a molécula pode se degradar facilmente quando exposta à um fóton em comprimentos de onda onde ocorre sua absorção (93).

O fenômeno do fotobranqueamento ocorre quando o FS perde sua capacidade de absorver no comprimento de onda adequado e, conseqüentemente, é incapaz de gerar EROs. Este fenômeno pode ocorrer quando há uma agregação do FS, quando a solução possui grande oferta de oxigénio, quando há alteração do pH do meio, quando há irradiação por tempo prolongado, dentre outros fatores (94).

### 3.4 Nanossondas

Nanossondas (NS) são nanopartículas associadas com FS ou/e com proteínas do sistema imunológico (anticorpos), proteínas do fator de crescimento epidermal (EGF) ou até mesmo ácido desoxirribonucleico (DNA) (95). Dessa forma, se tornando uma solução para otimizar a entrega do FS, aumentando a sua seletividade e sua solubilidade, além de reduzir efeitos colaterais associados à TFD. Existem duas formas de associação de FS em uma nanopartícula, por meio de interações intermoleculares, atrações eletrostáticas, que seria categorizado como uma adsorção física ou por formação de ligação química, seja ela covalente ou iônica, categorizando como uma adsorção química (96).

A adsorção física ocorre quando há um contato entre duas substâncias, onde suas moléculas irão interagir por meio de forças intermoleculares na interface dos materiais. Estas forças intermoleculares incluem as forças de van der Waals (dipolo induzido – dipolo induzido), dipolo permanente – dipolo permanente, dipolo permanente – dipolo induzido e por ligações de hidrogénio. Portanto, a eletronegatividade e cargas parciais das moléculas são fatores importantes para determinar o tipo de interação intermolecular (97). Quando se utiliza nanopartículas poliméricas para funcionalizar um FS, é a adsorção física

que se destaca. Já que o polímero possui normalmente uma carga parcial relativamente baixa e uma falta de afinidade química pelo FS, estas características proporcionam ausência de ligação química, mas uma boa interação intermolecular (98). Estas NS são simples e rápidas de serem sintetizadas, sendo sua maior desvantagem a perda do FS antes de atingir a célula tumoral, e a sua liberação inicial acentuada depois de sua administração, sendo este último contornado por aplicação de uma camada de polieletrólitos para fixar melhor o FS. Sendo assim, adsorções químicas acabam sendo mais utilizadas quando há a necessidade de funcionalizar um FS em uma nanopartícula (99).

Adsorções químicas ocorrem predominantemente em nanopartículas metálicas, mais especificamente com os metais nobres, já que estes possuem RPS em comprimentos de onda na região do UV-visível. Metais como cobre, platina, paládio e irídio possuem uma funcionalização mais complexa, sendo ligados a moléculas muito específicas e ainda há poucos estudos sobre suas sínteses e aplicações na área médica. Já os metais ouro e prata são muito utilizados e há uma gama de estudos envolvendo estas nanopartículas em diversas aplicações. Neste contexto, o ouro possui os melhores resultados de aplicabilidade na TFD, pois é possível realizar uma ligação covalente com o enxofre dada sua alta afinidade química (100). Sendo assim, muitos pesquisadores começaram a sintetizar FS que possuíam o grupo funcional tiol em suas extremidades (101,102). Os FS inicialmente não possuem enxofre em sua estrutura molecular, mas modificações são possíveis por meio de reações de esterificação, carbodiimida, redução de ácidos carboxílicos, etc.

Para moléculas que possuem uma extremidade em ácido carboxílico como a ce6, a reação de carbodiimida é a mais aceita e utilizada no meio acadêmico para modificá-la. Esta modificação normalmente está atrelada a funcionalização em AuNPs, sendo assim um átomo de enxofre deve ser adicionado (103).

Carbodiimidas são moléculas que possuem uma estrutura  $R-N=C=N-R'$ , com dois nitrogênios ligados por uma ligação dupla a um carbono central. Estas moléculas podendo ser 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) ou N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC) irão reagir diretamente com grupos carboxílico, formando um intermediário instável, este é conhecido como O-

acilureia, podendo sofrer hidrólise rapidamente e regenerar o grupo carboxílico e formar ureia como subproduto, encerrando a reação sem a formação de ligação amida para unir os compostos. Portanto, há a necessidade de adicionar N hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) para transformá-lo em um intermediário estável denominado NHS-éster. Esta química pode ser utilizada para unir quaisquer moléculas que possuem terminais carboxílico ou amina. Formando uma única molécula com grupo amida unindo-as (104, 105).

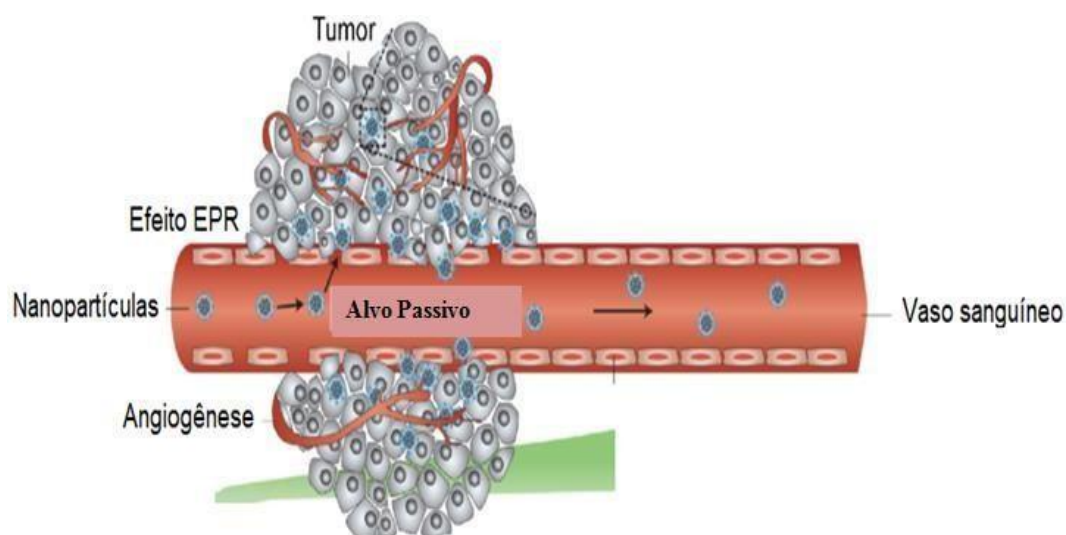
Uma das vantagens da reação de carbodiimida é a utilização de água como solvente, evitando assim de utilizar solventes orgânicos para solubilizar os compostos. Os reagentes em excesso e os contaminantes da reação pode ser facilmente eliminado, sendo uma alternativa excelente para funcionalizar nanopartículas (105).

Tanto a adsorção química como a física, proporcionam uma melhor solubilidade para o FS, uma seletividade passiva e um aumento do rendimento quântico de oxigênio singlete. A seletividade passiva, é um tipo de *drug delivery system* (DDS). Estes sistemas consistem na administração modificada dos níveis de concentração do fármaco por um longo período apenas com uma única dosagem, além de aumentarem o potencial terapêutico de um composto, fazendo-o não perder o trajeto para o local alvo específico, tendo assim uma maior seletividade e menor ocorrência de efeitos nocivos em outras partes do organismo. A taxa de liberação do fármaco é principalmente controlada pela taxa de degradação da nanopartícula, que pode ser modificado pela incorporação de compósitos, pela sua espessura de sua parede ou pelo seu tamanho (106).

A capacidade de penetração de uma nanopartícula na célula tumoral se deve ao efeito de retenção e permeabilidade aumentados, sendo conhecido em inglês como *enhanced permeability and retention* (EPR) (figura 26), este efeito acontece devido a alterações que ocorrem nas regiões tumorais facilitando o transporte de macromoléculas. As principais alterações são a vasculatura anormal, oxigenação deficiente e acidez do microambiente. Devido a necessidade de suprir demandas de oxigênio, a célula tumoral realiza seu crescimento desordenado, rápido e irregular, gerando poros na sua vasculatura (107). Portanto, as células do endotélio ficam mais afastadas possibilitando a entrada da nanopartícula no tecido tumoral, contudo as estruturas precisam ser biocompatíveis para poderem permanecer e se acumular. A dimensão dos poros

endoteliais no tumor pode variar de 10 nm até 400 nm. No entanto já foi evidenciado a presença e acumulação de bactérias como *Lactobacillus* e *Salmonella typhimurium* que possuem um tamanho médio de 1-2  $\mu\text{m}$  (108,109).

Figura 26: Representação da TOM para o estado tripleto e os possíveis estados singletos do oxigênio molecular



Fonte: Adaptado de Ganoth *et al.* (110).

O sistema ativo de entrega de fármacos, se caracteriza pela funcionalização de agentes de direcionamento (ligantes), sendo estes, moléculas que se ligam especificamente a um receptor superexpresso em células alvo. A interação entre o ligante e o receptor induz a internalização das nanopartículas na célula por meio de endocitose, causando a liberação do medicamento (FS) na célula alvo. O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) não é expresso de forma acentuada em células normais, mas em alguns subtipos de células cancerígenas este receptor é superexpresso. Portanto, a interação não desejada entre NS e as células saudáveis será minimizada, resultando em um aumento da citotoxicidade e seletividade para células tumorais e redução de efeitos colaterais sistêmicos, quando há uma administração de medicamentos fotossensibilizadores. Várias biomoléculas têm sido utilizadas para ser funcionalizadas as nanopartículas juntamente com os FS. São elas: anticorpos, aptâmeros, carboidratos, enzimas, folato, peptídeos e vitaminas. Os anticorpos aparecem como os ligantes mais frequentemente utilizados para atingir ativamente as células tumorais devido à sua alta especificidade (105,111).

A estrutura de um anticorpo tem como base as cadeias polipeptídicas formando cadeias leves e pesadas. Até o momento, existem cinco classes de anticorpos (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE), cada uma com uma cadeia pesada diferente e funções efetoras distintas. O IgG é a biomolécula mais abundante no ser humano e o mais utilizado para funcionalizar nanopartículas. O tipo IgG pode ser subdividido em quatro subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) (108).

O tipo de anticorpos mais relevante para tratamentos oncológicos é o IgG1. A molécula IgG1 contém grupos amina devido a terminais  $\epsilon$ -amino da lisina, bem como grupos de ácido carboxílico dos ácidos aspártico e glutâmico. Existem cerca de 90 lisinas, 8 cisteínas e 12 ligações dissulfeto entre as cadeias pesadas e leves são encontradas em um anticorpo IgG1 típico. No entanto, apenas 30 moléculas de lisina podem ser modificadas devido a restrições estruturais e estéricas. Aminas da lisina em cadeias laterais e grupos tiol livres da cisteína são frequentemente empregados para funcionalizar anticorpos com AuNPs (111).

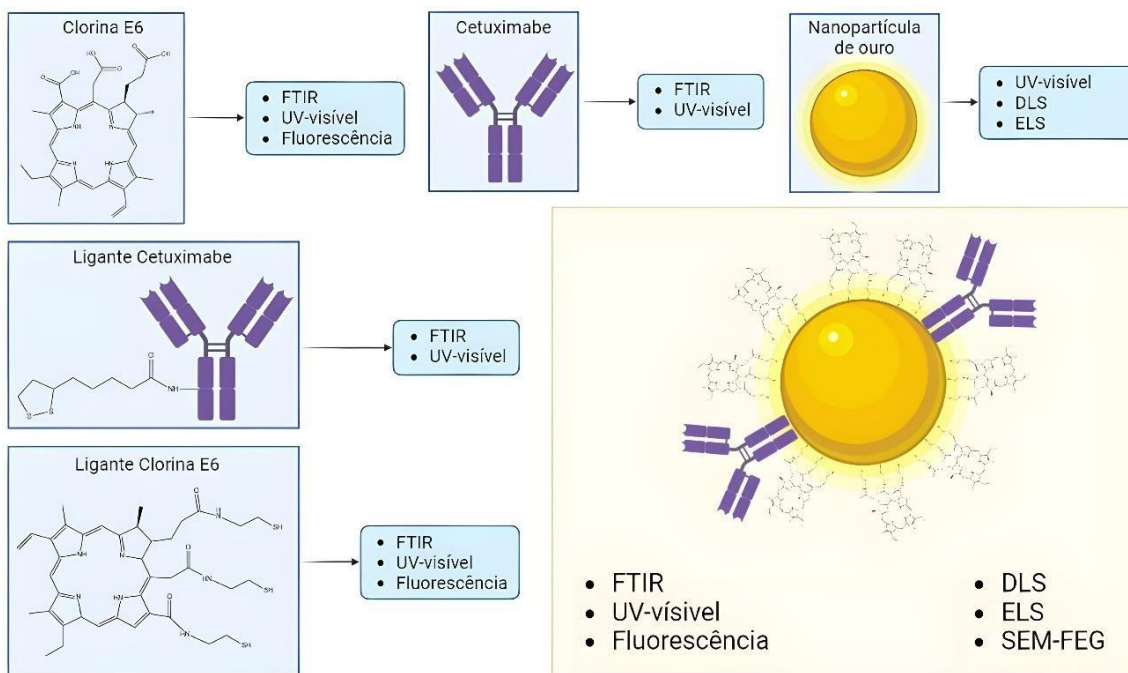
Estes agentes terapêuticos isolados já são utilizados para tratamento de câncer, mas pesquisadores descobriram que as NB (Nanopartículas + FS + Anticorpo) possuem potencial para melhorar o tratamento de tumores. Por exemplo, foi comprovado que os efeitos terapêuticos do CX em tumores que expressam o EGFR são aumentados quando há uma funcionalização com as AuNPs em comparação com o anticorpo não funcionalizado. CX é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1 que se liga ao domínio extracelular do EGFR para internalizar a NS no tumor alvo. Como inicialmente o CX não possui átomos de enxofre livres para a realização da funcionalização, há a necessidade de aplicar a reação de carbodiimida para formação de ligação entre o grupo amina do CX com o grupo carboxílico de moléculas que possuem uma extremidade com enxofre. Ao fim da reação o CX estará apto para se funcionalizar com a NS, formando assim o que chamamos de NB. Caracterizada pela presença de uma nanopartícula com funcionalização de FS e de anticorpo, obtendo uma capacidade de aumentar a solubilidade do FS e ter maior seletividade por conta do anticorpo (112).

## 4 METODOLOGIA

A dissertação foi desenvolvida no laboratório de Nanossensores da Universidade do Vale do Paraíba. Os materiais para a síntese das AuNPs foram: cloreto de ouro (254169, Sigma Aldrich), citrato de sódio (S1805, Sigma Aldrich), água ultrapura/tipo I filtrada pelo equipamento Arium® Comfort Sartorius water system. As vidrarias para a realização da síntese foram lavadas previamente com água régia, preparada com uma mistura de ácido clorídrico (HCl) (258148, Sigma Aldrich) e ácido nítrico (SZBC2130V, Sigma Aldrich) na proporção 3:1, para limpeza e descontaminação. Os materiais para a formação dos ligantes (ce6 e CX) foram: ce6 (MFCD08669566, Frontier Scientific Inc.), Erbitux® 5 mg.mL<sup>-1</sup> frasco de 20 mL (Merck), cisteamina (M9768, Sigma Aldrich),  $\pm$ - $\alpha$ -Ácido Lipóico (T5625, Sigma Aldrich), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (03450, Sigma Aldrich), N hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) (24510, Thermo Scientific), hidróxido de sódio (NaOH) (S5881, Sigma Aldrich). Os solventes foram: metanol (1060091000, Merck KGaA), PBS buffer (pH 7,4 10mM P3813, Sigma Aldrich), PBS buffer (pH 6,2 10mM). Na purificação foi utilizada uma seringa descartável esterilizada sem agulha (5mL – Descarpack), agulha esterilizada hipodérmica (30x8 – Solidor) e para separação por massa molar: Vivaspin 500 (VS0121 30 KDa).

Inicialmente foi realizada a síntese das AuNPs pelo método de Turkevich adaptado (61), posteriormente a síntese dos ligantes (ce6 e CX) e por fim sua funcionalização para a formação das NB. Cada formulação teve suas respectivas caracterizações, sendo elas: UV-visível para determinar surgimento e desaparecimento de compostos, FTIR para confirmar a presença ou ausência de ligações químicas, técnicas de DLS e ELS para determinação do diâmetro hidrodinâmico (DH) e do potencial zeta (PZ). Após as caracterizações, foi realizada uma análise de toxicidade das nanossondas por meio da TFD. Um esquema das caracterizações que foram realizadas em cada formulação está descrito na figura 27.

Figura 27: Esquema das caracterizações que foram realizadas na ce6, no CX, nos ligantes ce6 e CX, e na NS bifuncional



Fonte: O autor

#### 4.1 NANOPARTÍCULA DE OURO

Para a síntese das AuNPs, inicialmente foi necessário preparar uma solução aquosa de cloreto de ouro  $9,96 \text{ g.L}^{-1}$  e de citrato de sódio  $0,0192 \text{ g.L}^{-1}$ . Em um balão volumétrico de três bocas lavado previamente com água régia, foram adicionados 425 mL de água ultrapura e 25 mL da solução de cloreto de ouro. Com uma agitação magnética de 250 rpm, realizar o aquecimento da formulação até atingir  $95^\circ\text{C}$ . Ao atingir a temperatura adequada, adicionar 50 mL de citrato de sódio e, desligando o aquecimento, esperar 1 hora para que a temperatura chegue a aproximadamente  $45^\circ\text{C}$ , onde é possível confirmar a formação das nanopartículas e que sua reação já se encerrou.

#### 4.2 LIGANTES

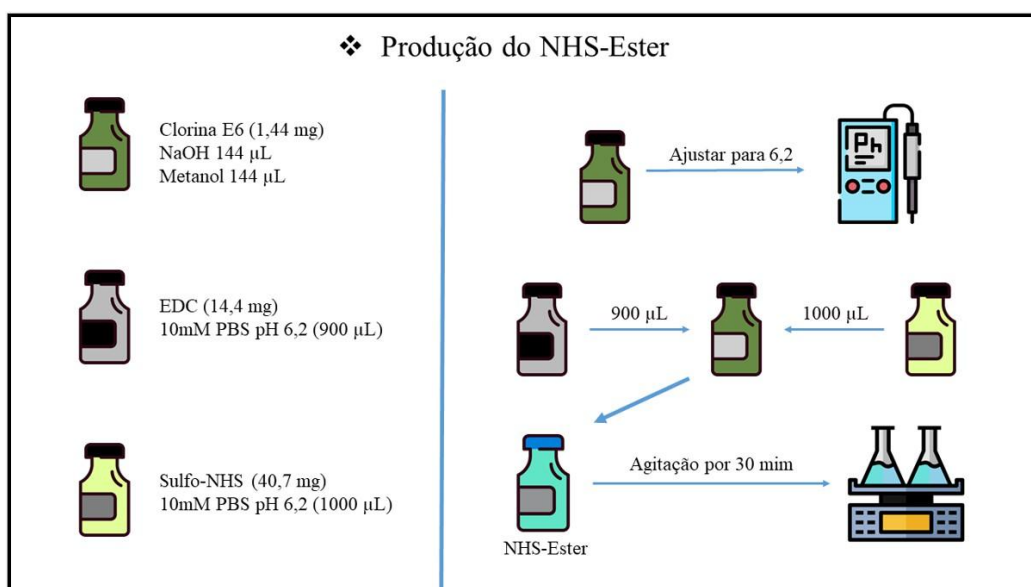
Para a síntese dos ligantes, deve-se utilizar a reação de carbodiimida para realizar a ligação entre os componentes. Precauções iniciais devem ser consideradas: o sulfo-NHS, o EDC e a cisteamina devem ser pesados na câmara

de luvas (*Glove Box*) por apresentarem características higroscópicas. As amostras devem ser armazenadas em microtubos esterilizados de 500  $\mu\text{L}$  e dentro de frascos de vidro devidamente lacrados sob condições de temperatura indicadas pelo fabricante.

#### 4.2.1 Ligante ce6

A reação e os cálculos devem seguir as seguintes razões molares: 1 Clorina E6: 78 Sulfo-NHS: 32 EDC: 10 Cisteamina. Sua síntese se inicia na formação do intermediário estável, para tal deve-se solubilizar 1,44 mg de ce6 em uma solução contendo 144  $\mu\text{L}$  de NaOH  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e 144  $\mu\text{L}$  de Metanol, ajustando seu pH para 6,2 adicionando HCl  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , formando então a solução ce6. 40,7 mg de sulfo-NHS foi solubilizado em 1 mL de PBS  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 6,2; formando a solução sulfo-NHS. 14,4 mg de EDC solubilizado em 900  $\mu\text{L}$  de PBS  $10 \text{ mM}$  pH 6,2, formando a solução EDC. Após homogeneizar as três soluções, misturá-las em um frasco âmbar previamente lavado com água régia e deixá-los agitando a 200 rpm por 30 minutos (figura 28).

Figura 28: Esquemática da síntese do NHS-éster

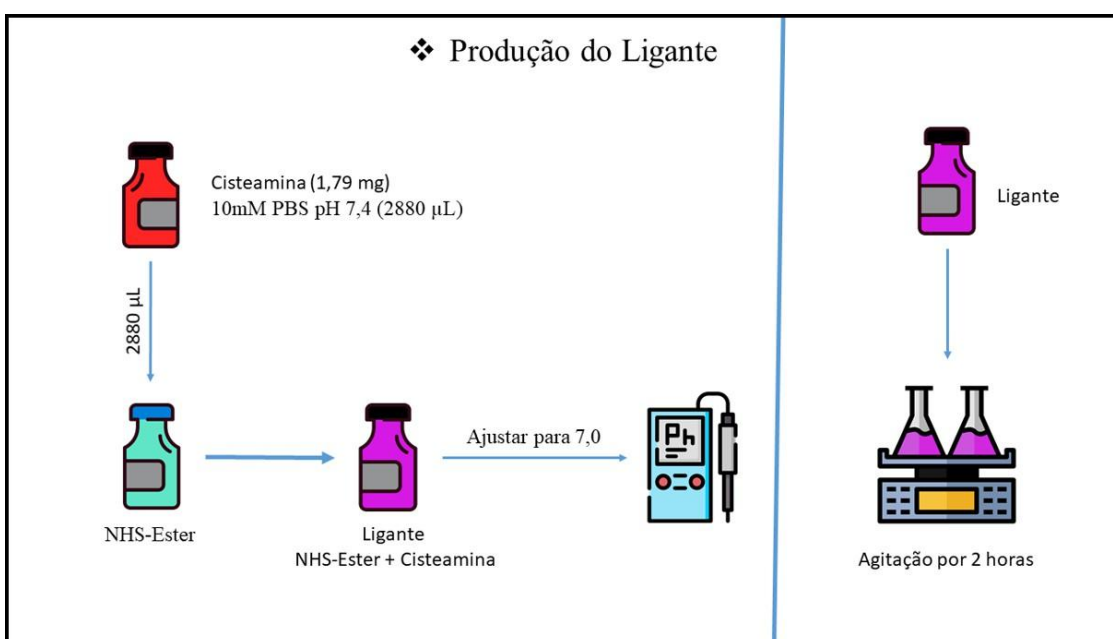


Fonte: O autor

Para a formação da ligação que caracterizará o ligante, deve-se solubilizar 1,79 mg de cisteamina em 2,88 mL de  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  PBS pH 7,4. Esta solução

então foi vertida sobre o frasco âmbar contendo o intermediário estável. Ajustando o pH desta formulação para 7,0, utilizando NaOH a  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  e agitando a 200 rpm por 2 horas. Quando o período de agitação finalizar, deve-se ajustar seu pH para acima de 9, garantindo assim que a reação cesse. Para uma melhor homogeneização da formulação, foi necessário deixar agitando por mais 30 minutos. Assim, finalizando a reação de carbodiimida (figura 29).

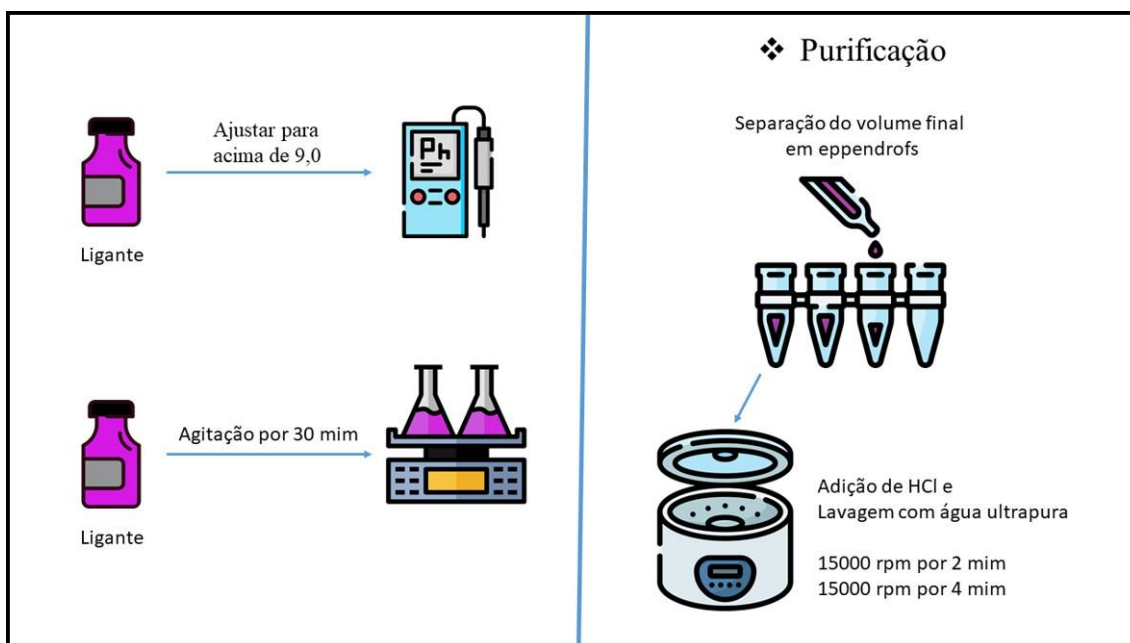
Figura 29: Esquemática da síntese do ligante pela reação de carbodiimida



Fonte: O autor

No processo de purificação, a solução final contendo o ligante precisou ser separada em microtubos de  $1 \text{ mL}$  e em cada deve ser adicionado  $4,2 \mu\text{L}$  de ácido clorídrico  $37\%$  para que a ce6 presente na formulação se agregue e precipite, possibilitando assim uma separação mais efetiva dos subprodutos, após uma centrifugação a  $15.000 \text{ rpm}$  por 2 minutos. Depois de remover o sobrenadante, é necessário realizar a lavagem com  $200 \mu\text{L}$  de água ultrapura e centrifugar novamente a  $15.000 \text{ rpm}$  por 2 minutos. Este processo é repetido mais 2 vezes para eliminação das impurezas remanescentes. Após estes processos, o ligante realizará as suas devidas caracterizações, como descrito anteriormente (figura 30).

Figura 30: Esquemática da purificação do ligante após a síntese



Fonte: O autor

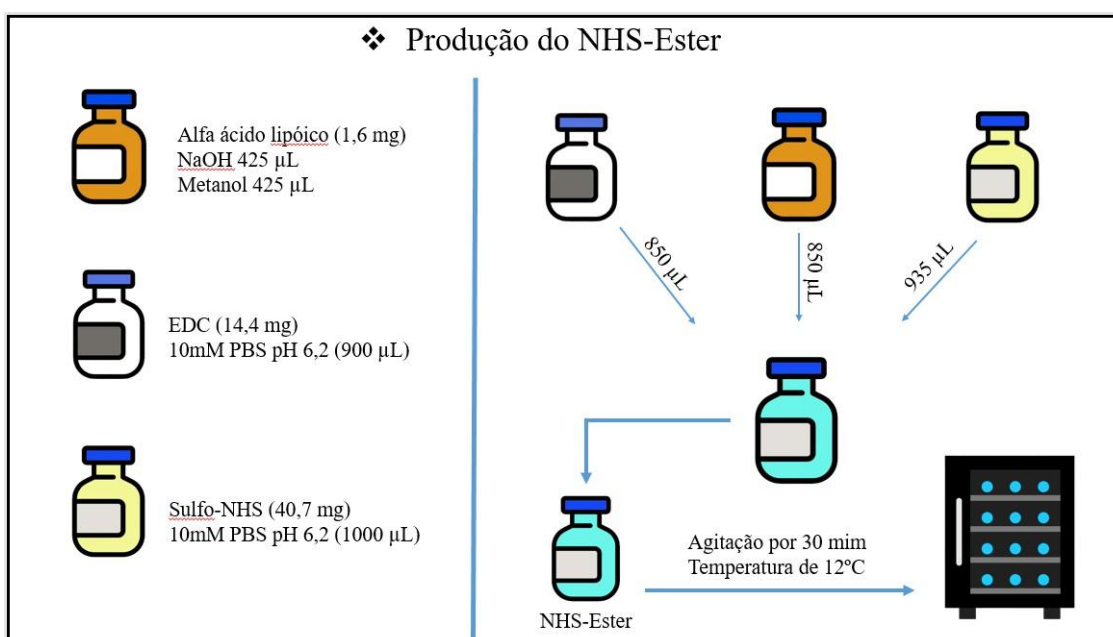
#### 4.2.2 Ligante CX

Inicialmente é necessário realizar a purificação do anticorpo contido no medicamento Erbitux<sup>®</sup>, separando os excipientes do CX. Portanto, com auxílio do fluxo laminar, retirar 2 mL de Erbitux<sup>®</sup> do frasco e realizar uma centrifugação com o filtro Vivaspin 500 (500  $\mu$ L) do Erbitux<sup>®</sup> contido na seringa. Rotacionando a 15.000 xg por 10 minutos a 8°C. Após centrifugar, todo o volume contido na seringa, realizar o processo de lavagem, completando o filtro de centrifuga com água ultrapura ( $\cong$  500  $\mu$ L) e centrifugando a 15.000 xg por 10 minutos a 8°C. A quantidade de lavagens depende do espectro observado no perfil A280 do espectrofotômetro. Ao finalizar as lavagens, com o auxílio de uma pipeta, coletar o concentrado dentro do filtro Vivaspin. Este volume coletado deve ser transferido para um microtubo esterilizado e devidamente armazenado formando o Cetuximabe (CX).

A reação e os cálculos devem seguir as seguintes razões molares: 1 CX: 3200 Sulfo-NHS: 1300 EDC: 120  $\pm$ - $\alpha$ -Ácido Lipóico. Sua síntese é semelhante à do ligante ce6, sendo assim, deve-se preparar uma solução de  $\pm$ - $\alpha$ -Ácido Lipóico de concentração 1,6 mg.mL<sup>-1</sup> contendo 50% metanol e 50% PBS 10 m mol.L<sup>-1</sup>,

pH 6,2 como solvente. 40,7 mg de sulfo-NHS foi solubilizado em 1 mL de PBS 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 6,2; formando a solução sulfo-NHS. 14,4 mg de EDC solubilizado em 900 µL de PBS 10 m mol.L<sup>-1</sup> pH 6,2, formando a solução EDC. Após homogeneizar as três soluções, misturá-las em um frasco âmbar previamente lavado com água régia e deixá-los agitando a 200 rpm por 30 minutos a 12°C (figura 31).

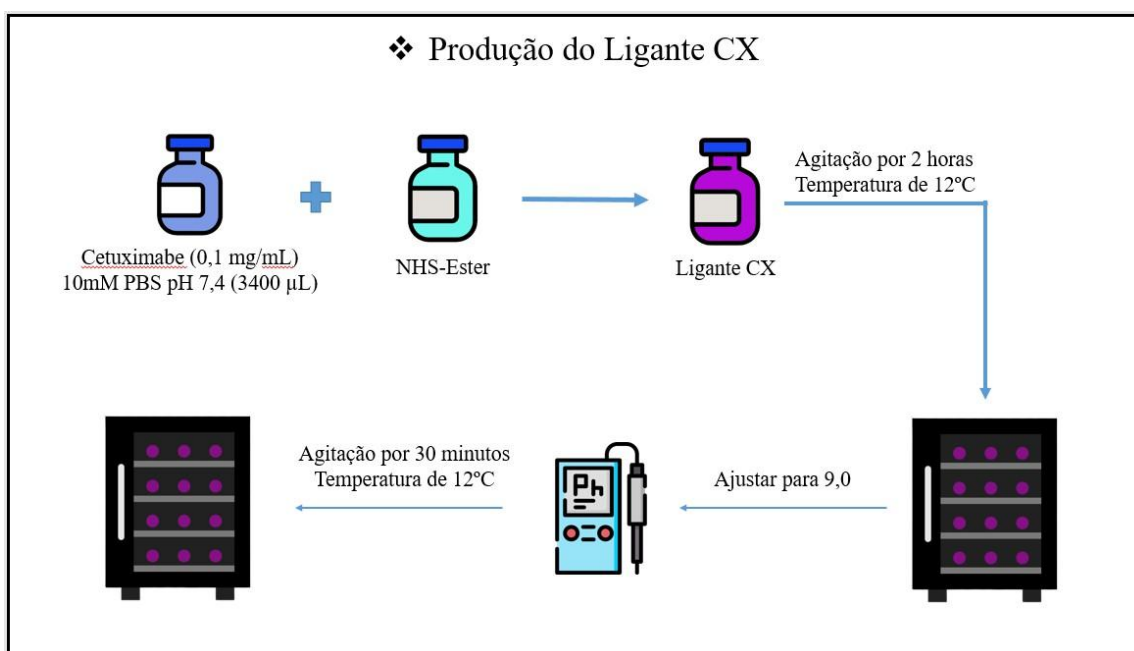
Figura 31: Esquemática da reação de carbodiimida inicial para formação do NHS-éster



Fonte: O autor

Para a formação da ligação que caracterizará o ligante, deve-se diluir o CX purificado a uma concentração de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> em PBS 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,4. Um volume de 3.400 µL desta solução foram vertidas em frasco âmbar, contendo o intermediário estável. Deixar agitando a 200 rpm por 2 horas a 12°C. Quando o período de agitação finalizar, deve-se ajustar seu pH para acima de 9, garantindo assim que a reação cesse. Para assegurar que todo CX reagiu e que a reação cessou de fato, foi necessário deixar a formulação agitando por mais 30 minutos. Assim, finalizando a reação de carbodiimida (figura 32).

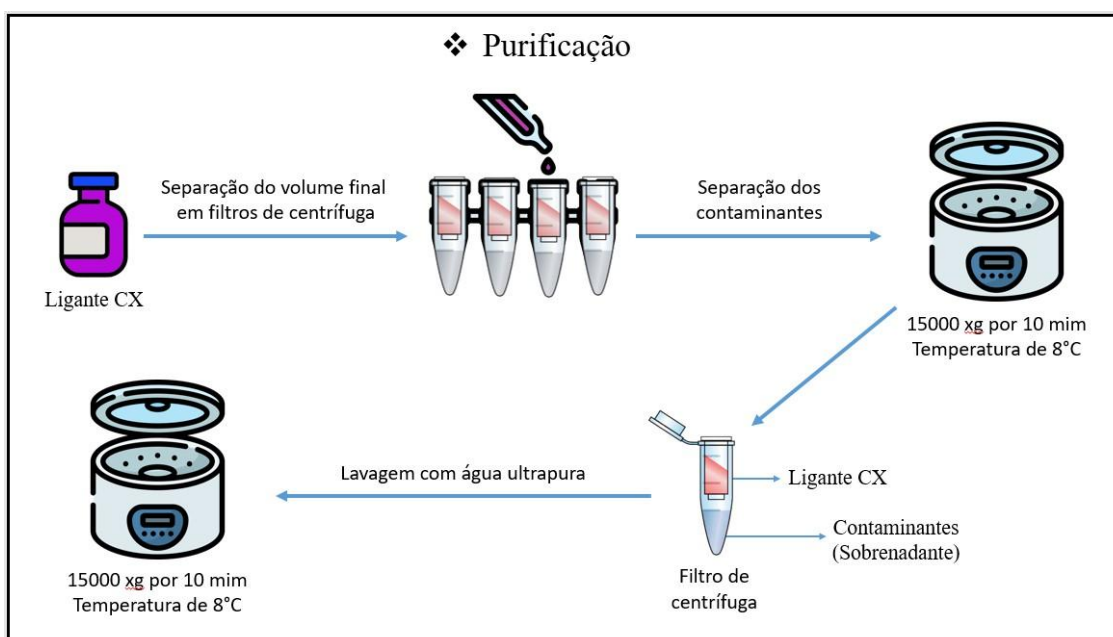
Figura 32: Esquemática da reação de carbodiimida para formação do ligante CX



Fonte: O autor

Com o auxílio de um filtro de centrifuga Vivaspin 30Kda, a solução final foi filtrada e, posteriormente lavada com água ultrapura. Adicionando 500 µL da solução final no filtro de centrífuga e centrifugando a 15.000 xg por 10 minutos a 8°C, realizou-se a separação dos reagentes e de possíveis contaminantes na amostra. Este processo deve ser repetido até que todo o líquido seja filtrado da solução final, para então iniciar o processo de lavagem. Onde permanece o uso do filtro de centrifuga, porém com a adição de 500 µL de água ultrapura. Centrifugando a 15.000 xg por 10 minutos a 8°C. Este processo foi repetido duas vezes. Após a lavagem, o volume da solução filtrada e lavada deve ser coletado, analisado e armazenado (figura 33).

Figura 33: Esquemática da purificação do ligante CX



Fonte: O autor

### 4.3 NANOSSONDA

Com os ligantes CX e ce6, deve-se realizar o recobrimento em AuNPs. O cálculo para recobrir de forma mais eficiente os ligantes ao redor da área superficial das AuNPs é necessário inicialmente considerar que diferentes variáveis apresentam características puramente empíricas ou teóricas. Estas variáveis são mutáveis de acordo com o experimento e, portanto, a percentagem de recobrimento descrita é uma forma arbitrária de demonstrar que 50% possuem moléculas do ligante CX e 50% possuem moléculas do ligante ce6.

Para o cálculo, deve-se obter o valor da concentração de AuNPs que estão presentes na síntese. Navarro e Werts (113) desenvolveram uma fórmula que possibilita encontrar o valor de absorvidade molar da AuNPs, descrita pela equação 9.

Equação 9: Absorvidade molar da AuNPs por meio da aproximação de Navarro

$$\varepsilon = 4,7 \cdot 10^4 \cdot (D)^{3,3}$$

sendo  $\varepsilon$ , a absorptividade molar;  $D$ , o DH da AuNP e  $4,7 \cdot 10^4$  o valor da eficiência do coeficiente de extinção das AuNPs e 3,3 é o fator geométrico para esferas. Este valor foi então utilizado na equação 10, sendo esta a lei de Lambert-Beer.

Equação 10: Lei de Lambert-Beer

$$C = \frac{A}{\varepsilon \cdot l}$$

sendo  $C$  a concentração,  $A$  a absorvância descrita no UV-vis,  $l$  sendo o caminho óptico de 1 cm e  $\varepsilon$  sendo a absorptividade molar descoberta pela Eq. 9. Para a continuação dos cálculos foi necessário transformar a concentração de mol.L<sup>-1</sup> para partículas.L<sup>-1</sup>. Essa transformação tem a finalidade de ajustar a dimensionalidade (equação 11).

Equação 11: Transformação da dimensionalidade para partículas.L<sup>-1</sup>

$$\frac{1 \text{ mol}}{C(\text{lambert Beer})\text{mol.L}^{-1}} = \frac{6,022 \cdot 10^{23} \text{ partículas}}{X}$$

$$X = Y (\text{partículas.L}^{-1})$$

Então para demonstrar quantas partículas de ce6 são necessárias para cobrir a concentração descoberta em  $Y$  (concentração de partícula de ouro) é necessário inicialmente saber quanto de ce6 consegue cobrir uma única partícula com diâmetro definido. Portanto, utilizando o valor do DH da nanopartícula de ouro (equação 12).

Equação 12: Quantidade necessária de ce6 para recobrir uma partícula de diâmetro  $d$

$$Ce6(Au) = \frac{\pi \cdot d^2}{0,64 \text{ nm}^2}$$

Esta fórmula descreve quanto de ce6 é necessária para cobrir uma partícula de diâmetro  $d$ . Ao descobrir esse valor, basta multiplicar os valores de

concentração (partículas.L<sup>-1</sup>) e da Ce6(Au). Assim é obtido o valor de quanto de ce6 foi necessária para cobrir essa concentração de partículas de ouro, porém seu valor estará ainda em partículas.L<sup>-1</sup>, para mudar sua dimensionalidade foi necessário dividir o valor obtido por 6,022. 10<sup>23</sup>. Assim transformando em mol.L<sup>-1</sup> (equação 13). Dimensão de concentração necessária para a continuação dos cálculos.

Equação 13: Concentração necessária para o recobrimento das AuNPs

$$Ce6(Au_T) = Y (\text{partículas. L}^{-1}) . Ce6(Au)$$

$$Ce6(Au_T) = \text{valor total de recobrimento de clorina}$$

$$C_R = \frac{Ce6(Au_T)}{6,022.10^{23}}$$

$C_R$  então é a concentração do recobrimento, a concentração que precisa ser alcançada para que todo o ligante recubra a nanopartícula. Neste caso o ligante está sendo comparado a ce6 já que é o único composto responsável pelos picos no UV-vis, sendo assim os cálculos todos tem ela como base. É necessário encontrar a concentração de ce6 que está no ligante sintetizado. Para tal há uma equação da reta descrita na equação 14.

Equação 14: Equação da reta para definir a concentração do ligante diluído

$$C = -0,01011 + 0,01203 . X (\text{Absorbância})$$

O ligante sintetizado normalmente apresenta uma concentração muito alta, portanto é necessário diluí-lo a uma concentração de 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>, pois nesta concentração haverá uma melhor interação com a nanopartícula devido a proporcionalidade existente entre os reagentes, facilitando sua adsorção química. Após medir o ligante diluído no espectrofotômetro, utilizar seu valor de absorbância no comprimento de onda de 660-670 nm. Este valor de absorbância substitui o  $X$  da fórmula acima e assim descobrindo a concentração real do

ligante diluído. Com o valor da concentração real ( $C$ ), devemos transformá-la em  $\text{mol.L}^{-1}$  já que sua concentração está em  $\text{g.L}^{-1}$ . Portanto, dividir o valor pela massa molar do composto ( $\text{ce6}$ ) (equação 15).

Equação 15: Transformação da dimensionalidade da concentração para  $\text{mol.L}^{-1}$

$$Z (\text{mol. L}^{-1}) = \frac{C_{\text{g.L}^{-1}}}{596,67 \text{ g.mol}^{-1}}$$

Utilizando a fórmula de diluição para descobrir o volume a ser utilizado conforme equação 16:

Equação 16: Fórmula da diluição

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

onde  $C_1$  é a concentração calculada para o recobrimento  $C_R$  e  $V_1$  é o volume de 1 L já que a concentração do recobrimento está em  $\text{mol.L}^{-1}$ .  $C_2$  sendo, a concentração da  $\text{ce6}$  no ligante em  $\text{mol.L}^{-1}$  ( $Z$ ) e por fim  $V_2$  é o volume necessário para recobrir 1 L de nanopartícula na concentração  $C_1$ . Sendo descrito pela equação 17:

Equação 17: Fórmula para descobrir o volume necessário para recobrir 1L de AuNPs

$$C_R \cdot 1 \text{ L} = Z \cdot V_2$$

$V_2$  é o volume de recobrimento em 1 L, é necessário então dividir por 1000 para encontrar o volume em 1 mL. E por fim multiplicar por 3 para ter um excesso de ligante (equação 18).

Equação 18: Cálculo final para obter o valor de volume para recobrir 1 mL de AuNPs

$$\frac{V_2}{1000} = V_2 (\text{mL})$$

$$V_2 (mL) \cdot 3 (excesso) = V_F$$

Sendo  $V_F$  o volume necessário para cobrir 1 mL de AuNPs na concentração descrita. Para tal foi criado um programa na qual é capaz de realizar os cálculos e estabelecer o valor de  $V_F$  em microlitros necessários para a pipetagem final. Seu código fonte está descrito em anexo.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

##### 4.4.1 Análise de Espectroscopia no UV-Visível

As amostras foram caracterizadas por espectrofotometria no UV-Visível em um espectrofotômetro DeNovix DS-11, com resolução espectral de 1 nm e caminho óptico auto-ajustável entre 0,02 - 0,5 mm. A amostra fica presa pela sua tensão superficial entre a janela de safira (inferior) e fibra de quartzo (superior), logo sem a necessidade do uso de cubeta. Em todas as leituras, 2  $\mu$ L das amostras foram medidos em modo de transmitância e, os resultados foram plotados com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1.

##### 4.4.2 Análise de emissão de fluorescência

A análise de emissão de fluorescência foi realizada para monitorar as características fotofísicas do FS ce6, por meio de um leitor de microplaca modelo VANTAstar da marca BMG Labtech, com monocromadores de filtro variável linear de excitação e emissão. Nos parâmetros do monocromador foi utilizado uma excitação em 380-420 nm e uma faixa de 482 nm até 734 nm com resolução de 1 nm para o espectro de emissão de fluorescência. Um volume de 200  $\mu$ L de amostra foi adicionado a uma placa de 96 poços da marca greiner F-botton, para medir a emissão de fluorescência, o ganho da fotomultiplicadora foi de 1000, sendo em torno de 200 varreduras por análise realizada.

#### 4.4.3 Análise de DLS

A análise de DLS foi realizada para determinar o DH e a estabilidade eletrostática das soluções coloidais, por meio do equipamento ZetaSizer nano – ZS90 da Malvern. No equipamento foi definido o tempo de equilíbrio de 120 segundos, com temperatura de 23°C. Um volume de 500 µL de amostra foi adicionado à cubeta de poliestireno (modelo ZEN0118, Sarstedt), para verificar a distribuição de tamanho das partículas, com seu ângulo de detecção de 90°, sendo realizado 3 medidas, com um número de corridas determinadas automaticamente pelo equipamento de acordo com os parâmetros pré-definidos com tempo de ~30 segundos. A análise do Potencial Zeta determinou a estabilidade eletrostática e a carga superficial das soluções coloidais, quando um diferencial de potencial elétrico foi aplicado. As soluções coloidais foram adicionadas às cubetas capilares com eletrodos de ouro (modelo DTS1070, Malvern). O modelo matemático definido foi de Smoluchowski, uma média de três análises por amostragem foi realizada para a obtenção dos resultados e, com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1, os dados exportados foram plotados.

#### 4.4.4 Análise de FTIR

Os ligantes, o CX, a ce6 e as nanossondas foram caracterizados por meio dos modos vibracionais das ligações químicas. A análise de FTIR foi realizada em um espectrofotômetro FTIR da Perkin-Elmer (modelo Spectrum 400), acoplado com o acessório de refletância total atenuada com cristal de diamante, localizado na Central de Laboratórios Multiusuários (IP&D/UNIVAP). Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 4000-450  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ , sendo a média de 64 varreduras/ponto. O background foi feito com o cristal limpo em atmosfera ambiente. As amostras foram pipetadas e secas no pedestal do equipamento para melhor obtenção das absorções nos espectros, com auxílio de um jato de ar seco sem  $\text{CO}_2$  gerado por um gerador de gases (ParKer).

#### 4.4.5 Ensaio do tempo de internalização das NB

A análise foi realizada para determinar a intensidade de emissão das NB que permaneceram internalizadas na célula tumoral por meio do leitor de microplaca modelo VANTAstar da marca BMG Labtech. A linhagem utilizada foi de câncer de mama (MDA-MB-468), e o protocolo de análise foi utilizando o método de fluorescência, modo endpoint em 660 nm, ótica bottom (feixe incidente por baixo da amostra) e com ganho da fotomultipladora de 1000 em uma placa de 96 poços, cada poço continha  $1 \times 10^5$  células aderidas. Esta análise foi realizada em triplicatas independentes, sendo que cada experimento foi realizado em quintuplicata, os tempos experimentais de internalização foram realizados em 5 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1,5 h, 1 h e 30 min. Para determinação da estatística e plotagem dos gráficos no programa OriginPro versão 8.5.1.

#### 4.4.6 Ensaio de citotoxicidade das NB e TFD

A viabilidade celular da linhagem MDA-MB-468 foram determinadas pelas metodologias: colorimétrica com azul de tiazolil Brometo de tetrazólio (MTT) da Sigma Aldrich, M2128; e método de exclusão utilizando o corante azul de tripan (TB) da Sigma Aldrich, T6146. A metodologia colorimétrica com MTT avaliou a atividade mitocondrial, que foi obtida por meio da redução do sal tetrazolium (cor amarelada) pela mitocondria e, conseqüentemente, formando cristais de formazan, de cor violácea, com absorção em 570 nm. A leitura da absorção característica do formazan foi realizada em triplicatas independentes, sendo que cada experimento foi realizado em quintuplicata pelo leitor de microplaca modelo VANTAstar da marca BMG Labtech. O valor da atividade mitocondrial foi determinado pela Equação 19.

Equação 19: Cálculo da atividade mitocondrial em porcentagem para ensaio de MTT

$$\textit{Atividade Mitocondrial (\%)} = \frac{ABS_{amostra}}{ABS_{controle}} \times 100$$

O método de exclusão do corante azul de Tripán avaliou a viabilidade celular, com coloração em azul das células inviáveis e translúcidas as células viáveis. Por meio do microscópio invertido NIB-100 (Bel Equipamentos Analíticos) foram obtidas 5 imagens pelo programa Future WinJoe versão 1.0.7.9 de cada poço, totalizando 220. A contagem celular foi realizada no programa ImageJ, versão 1.48, e calculadas por meio da Equação 20.

Equação 20: Cálculo da viabilidade celular em porcentagem para ensaio de TB

$$Celular (\%) = \frac{Número\ de\ células\ coradas}{Número\ de\ células\ totais} \times 100$$

Para a ensaio de TFD, a suspensão de  $1 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> (MDA-MB-468) foi aplicada em placas de 96 poços contendo meio de cultura completo. Após 24 h de adesão celular, o meio foi substituído pelas NB. As células foram mantidas em contato com a substância por 1 h, sob condições de cultivo. Decorrido o tempo de internalização, o meio contendo a substância foi removido, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado um novo meio de cultura completo para a irradiação utilizando o LED Irrad-Led5 660 (Biopdi) do Laboratório de Terapia Fotodinâmica (IP&D/UNIVAP), no comprimento de onda de 660 nm, com potencia de 36,8 mW/cm<sup>2</sup>. Sendo irradiada por 16 min e 40 seg obtendo uma energia equivalente a 36,8 J. A placa foi posicionada a 1,5 cm de distância da fonte de irradiação.

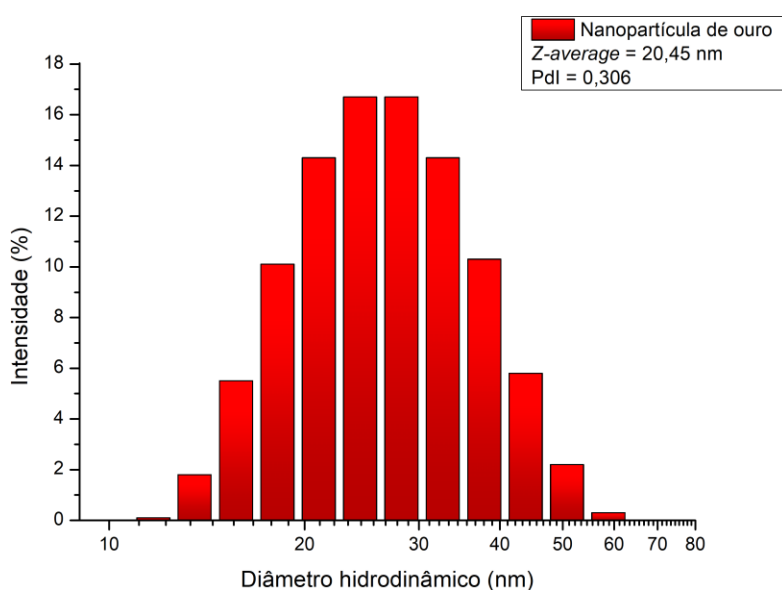
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a caracterização da formulação, os resultados foram divididos em seções, cada uma delas referente a uma parte da síntese, sendo elas: carreador (AuNP), ligantes carbodiimida e nanossondas.

### 5.1 CARREADOR: NANOPARTÍCULA DE OURO

A distribuição de tamanho hidrodinâmico e o Pdl das AuNPS são apresentados na figura 34. De acordo com a literatura, o tamanho médio de 20,45 nm e o Pdl de 0,306 estão na faixa esperada para a síntese de nanopartículas via redução de citrato, usando o método de Turkevich adaptado (61). O Pdl normalmente apresenta valores mais elevados, devido à nucleação desuniforme durante a reação e, pelo tamanho nanométrico, leves variações podem causar desvios no Pdl. Sendo assim, este valor corresponde a uma formulação monomodal e a uma distribuição uniforme dentro dos parâmetros de uma AuNP. Por apresentar uma distribuição monomodal, foi utilizado o valor de *z-average* do equipamento zetasizer para determinar o diâmetro hidrodinâmico médio, portanto este valor não corresponde ao centro da gaussiana da figura 34.

Figura 34: Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das AuNP

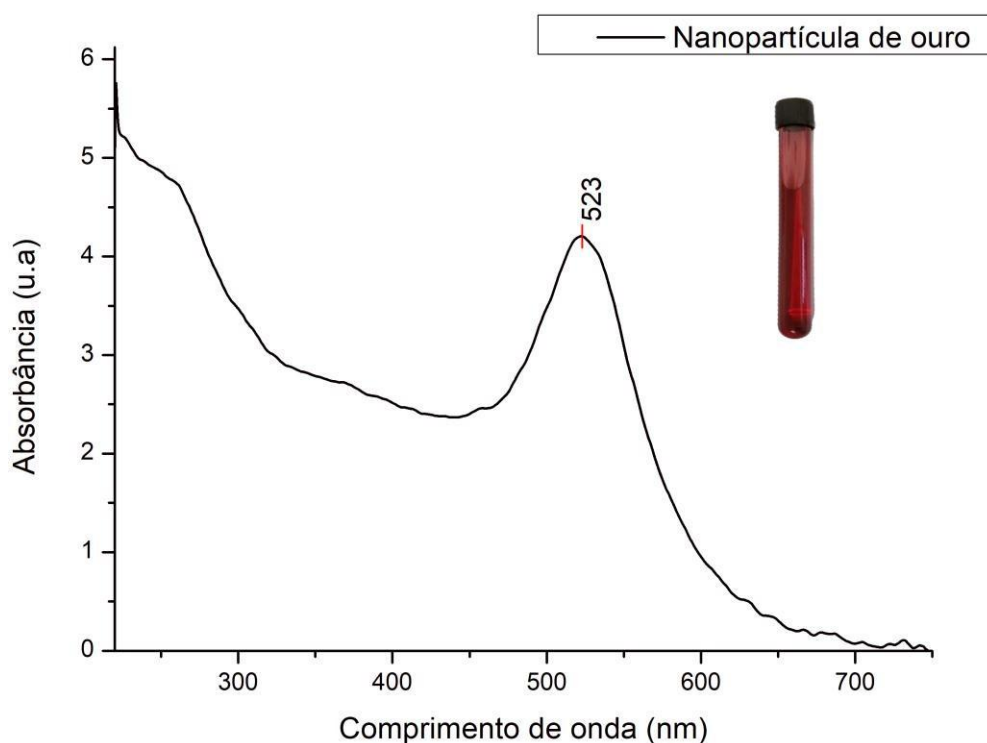


Fonte: O autor

O potencial zeta das AuNPs foi analisado no equipamento zetasizer e o valor encontrado foi de -39,5 mV, sendo negativo devido aos íons do citrato de sódio em sua superfície. Este valor está dentro dos parâmetros de estabilidade eletrostática esperada por uma nanopartícula de ouro (114).

Para caracterizar sua absorção no UV-visível, foi necessário analisar seu pico de absorção máximo na região de ressonância. Seu valor de absorbância foi de 4,2065 e o comprimento de onda referente à frequência da RPS foi de 523 nm. Este valor condiz com o comprimento de onda esperado por uma nanopartícula de ouro (115). Vale ressaltar que o fato do espectro iniciar em aproximadamente 5,5 de absorbância ocorre porque as várias transições eletrônicas internas dos elétrons no orbital d e espalhamento que ocorrem em cada átomo de ouro envolvido na nanopartícula contribuem para esta região do ultravioleta, mostrando um gráfico inicialmente largo com seu pico de RPS e depois decaindo até zero (figura 35) (116,117).

Figura 35: Espectro de absorção na região do UV-visível da AuNP



Fonte: O autor

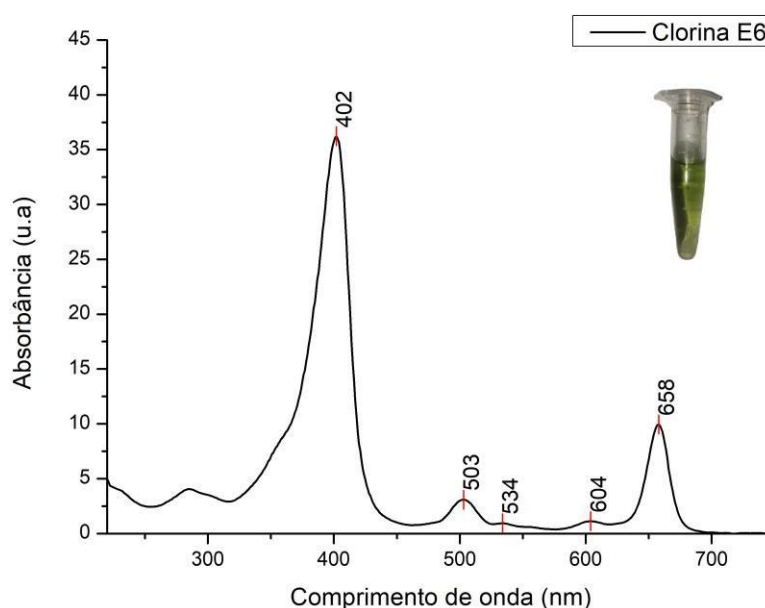
## 5.2 LIGANTES CARBODIIMIDA

Os ligantes serão divididos em duas categorias diferentes: o ligante ce6 que foi sintetizado tendo como reagente a cisteamina; e o ligante CX que teve como reagente o ácido alfa lipóico. Ambos tiveram suas sínteses baseadas na reação de carbodiimida. Suas caracterizações envolvem suas absorções no UV-visível, suas vibrações no infravermelho e suas emissões de fluorescência para os componentes fotossensíveis.

### 5.2.1 Ligante ce6

Inicialmente serão abordadas as caracterizações referentes ao FS utilizado na reação para sintetizar o ligante ce6. A determinação de suas absorções características no UV-visível são demonstradas na figura 36 que evidencia a existência de bandas importantes de um derivado de porfirina livre (sem a presença de um metal central), a banda de solet em 402 nm (banda de maior pico de absorção) e as bandas Q em 503 nm, 534 nm, 604 nm e 658 nm (bandas de menor absorção) (118).

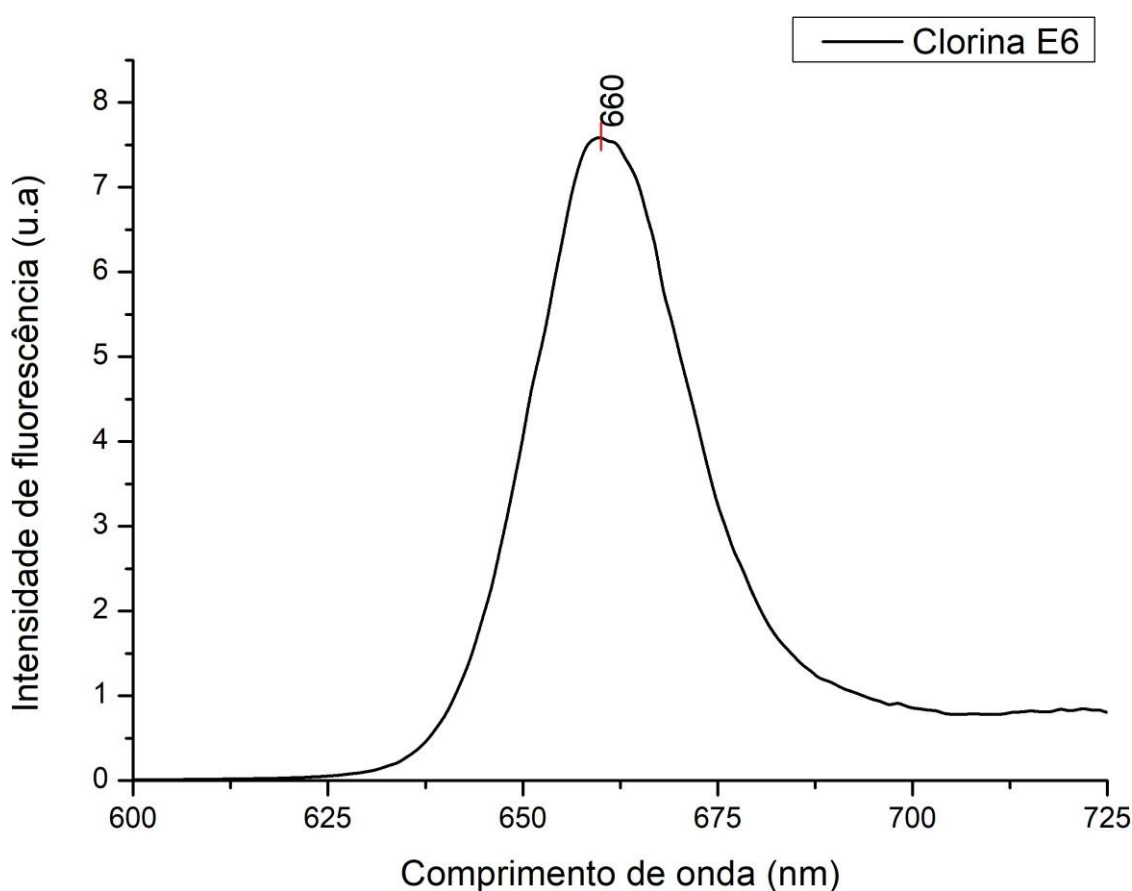
Figura 36: Espectro de absorção na região do UV-visível da ce6



Fonte: O autor

A caracterização da banda de emissão de fluorescência evidencia a permanência de suas características. A região de comprimentos de onda absorvidos para providenciar a emissão de energia, em forma de fluorescência, foi da banda de solet em 402 nm. Seu espectro da intensidade de emissão, representado pela figura 37, possui valor máximo em 660 nm. Este valor de emissão está de acordo com um FS adequado para TFD, pois o oxigênio molecular absorve ondas eletromagnéticas que estão nos comprimentos de onda próximos a 690 nm (119).

Figura 37: Espectro de emissão na região do UV-visível da ce6

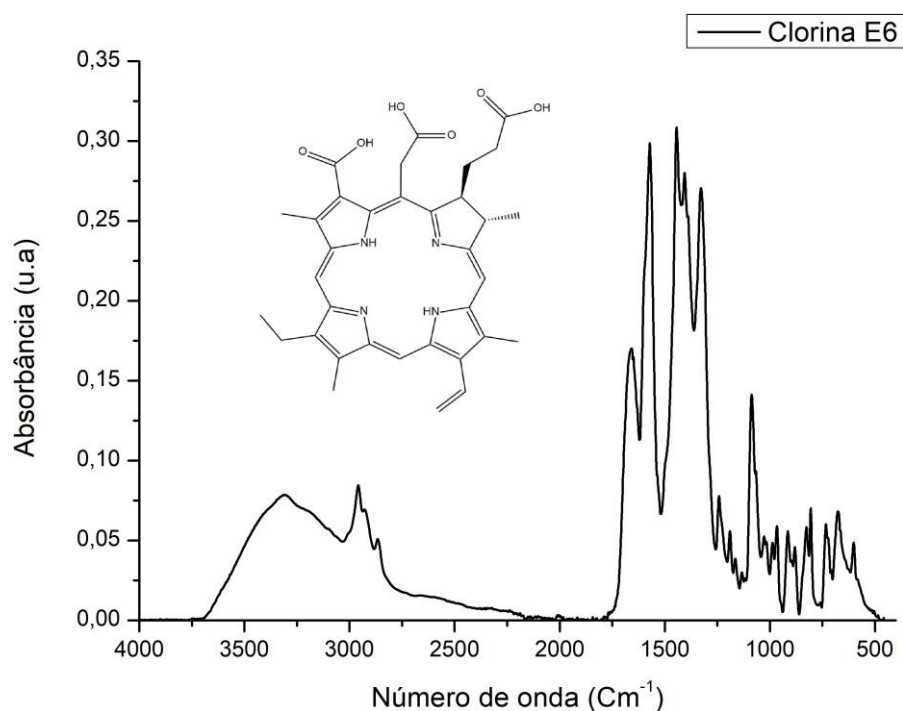


Fonte: O autor

Seu espectro de FTIR (figura 38) evidencia bandas referentes à integridade do anel como:  $1027\text{ cm}^{-1}$ ,  $1133\text{ cm}^{-1}$ ,  $1165\text{ cm}^{-1}$  e  $1240\text{ cm}^{-1}$ . Estas vibrações são as contribuições das duplas conjugadas para a absorção no UV-visível, sendo importante que permaneçam inalteradas durante o processo de síntese do ligante. As bandas de maior intensidade são referentes aos ácidos carboxílicos, sendo elas:  $1328\text{ cm}^{-1}$ ,  $1406\text{ cm}^{-1}$  e  $1656\text{ cm}^{-1}$ . Para uma efetiva

formação do ligante da ce6 é necessário evidenciar o desaparecimento de bandas referentes ao ácido carboxílico e o aparecimento de bandas referentes à amida secundária, fora a permanência das bandas dos quatro anéis da molécula (120-123).

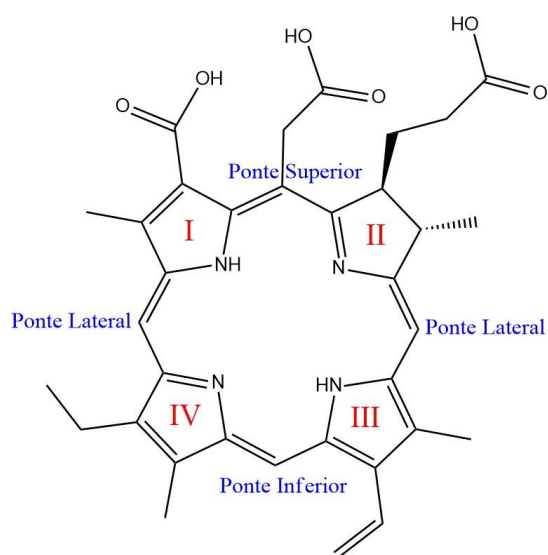
Figura 38: Espectro de FTIR da molécula ce6



Fonte: O autor

A tabela 1 apresenta o número de onda, o tipo de vibração e sua intensidade para cada atribuição referente à vibração específica daquela ligação (120-123). Cada denominação da estrutura da ce6 citada na tabela está evidenciada na figura 39.

Figura 39: Estrutura da ce6 com as denominações utilizadas na tabela 1



Fonte: O autor

Tabela 1: Atribuições de bandas do espectro FTIR da molécula Ce6 (Mohsenian *et al.* 2019; Yeu *et al.* 2021; Pavia *et al.* 2001; Gladkova *et al.* 2020) (continua)

Atribuições	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibração	Intensidade
O-C=O em ácidos carboxílicos	601	B	w
C-C-N no anel II	675	-	w
C=C-N no anel III	733	-	w
C-C=C das pontes laterais	805	-	w
C-H das pontes	826	EFP	w
C=C-C das pontes laterais	881	DFP	w
C=CH <sub>2</sub>	896	EFP	w
C-C=C da ponte superior	914	-	w
C-C-H do grupo metil superior	966	-	w
C-H de carbono trissubstituído	988	-	w
C-C-H do grupo metil dos anéis (I, II, III, IV)	1.027	-	w
C-C-H do grupo etil do anel II	1.066	-	m
C=C das pontes laterais	1.086	-	m
C-N dos anéis (I, II, III)	1.133	-	w
C-N do anel IV	1.165	-	w
C-C=C da ponte inferior	1.190	-	w
C-N-H dos anéis (I e III)	1.242	-	w

Tabela 1: Atribuições de bandas do espectro FTIR da molécula Ce6 (Mohsenian *et al.* 2019; Yeu *et al.* 2021; Pavia *et al.* 2001; Gladkova *et al.* 2020) (conclusão)

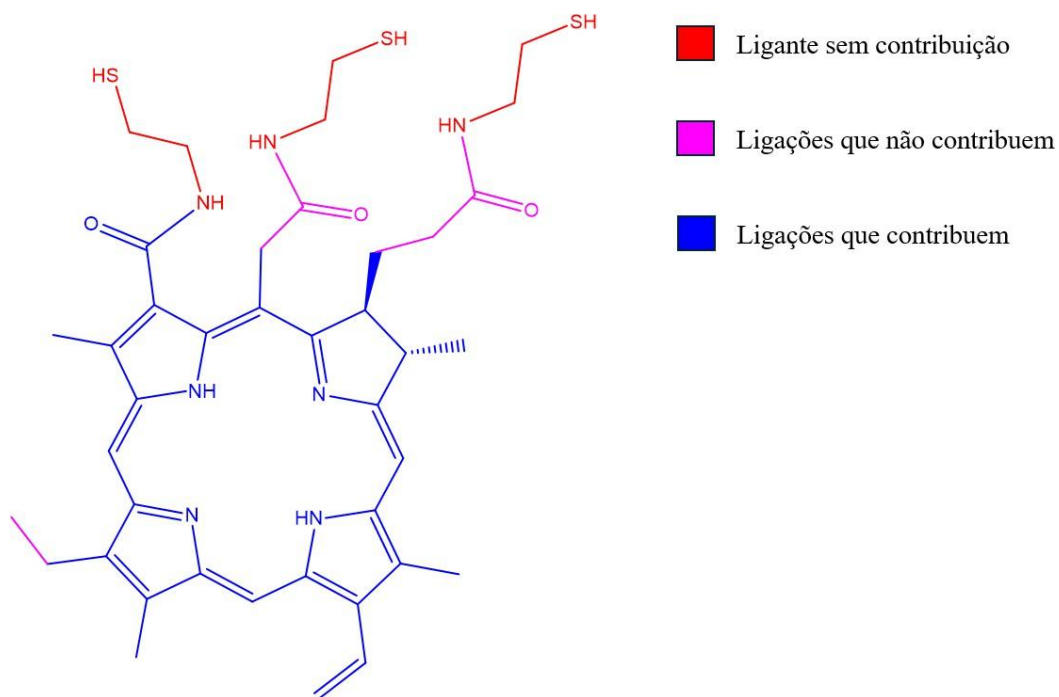
Atribuições	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibração	Intensidade
C-O próximo ao anel III	1.328	-	s
C-N-C do anel I	1.389	-	w
O-H em ácidos carboxílicos	1.406	BP	s
Deformação dos grupos CH <sub>3</sub>	1.444	-	s
C=C dos anéis superiores	1.536	-	w
C=C-C das pontes laterais e a superior	1.571	-	s
C=C-C da ponte inferior	1.598	-	m
C=O de ácidos carboxílicos	1.656	-	m
N-H dos anéis (I e III)	2.934	E	w

B – Deformação angular; BP – deformação angular no plano; E - Estiramento; EFP - Estiramento fora do plano; DFP - Deformação fora do plano; W – intensidade fraca; M-intensidade média; s – intensidade forte.

Fonte: O autor

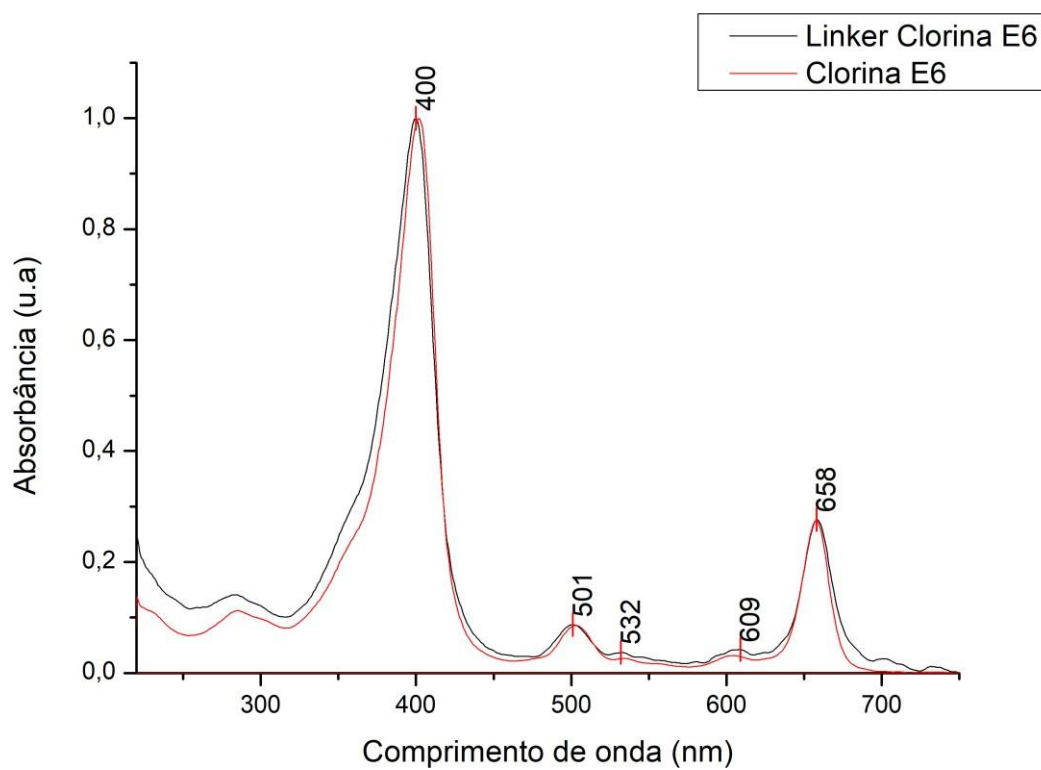
Após a realização da reação de carbodiimida, é obtido o ligante ce6 (Figura 40). As suas bandas de absorção no UV-visível são idênticas as bandas da molécula ce6 (apenas com leves deslocamentos), isso ocorre porque as ligações que ocasionam esta absorção são duplas conjugadas da área central da molécula (figura 40). Os terminais que sofrem a reação foram ligados a uma molécula que não possui nenhuma absorção no UV-visível, portanto, permanecendo inalterados no espectro. Assim, não houve nenhuma alteração fotofísica ou fotoquímica da molécula após a reação, logo conclui-se que suas estruturas principais de absorção não sofreram alterações (124). A figura 41 apresenta os espectros normalizados de absorção do ligante e da ce6.

Figura 40: Estrutura molecular do ligante ce6 com cores indicativas



Fonte: O autor

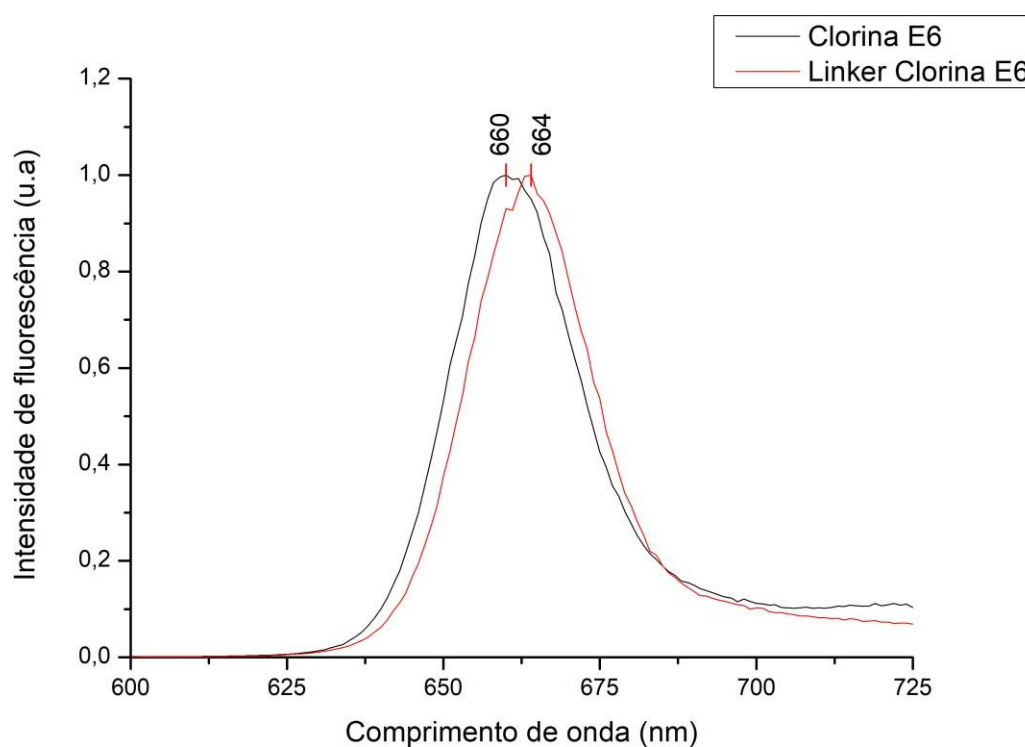
Figura 41: Espectro normalizado de absorção na região do UV-visível da clorina E6 e do ligante ce6



Fonte: O autor

Seus espectros de intensidade de emissão de fluorescência (figura 42) também são iguais justamente por suas propriedades fotofísicas permanecerem inalteradas. Deslocamentos (*shifts*) de até 4 nm podem significar uma alteração no solvente utilizado ou no comprimento de onda absorvido para o processo de emissão. Como o solvente utilizado foi 50% de NaOH e 50% de Metanol. Seu deslocamento é apenas um reflexo da absorção de uma banda com um valor diferente de 400 nm. Por relação direta ao *Stokes Shift*, pode-se afirmar que foi uma absorção em 404 nm para obter um valor de 664 nm de emissão de fluorescência (125).

Figura 42: Espectro normalizado de emissão de fluorescência na região do UV-visível da clorina E6 e do linker clorina e6

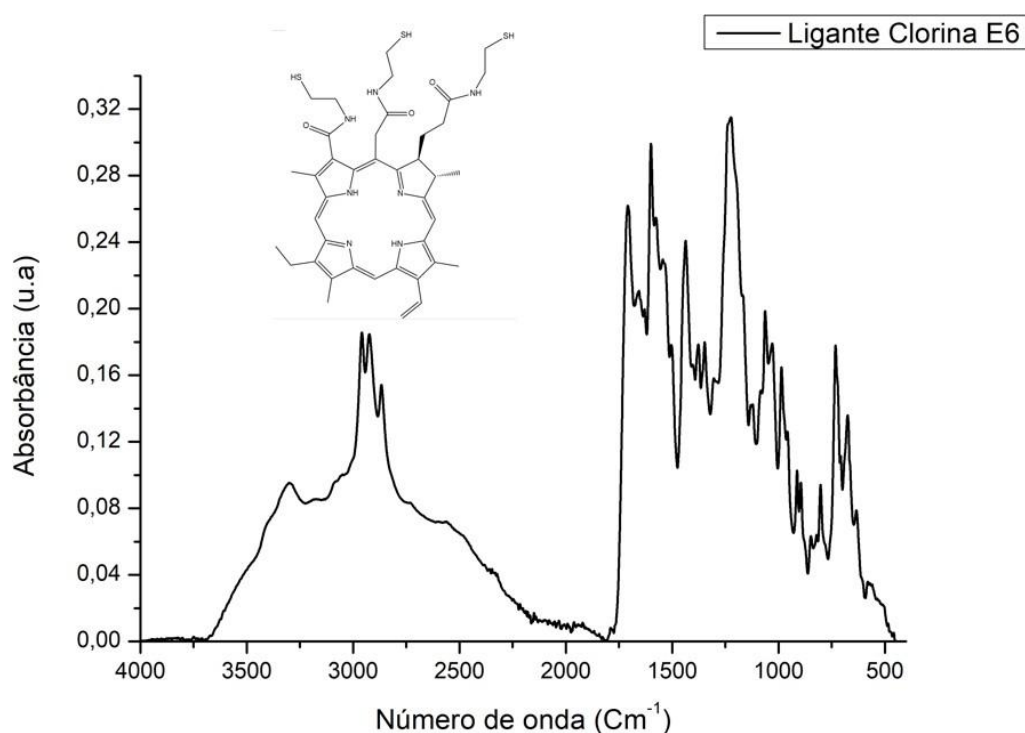


Fonte: O autor

As bandas de absorção no infravermelho do espectro da figura 43 estão listadas de forma ordenada na tabela 2 (120-123, 126). É possível observar a permanência das bandas relacionadas à absorção no UV-visível, que correspondem aos 4 anéis da molécula original da ce6. O desaparecimento das bandas em  $601\text{ cm}^{-1}$ ,  $1328\text{ cm}^{-1}$ ,  $1406\text{ cm}^{-1}$  e  $1656\text{ cm}^{-1}$ , que correspondiam a vibrações do grupo funcional de ácidos carboxílicos, evidenciam a ligação formada entre o ligante (alpha ácido lipóico) e o FS (ce6), formando uma amida

secundária com uma vibração em  $1715\text{ cm}^{-1}$  (120-123, 126).

Figura 43: Espectro de FTIR do ligante clorina e6



Fonte: O autor

Tabela 2: Atribuições de bandas do espectro FTIR do ligante Ce6 (Mohsenian *et al.* 2019; Yeu *et al.* 2021; Pavia *et al.* 2001; Gladkova *et al.* 2020; Castilho *et al.* 2017) (continua)

Atribuição	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibração	Intensidade
C-C-N no anel II	675	B	w
C=C-N no anel III	732	-	w
C-C=C das pontes laterais	802	-	w
C=CH <sub>2</sub> do anel I	895	EFP	w
C-C=C da ponte superior	914	EFP	w
C=C do anel II	958	-	w
C-H de carbono trissubstituído	986	-	w
C-C-H dos anéis (I, II, III, IV)	1029	-	w
C-C-H do grupo etil do anel II	1063	-	w
C-N do anel III	1121	-	m
C-N dos anéis (I, II, III)	1130	-	m

Tabela 2: Atribuições de bandas do espectro FTIR do ligante Ce6 (Mohsenian *et al.* 2019; Yeu *et al.* 2021; Pavia *et al.* 2001; Gladkova *et al.* 2020; Castilho *et al.* 2017) (conclusão)

Atribuição	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibração	Intensidade
C-N do anel IV	1165	-	w
C-C=C da ponte inferior	1194	-	w
C-N dos anéis I	1222	-	w
C-N-H dos anéis (I e III)	1240	-	w
C=N dos anéis (II e IV)	1304	-	w
O-C=O do anel IV	1347	-	w
C-N do anel (I e II)	1377	-	s
Deformação dos grupos CH <sub>3</sub>	1437	BP	s
C-C=C das pontes laterais	1505	-	w
C-C-H das pontes	1544	-	s
C=C-C das pontes laterais e a superior	1576	-	w
C=C-C da ponte inferior	1601	-	s
C=O de amidas secundárias	1715	-	m

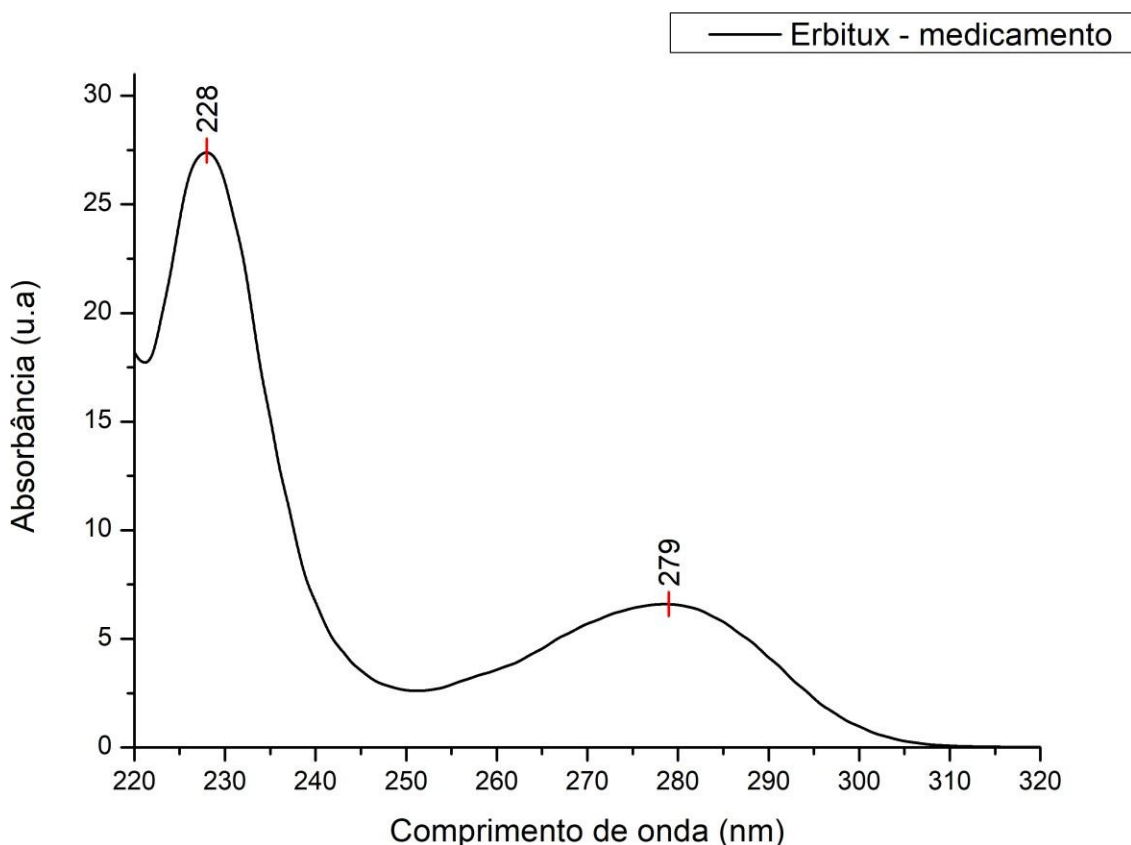
B – Deformação angular; BP – deformação angular no plano; EFP - Estiramento fora do plano; W – intensidade fraca; M- intensidade média; s – intensidade forte.

Fonte: O autor

### 5.2.2 Ligante CX

Inicialmente serão abordadas as caracterizações referentes ao erbitux e sua purificação e posteriormente ao ligante CX. Com o espectro de absorção no UV-visível e suas vibrações no infravermelho, foi possível assegurar a veracidade da purificação do CX. Na figura 44 temos o espectro de absorção na região de 220 nm à 320 nm do medicamento antes do processo de purificação. Apresenta duas bandas, uma em 228 nm e outra em 279 nm (127). A banda de 228 nm é referente às ligações peptídicas, que são importantes para determinar a estrutura da proteína. Por isso, a banda pode ter mudanças significativas, caso haja uma desnaturação da proteína e conseqüentemente do anticorpo como um todo (128). Enquanto, a banda em 279 nm está associada a presença dos anéis de aminoácidos presentes no anticorpo, como triptofano, tirosina e fenilalanina (129). Para validar a ausência de contaminantes biológicos significativos nesta formulação, sua razão 260/280 é de 0,54 (130).

Figura 44: Espectro de absorção na região do UV-vísivel utilizando o perfil A280 do Cetuximabe e seus sobrenadantes



Fonte: O autor

As bandas espectrais do FTIR de um polímero composto de aminoácidos são geralmente interpretadas em termos das vibrações de uma unidade de repetição estrutural. A cadeia de polipeptídeos e proteínas dá origem a nove bandas características de absorção no infravermelho, que são denominadas amida A, B e I-VII (131). . A tabela 3 apresenta o número de onda, o tipo de vibração e sua intensidade para cada atribuição referente às vibrações específicas tanto dos excipientes quanto do anticorpo. Seus excipientes têm uma variedade de grupos funcionais, dando origem a vibrações de alcenos, álcoois, ácidos carboxílicos e ésteres, que podem ser observadas no espectro da figura 45

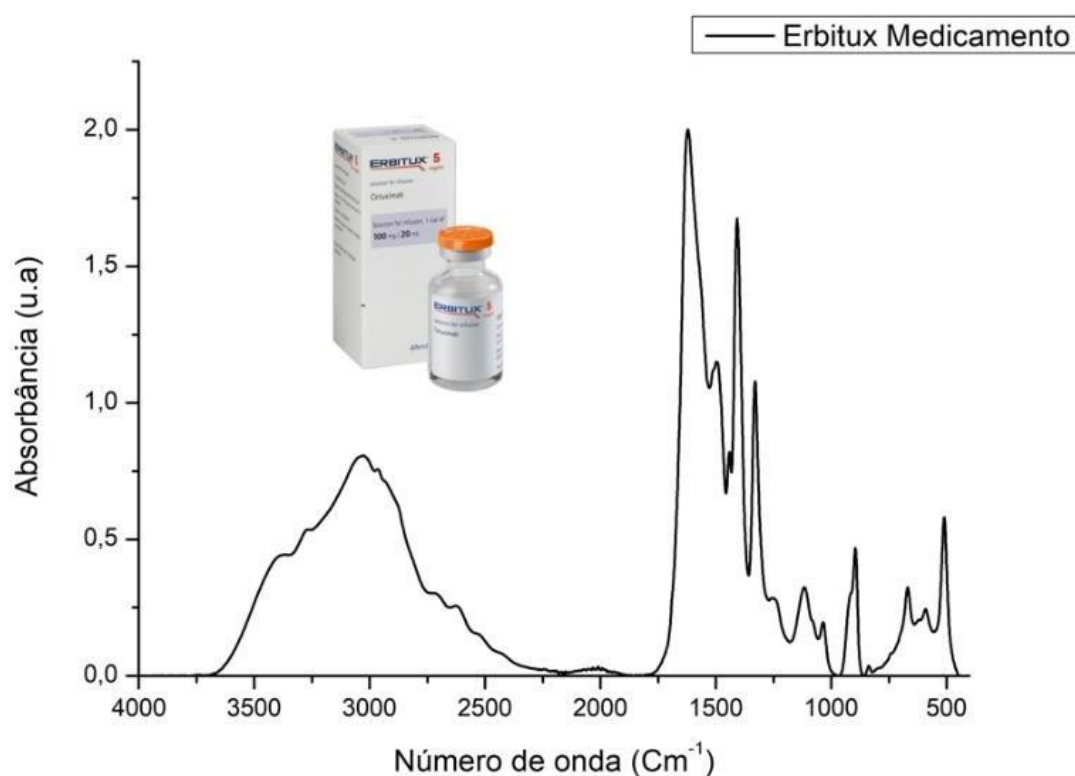
Tabela 3: Atribuições de bandas do espectro FTIR do Erbitux (Kong *et al.*, 2007; Krimm *et al.* 1986; Gremlich, 2001; Schrader, 1995; Wartewig, 2003; Ji *et al.* 2020; Stuart 2004)

Atribuição das bandas	Referências Literatura	Banda identificada (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibração	Intensidade
Amida A	3300-3500	3397	E	s
Amida B	3100	3136	E	w
Amida I	1600–1690	1659	E	m
Amida II	1480–1575	1593	B	m
Amida III	1250–1350	1235	E	m
Amida IV	625–767	668	B	w
Amida V	640–800	794	DFP	w
Amida VI	537–606	588	DFP	w
C=C de alceno dissubstituído	1600-1680	1628	E	m
O-H de ácido carboxílico	1825-1575	1406	B	m
C-O de álcoois terciários	1210–1110	1102	E	m
C-O de álcoois primários	1075-100	1035	E	s
C=C de alcenos dissubstituídos	980-960	974	B	m
C-H de alcenos dissubstituídos	730-665	727	W	w

B – Deformação angular; E – Estiramento; DFP - Deformação fora do plano; W – intensidade fraca; M-intensidade média; s – intensidade forte.

Fonte: O autor

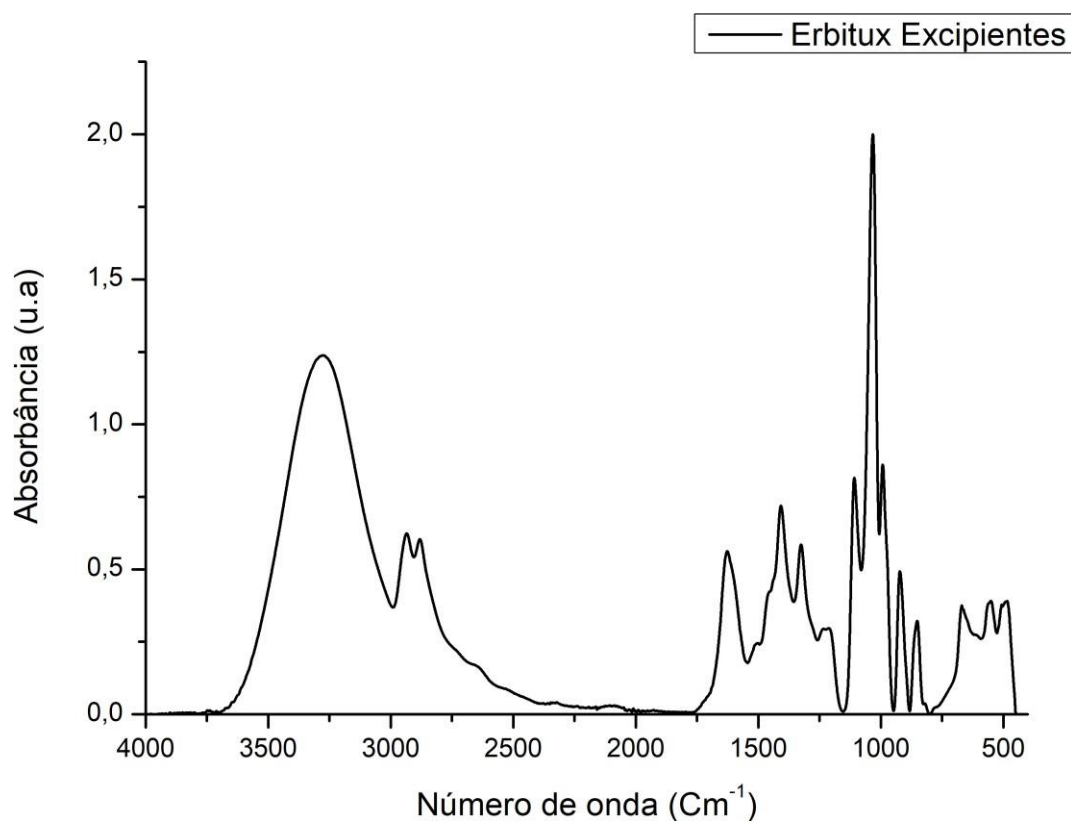
Figura 45: Espectro de FTIR do medicamento erbitux



Fonte: O autor

Os excipientes contidos no medicamento foram separados e analisados por meio de seu espectro no FTIR (figura 46) e absorção no UV-visível. Os alcenos dissustituídos, o álcool primário e o éster são referentes à molécula de polisorbato 80, o ácido carboxílico é pertencente a duas moléculas: glicina e ácido cítrico. Por fim, o álcool terciário é alusivo ao ácido cítrico. A tabela 4 evidencia as principais vibrações para posteriormente correlacionar com a sua remoção no final do processo de purificação.

Figura 46: Espectro de FTIR dos excipientes do medicamento erbitux

Tabela 4: Atribuições das bandas do espectro FTIR dos excipientes do Erbitux (Kong *et al.*, 2007; Krimm *et al.* 1986; Gremlich, 2001; Schrader, 1995; Wartewig, 2003; Ji *et al.* 2020; Stuart 2004)

Atribuição	Banda identificada (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibração	Intensidade
C=C de alceno dissubstituído	1628	E	m
O-H de ácido carboxílico	1406	B	m
C-O de álcoois terciários	1102	E	m
C-O de álcoois primários	1035	E	s
C=C de alcenos dissubstituídos	974	B	m
C-H de alcenos dissubstituídos	727	-	w

B – Deformação angular; E – Estiramento; W – intensidade fraca; M-intensidade média

Fonte: O autor

Comparando os resultados dos espectros de FTIR (figura 47) do Erbitux, dos seus excipientes e do Cetuximabe, é possível construir uma tabela (tabela

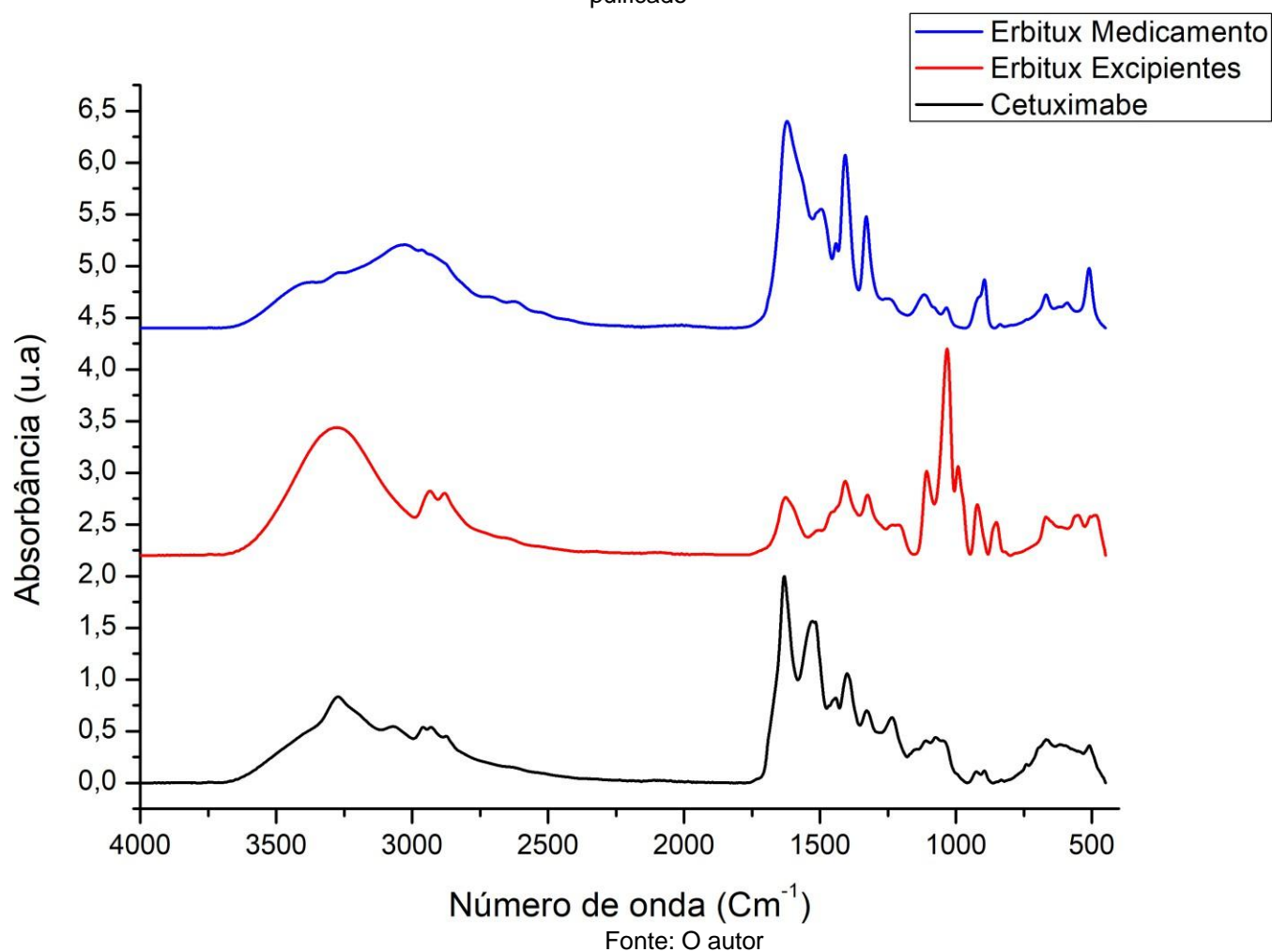
5) que considera o surgimento das bandas em cada um dos espectros, considerando um desvio de  $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$  para cada número de onda. É importante notar que a amida VII não pode ser detectada pelo equipamento e que a vibração em  $974 \text{ cm}^{-1}$ , devido à sua baixa intensidade, só é visível quando os excipientes são analisados sem a interferência das vibrações do CX. Por meio desta análise, pode-se concluir que as bandas dos excipientes estão ausentes no espectro do Cetuximabe, enquanto as bandas características dos anticorpos permanecem.

Tabela 5: Comparação dos espectros do Erbitux®, excipientes e Cetuximabe

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) ( $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ )	Erbitux®	Excipientes	Cetuximabe
3397 (Amida A)	X		X
3136 (Amida B)	X		X
1659 (Amida I)	X		X
1628	X	X	
1593 (Amida II)	X		X
1406	X	X	
1235 (Amida III)	X		X
1102	X	X	
1035	X	X	
974		X	
727	X	X	
668 (Amida IV)	X		X
794 (Amida V)	X		X

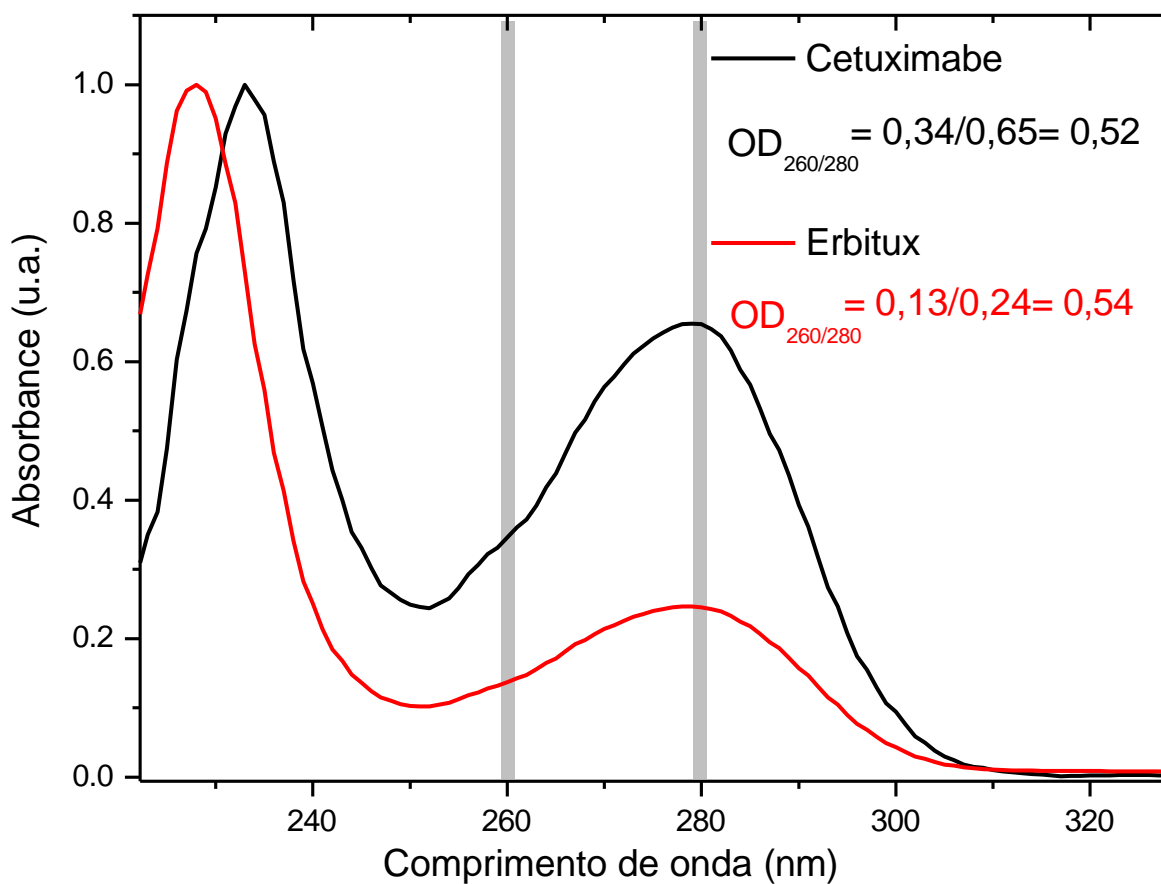
Fonte: O autor

Figura 47: Espectros de FTIR do medicamento erbitux, excipientes do erbitux e do erbitux purificado



O perfil A280 do espectro de absorção do Cetuximabe apresenta duas bandas, uma em 229 nm e outra em 279 nm (figura 48). A permanência da banda 229 nm demonstra uma permanência na sua estrutura e ausência de desnaturação do CX no processo de purificação. A banda 279 nm permanece a mesma, pois os anéis das moléculas triptofano, tirosina e fenilalanina continuam inalterados. Para demonstrar que não houve contaminações biológicas posteriores, sua razão 260/280 se manteve de 0,53 (130).

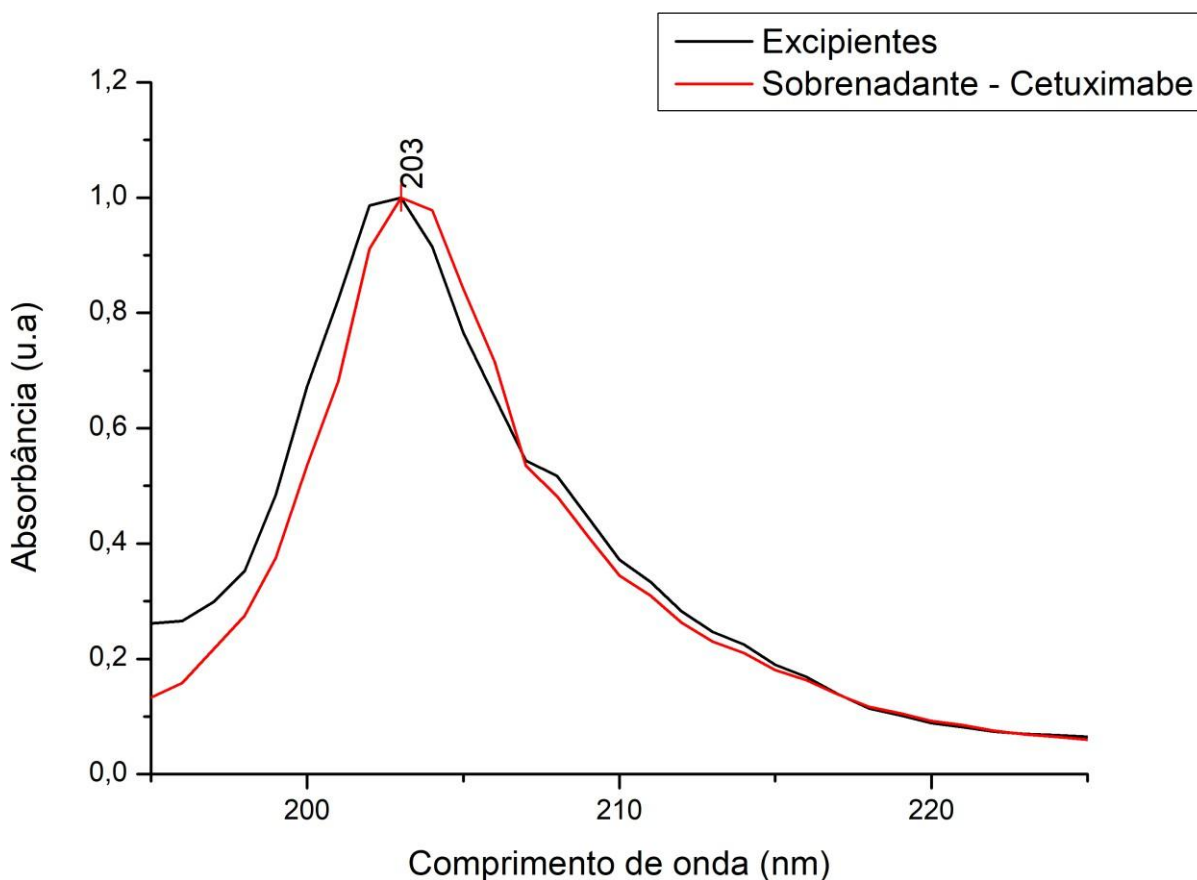
Figura 48: Espectro de absorção na região do UV-vísivel utilizando o perfil A280 do Cetuximabe e seus sobrenadantes



Fonte: O autor

No processo de centrifugação e lavagem do erbitux, é formado um sobrenadante que é removido para assegurar sua purificação. Este sobrenadante possui a mesma banda de maior absorção que os excipientes provenientes da formulação do medicamento (figura 49). Estes excipientes são uma formulação com as devidas proporções de cada componente descrito na bula do medicamento (com exceção do anticorpo). Obtendo assim uma purificação efetiva, mantendo apenas o CX com suas características fotofísicas inalteradas.

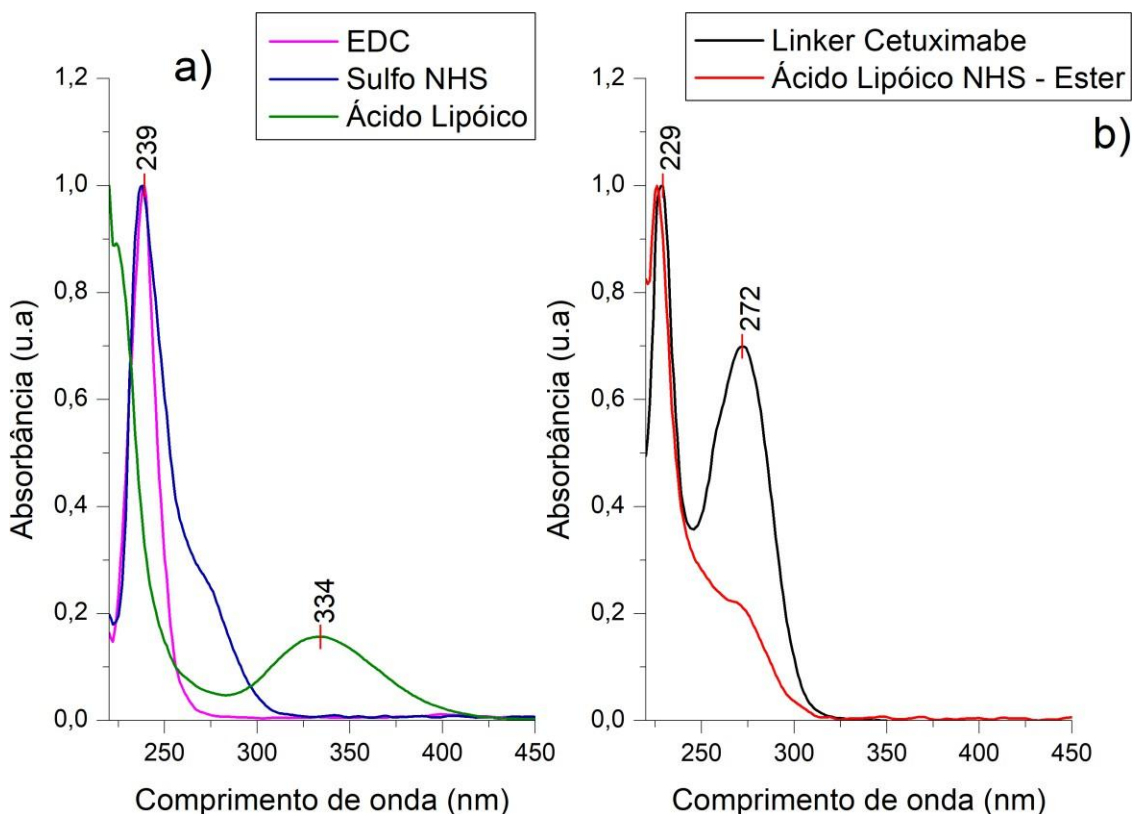
Figura 49: Espectros de absorção na região do UV-visível dos excipientes e os sobrenadantes do cetuximabe.



Fonte: O autor

Para o ligante CX, temos absorções em 239 nm (figura 50 – a) referentes aos componentes essenciais da reação de carbodiimida, sendo eles o sulfeto NHS e o EDC. A molécula de alfa ácido lipóico possui um anel heterocíclico de cinco membros que contém dois átomos de enxofre vizinhos, e portanto, adquire a capacidade de absorver em 334 nm (130). Para demonstrar a permanência das características fotofísicas do anticorpo (figura 50 – b), assim como sua estrutura, temos suas absorções em 229 nm e 272 nm. A ausência das bandas de 239 no ligante CX é evidente já que sua absorção sofreu um *redshift* de 10 nm, e o desaparecimento total da banda do alfa ácido lipóico indica que o anel foi aberto para poder realizar sua ligação com o CX, perdendo assim sua capacidade de absorção na faixa do UV-visível. Importante ressaltar que a banda de 279 nm é a evidência de que houve a adição do CX em sua conformação original.

Figura 50: Espectro de absorção na região do UV-vísivel utilizando o perfil A280 do linker cetuximabe e seus sobrenadantes (a) e do linker cetuximabe e seus reagentes (b)



Fonte: O autor

Comparando os resultados dos espectros de FTIR (figura 51) do Cetuximabe, alfa ácido lipóico e ligante CX, é possível construir a tabela 6, na qual indica suas vibrações correlacionadas com os componentes da formulação, como as vibrações em  $3402\text{ cm}^{-1}$  (Amida A),  $3236\text{ cm}^{-1}$  (Amida B),  $1689\text{ cm}^{-1}$  (Amida I),  $1513\text{ cm}^{-1}$  (Amida II),  $1401\text{ cm}^{-1}$  (Amida III) e  $1238\text{ cm}^{-1}$  (Amida III) referentes ao Cetuximabe. O surgimento de três bandas na faixa de  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $2800\text{ cm}^{-1}$  relacionadas às vibrações CH e CH<sub>2</sub> do alfa ácido lipóico e CH<sub>3</sub> do Cetuximabe. Essas três bandas podem ser observadas no Cetuximabe, porém numa intensidade muito menor. Quando unido com o alfa ácido lipóico, há um aumento significativo na intensidade destas bandas. Em  $1724\text{ cm}^{-1}$  há uma vibração correspondente ao ligante ce6, sendo correlacionada ao estiramento C=O em amidas secundárias da ligação formada entre o ácido lipóico e o Cetuximabe. Esta vibração está também no espectro do alfa ácido lipóico, mas correlacionada ao C=O de ácidos carboxílicos.

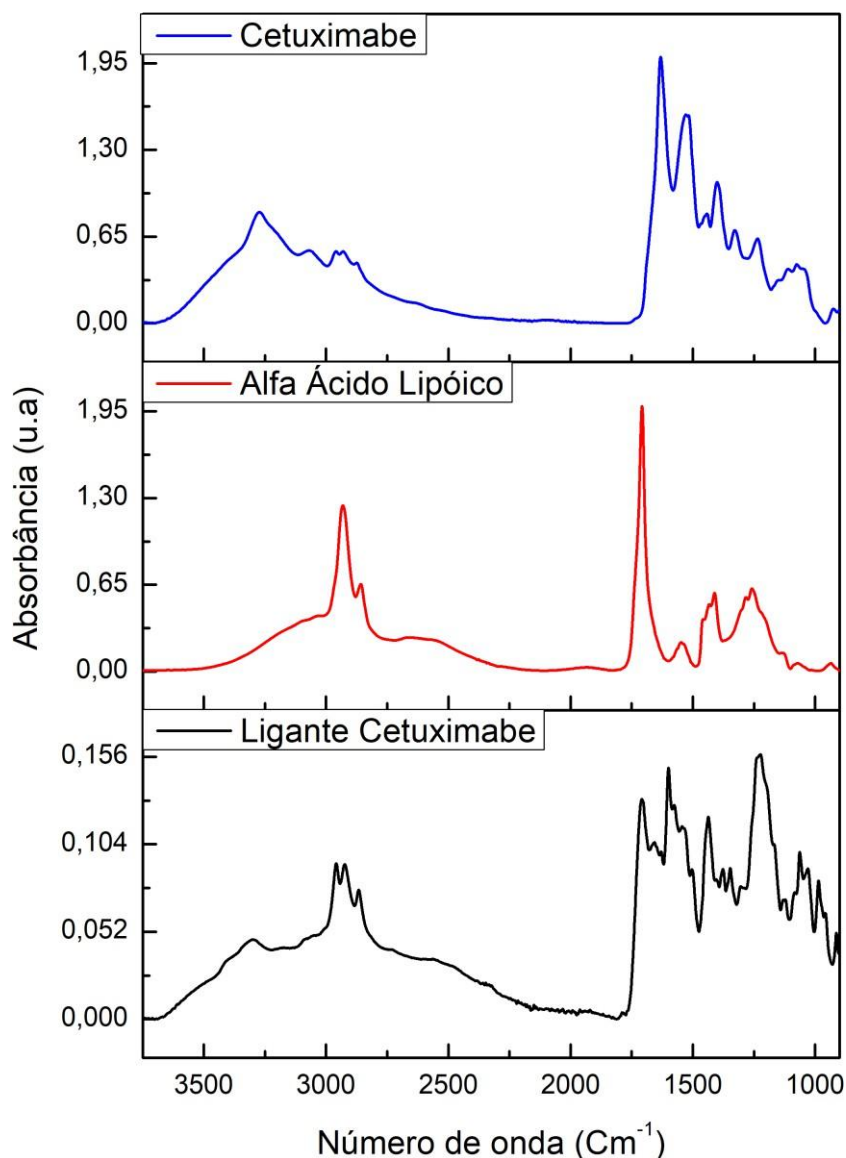
Tabela 6: Atribuições de bandas do espectro FTIR do ligante CX (Kong *et al.*, 2007; Krimm *et al.* 1986; Gremlich, 2001; Schrader, 1995; Wartewig, 2003; Ji *et al.* 2020; Stuart 2004)

Atribuição	Referências Literatura	Banda identificada (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de vibração	Intensidade
N-H em amidas (Amida A)	3300-3500	3402	E	w
N-H do íon NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> em aminoácidos (Amida B)	3100	3236	EA	m
C-H no grupo CH <sub>3</sub>	2975-2952	2968	EA	w
C-H no grupo CH <sub>2</sub>	2940-2915	2944	EA	w
C-H no grupo CH	2990-2850	2903	EA	w
C=O em amida secundária	1715	1724	E	s
C=O em amida (Amida I)	1600–1690	1689	B	w
NH em amidas secundárias (Amida II)	1480–1575	1513	B	w
O-H	1440-1400	1439	BP	w
C-N em amida primária (Amida III)	1420-1400	1401	E	m
C-H no grupo CH <sub>2</sub>	1300-1190	1254	T	w
N-H em amidas (Amida III)	1250–1350	1238	B	m

B – *Deformação angular*; BP – *deformação angular no plano*; E - Estiramento; EA – Estiramento assimétrico; T – Twisting; W – intensidade fraca; M-intensidade média; s – intensidade forte.

Fonte: O autor

Figura 51: Espectros de FTIR do Cetuximabe, do alfa ácido lipóico e do ligante CX



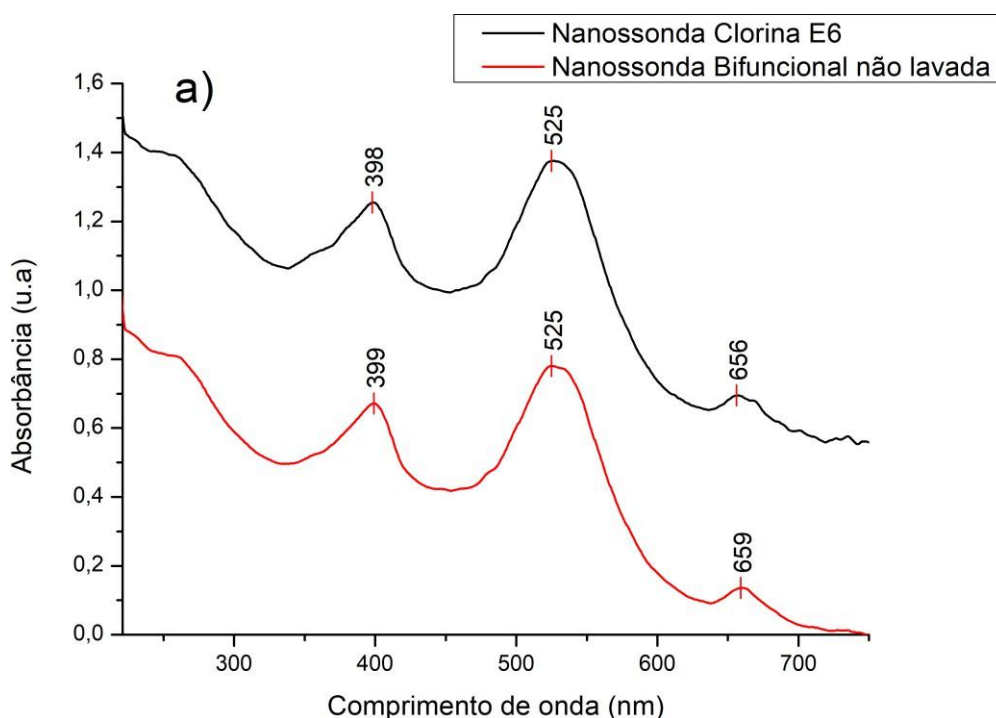
Fonte: O autor

### 5.3 NANOSSONDAS

As NS foram caracterizadas utilizando análises da sua absorção no UV-visível e no infravermelho; da sua emissão de fluorescência; de seu DH e de sua estabilidade eletrostática. As características de cada absorção no UV-visível das NS ce6 já são bem discutidas e conhecidas. Apresentando bandas em 400 nm (banda de soret), 525 nm (banda da NPs) e 659 nm (banda Q) (126). Ao adicionar o CX na formulação contendo as NS ce6 (formando a NS bifuncionais não lavada), não é possível observar mudanças significativas porque as transições

eletrônicas, que ocorrem em cada átomo de ouro envolvido na nanopartícula contribuem na região do ultravioleta, mostrando um gráfico largo demais no início do espectro de forma que as absorções do CX são sobrepostas. As bandas da ce6, por outro lado, não sofrem este efeito pois a absorvidade da molécula fotossensível é consideravelmente alta, tornando suas bandas evidentes. Em 659 nm há um deslocamento de 3 nm (*redshift*) e um leve aumento de sua intensidade, demonstrando que o anticorpo não está afetando na absorção que foi utilizada no processo da TFD (figura 52).

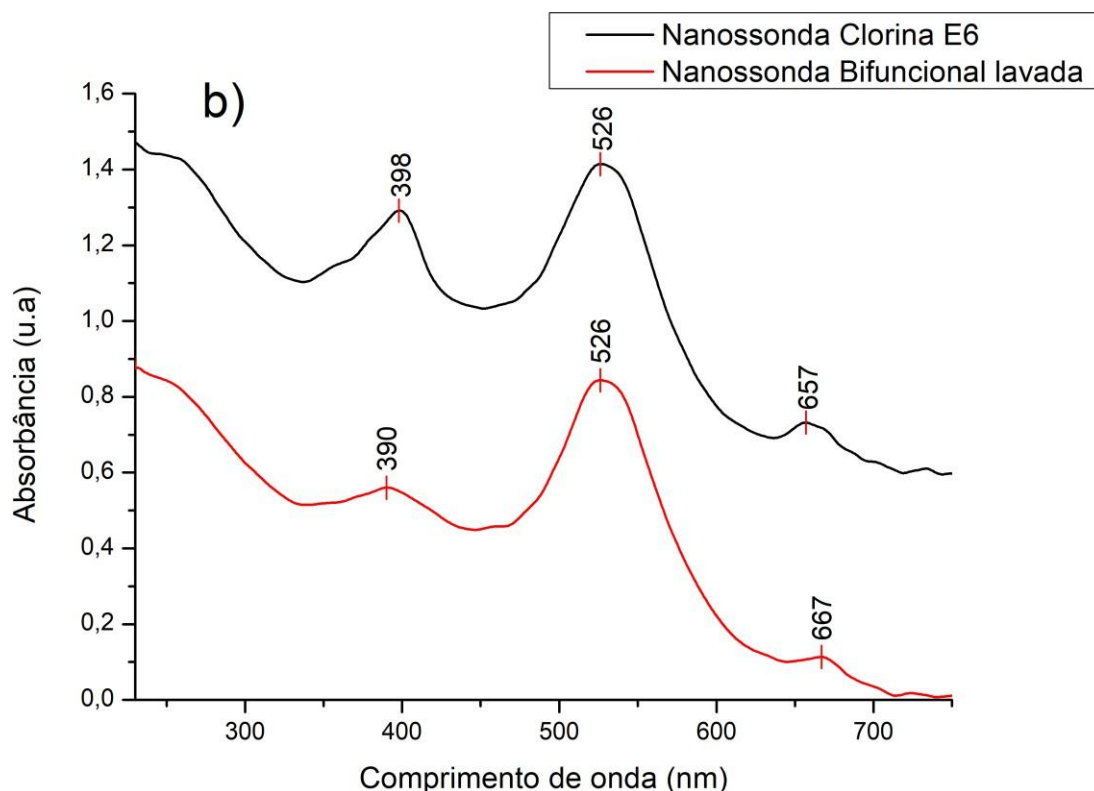
Figura 52: Espectro normalizado de absorção na região do UV-vísivel das nanossondas bifuncional, bifuncional lavada e clorina e6



Fonte: O autor

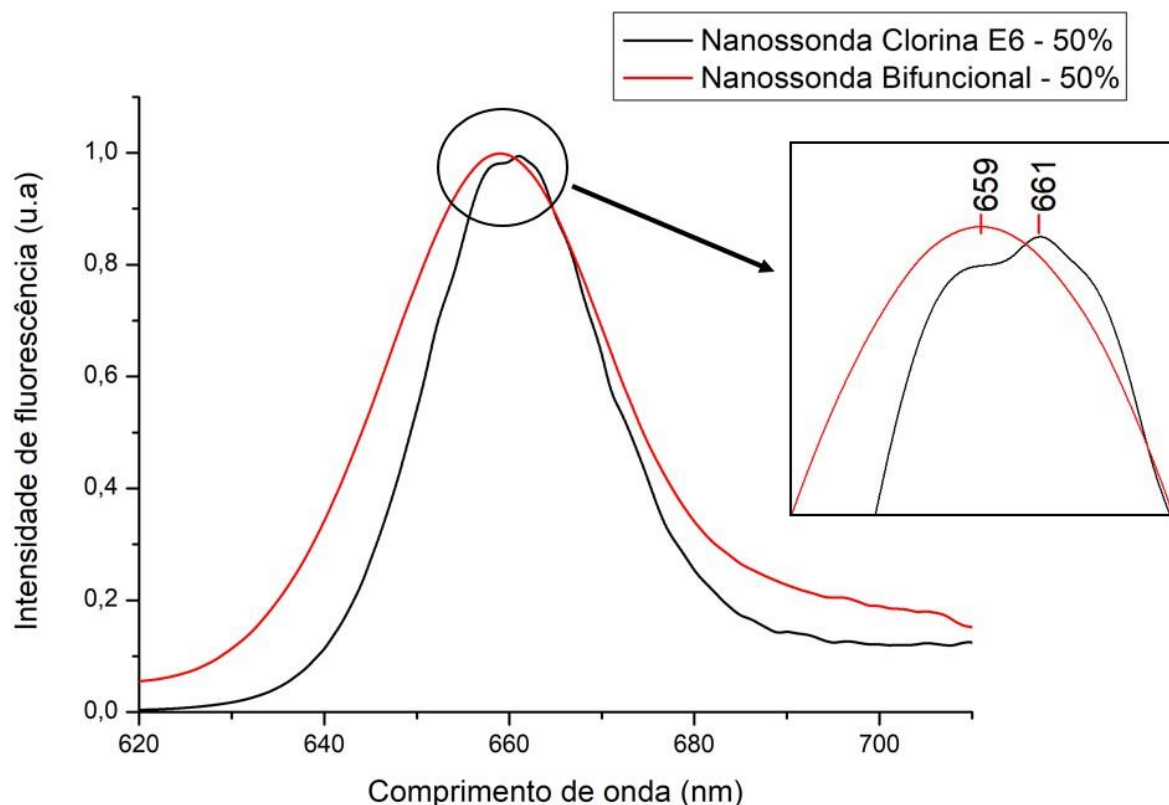
Após a lavagem, a NS bifuncional apresenta um espectro de absorção mais atenuado nas bandas de solet e banda Q (figura 53) e um aumento na absorção referente às AuNPs. Essas mudanças são coerentes, tendo em vista que o objetivo da lavagem é retirar as moléculas que não reagiram que não conseguiram se ligar à nanopartícula, dessa forma restando apenas as AuNPs funcionalizadas.

Figura 53: Espectro normalizado de absorção na região do UV-vísivel das nanossondas bifuncional, bifuncional lavada e clorina e6



Seu espectro de emissão de fluorescência teve um leve *blueshift* depois de ter sido funcionalizada com o CX, indo de 661 nm para 659 nm. Sendo este deslocamento pouco significativo, já que está dentro do erro de 2 nm esperado por uma análise de emissão de fluorescência (figura 54). O motivo de tal deslocamento pode ter sido por conta da diminuição de energia concedida ao FS, fazendo com que seu comprimento de onda de emissão diminua. Desta forma, demonstrando que a formulação final, mesmo com o CX funcionalizado, ainda terá sua emissão na faixa necessária para o oxigênio tripleto absorver e se converter para oxigênio singleto.

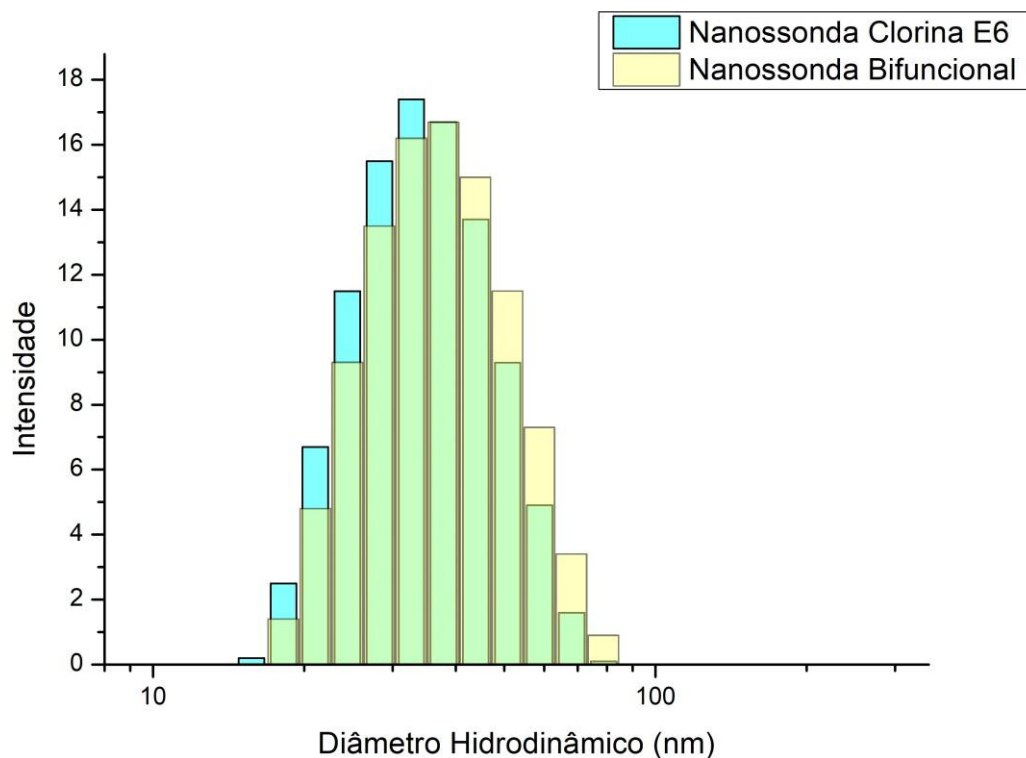
Figura 54: Espectro normalizado de emissão de fluorescência na região do UV-vísivel das nanossondas bifuncional e clorina e6



Fonte: O autor

Os resultados de Size demonstram um aumento do DH comparado com a NS ce6 (figura 55) indicando uma funcionalização do CX no entorno da partícula. Obtendo valores de 29,24 nm para a NS.C e de 37,84 nm para a NS.B. Seu Pdl teve valores de 0,231 para a NS bifuncional e 0,219 para a NS clorina e6 (figura 55) significando uma maior homogeneidade do sistema. A intensidade não tem ligação direta ao DH da partícula, ela apresenta o número de floculações ao longo do tempo, seu valor pode ser maior mesmo estando em tamanhos menores, o que vai definir é a quantidade de partículas espalhando a luz naquele DH específico obedecendo à equação de Stokes-Einstein.

Figura 55: Distribuição do diâmetro hidrodinâmico das nanossondas clorina e6 e nanossonda bifuncional



Fonte: O autor

O potencial zeta da NS bifuncional foi de  $-40,7$  mV e o da NS ce6 foi de  $-42,5$  mV. A leve diminuição em seu potencial zeta é uma indicação de partículas de diferentes cargas aderindo na superfície, fazendo o potencial diminuir um pouco. Como a superfície é negativa e o CX possui o seu terminal amina, no qual é positivo, pode ocorrer uma leve diminuição no potencial zeta. Mesmo com essas alterações, a partícula ainda permanece estável eletrostaticamente e estéricamente. Sua estabilidade estérica se mantém por conta da ce6 estar em maior quantidade na superfície da partícula impedindo que ocorra uma desestabilização quando o CX, que possui um tamanho muito maior, seja adsorvido.

Ao comparar os espectros de FTIR de amostras de NS ce6 e NS bifuncional (figura 56), podemos observar a permanência das vibrações dos anéis da ce6, bem como a permanência das amidas associadas ao CX. Além disso, em  $1734\text{ cm}^{-1}$ , aparece uma vibração C=O de amidas secundárias, que

corresponde com a ligação formada durante a reação de carbodiimida, indicando que não houve quebra ou formação adicional de ligações durante o processo de recobrimento das AuNPs.

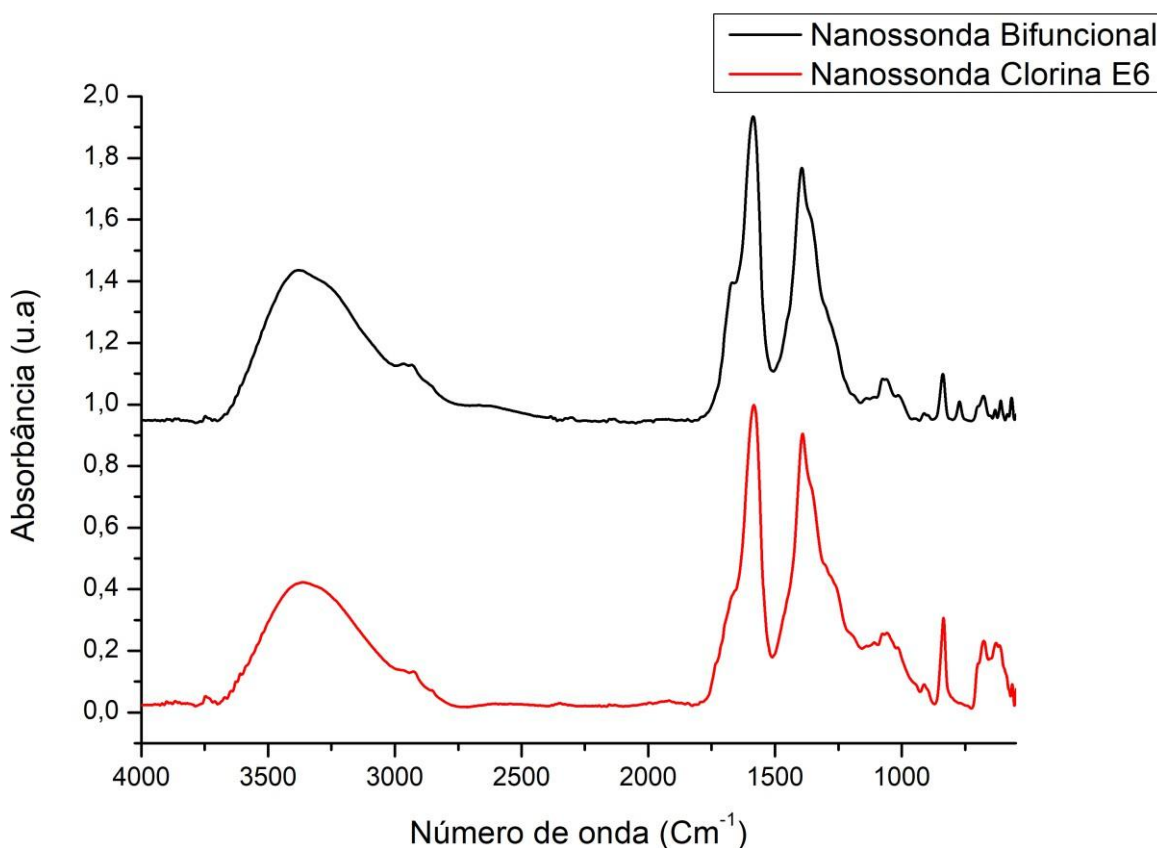
Tabela 7: Bandas características do espectro de FTIR referente à nanossonda bifuncional

<b>Atribuição</b>	<b>Referências Literatura</b>	<b>Banda identificada (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tipo de vibração</b>	<b>Intensidad e</b>
N-H em amidas (Amida A)	3300-3500	3545	E	w
N-H do íon NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> em aminoácidos (Amida B)	3100	3236	EA	w
C=O de amidas secundárias	1690-1710	1734	-	w
C=O em amidas secundárias (Amida I)	1600-1690	1675	E	m
C-C-H das pontes	1544	1587	-	s
CN em amidas (Amida II)	1480-1575	1489	E	w
C-N em amida primária (Amida III)	1250-1350	1394	E	m
C-C-N em aminas	1100-1230	1219	B	w
C-N dos anéis (I, II, III)	1130	1143	-	w
C-C-H do grupo etil do anel II	1063	1056	-	w
C-C-H dos anéis (I, II, III, IV)	1029	1011	-	w
O-C-N em amidas (Amida IV)	625-767	766	B	w
C=O em amidas (Amida VI)	537-606	604		w

*B - Deformação angular; BFP - deformação angular fora do plano; E - Estiramento; EA - Estiramento assimétrico; W - intensidade fraca; M-intensidade média; s - intensidade forte.*

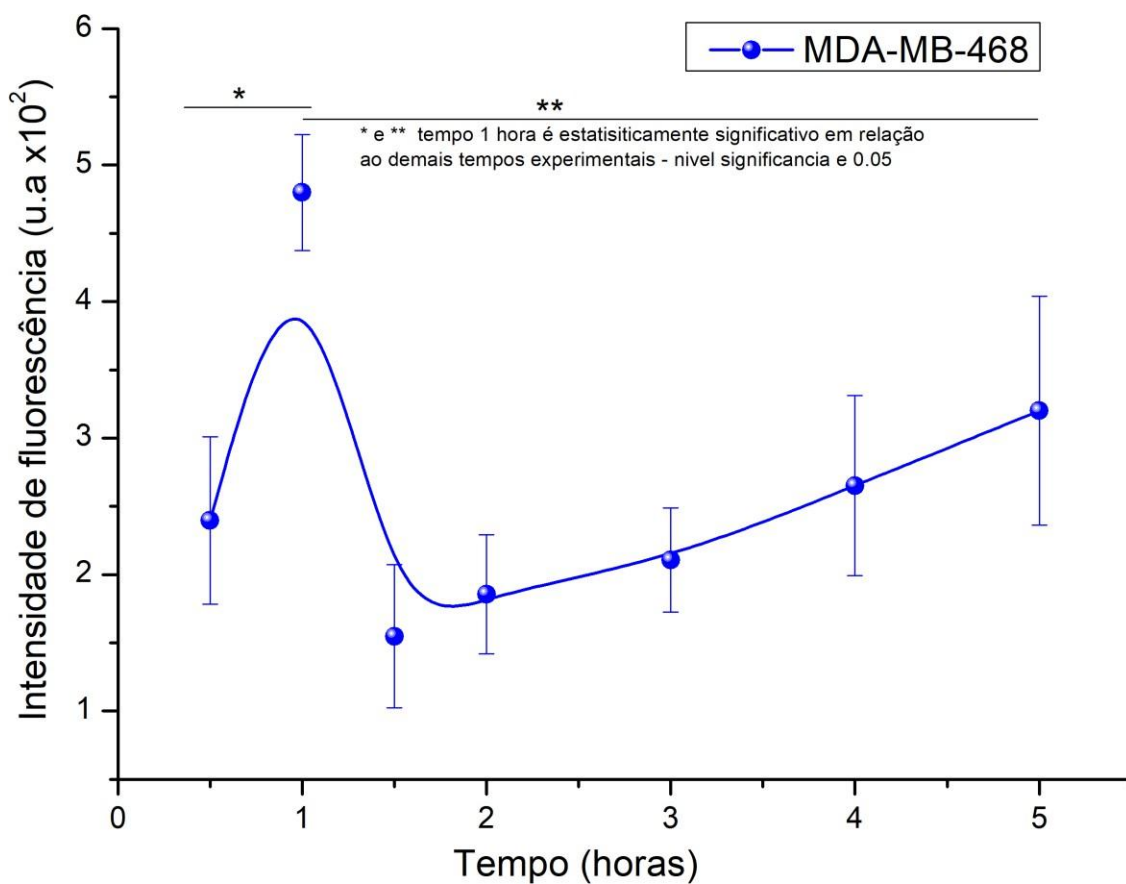
Fonte: O autor

Figura 56: Espectros de FTIR da nanossonda bifuncional e da nanossonda ce6



Na análise de internalização da NB na linhagem celular MDA-MB-468, foi utilizado o método estatístico de ANOVA com teste de Tukey com a finalidade de determinar o grupo de maior significância dentre os tempos (30 mim, 1 h, 1:30 mim, 2h, 3h, 4h, 5h). O teste demonstrou que a diferença das médias e o valor de p indicaram que o grupo de maior significância foi o de 1 h, evidenciando uma maior internalização das NB. Portanto, após 1 hora de incubação, há maior número de NB internalizadas na célula tumoral. Este resultado é bastante satisfatório, uma vez que estudos anteriores do grupo mostraram que as nanossondas funcionalizadas com EGF levam o dobro do tempo para atingir resultado semelhante (132). Na figura 57, é possível observar inicialmente um aumento da internalização das NB até seu pico máximo em 1h, após este período há uma diminuição em virtude da eliminação das NB pelas células, e voltando a aumentar de forma mais atenuada até o período de 5h.

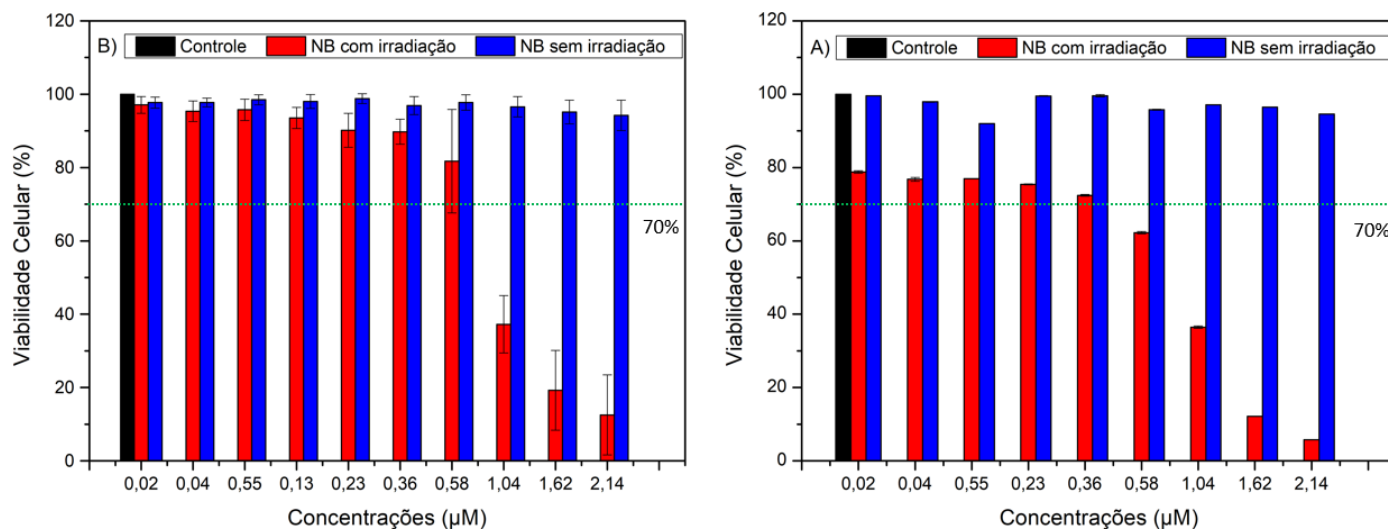
Figura 57: Tempo de internalização da NB na linhagem celular MDA-MB-468



Fonte: O autor

Os testes de citotoxicidade das NB na linhagem celular MDA-MB-468 foram realizados por meio do ensaio de exclusão pelo azul de tripan e da avaliação da atividade mitocondrial utilizando o ensaio do MTT (figura 58). Segundo a norma ISO 10993-5:2009 (133), a viabilidade celular pode ser avaliada com base na atividade metabólica, sendo considerado potencialmente citotóxico um material que reduza a viabilidade celular para valores inferiores a 70%. A análise baseada no indicador colorimétrico MTT permite determinar a concentração mínima necessária para causar a morte celular, quantificando a atividade da desidrogenase associada aos produtos da reação do NADH ou NADPH. Esse processo resulta na conversão do composto MTT para cristais de formazan nas células metabolicamente ativas (134). Sendo a intensidade de absorção deste cristal o parâmetro analisado para determinar as mortes celulares.

Figura 58: Gráfico demonstrando a redução da viabilidade celular conforme há o aumento da concentração das NB irradiadas, as NB que não foram irradiadas não apresentam mudança significativa



Fonte: O autor

No ensaio de exclusão pelo azul de tripan é avaliado a viabilidade celular com base na integridade da membrana plasmática. O corante azul de tripan é impermeável às células viáveis, sendo excluído do citoplasma devido à integridade da membrana celular. No entanto, células danificadas ou mortas apresentam perda da seletividade da membrana, permitindo a penetração do corante e resultando em coloração azulada no citoplasma. Ambas as metodologias indicaram que as NB não apresentam citotoxicidade significativa nas concentrações testadas, que variaram de 0,08 µM a 8,57 µM. As NB contendo TFT demonstraram efeito citotóxico na linhagem celular MDA-MB-468, conforme evidenciado pelos ensaios de exclusão pelo azul de tripan e pela atividade mitocondrial medida pelo ensaio do MTT. Os resultados indicam uma redução na viabilidade celular proporcional ao aumento da concentração de ce6 presente nas NB.

## 6 CONCLUSÃO

As AuNPs foram sintetizadas com sucesso pelo método de redução química por citrato. Sua estabilidade eletrostática foi analisada por meio do seu potencial zeta caracterizando uma nanopartícula estável. Seu diâmetro hidrodinâmico analisado pelo DLS foi de 20,45 nm sendo este um valor coerente e esperado pela literatura. Sua banda de RPS foi observada em 520 nm, proporcionando assim uma esfera estável. A modificação da estrutura da molécula ce6 e do anticorpo CX formando os ligantes foram realizadas com sucesso por meio da reação de carbodiimida, sendo a ligação amida formada caracterizada pela vibração  $1734\text{ cm}^{-1}$ , seu espectro de absorção se manteve constante evidenciando a permanência das características fotofísicas e a ce6 modificada obteve um espectro de emissão de fluorescência correspondente a uma molécula de ce6 sem modificação. A NB obteve resultados promissores, demonstrando um leve aumento em seu DH, sua estabilidade eletrostática e estérica, assim como seu FTIR com todas as ligações necessárias para evidenciar a formação da amida e de suas ligações, e seu espectro no UV-visível evidenciando a permanência do potencial terapêutico, ou seja, mantendo suas características fotofísicas. Outro ponto bastante importante é a redução do tempo de internalização, que permite fazer a terapia em menor tempos após a aplicação das NB. Os ensaios citotxicológicos demonstraram um declínio da viabilidade celular. A maior concentração obteve um valor abaixo de 6% em ambas as metodologias, caracterizando uma efetividade da NB em promover a morte celular.

## REFERENCIAS

- 1- KATSURA, C. *et al.* Breast cancer: presentation, investigation and management. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 83, n. 2, p. 1–7, 2 fev. 2022.
- 2- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br>.
- 3- SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2023. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 73, n. 1, p. 17–48, 12 jan. 2023.
- 4- GREENHALGH, T. A.; SYMONDS, R. P. Principles of chemotherapy and radiotherapy. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, v. 24, n. 9, p. 259–265, set. 2014.
- 5- NICULESCU, A.-G.; GRUMEZESCU, A. M. Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review. **Applied Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3626, 2021.
- 6- CHEN, H. *et al.* Membrane-Anchoring Photosensitizer with Aggregation- Induced Emission Characteristics for Combating Multidrug-Resistant Bacteria. **Angewandte Chemie**, v. 59, n. 2, p. 632–636, 2019.
- 7- YANG, H. *et al.* Photosensitizer Nanoparticles Boost Photodynamic Therapy for Pancreatic Cancer Treatment. **Nano-Micro Letters**, v. 13, n. 1, 2021.
- 8- KO, W.-C. *et al.* Pharmacological Role of Functionalized Gold Nanoparticles in Disease Applications. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1551, 2022.
- 9- GEORGE, B. P.; ABRAHAMSE, H. Passive and Active Tumor Targeting in Photodynamic Therapy of Cancer: Mini-Review. **Journal of Biomedical Photonics & Engineering**, v. 10, n. 4, p. 040201–040201, 2024.
- 10- RUGGIERO, E. *et al.* Upconverting nanoparticles for the near infrared photoactivation of transition metal complexes: new opportunities and challenges in medicinal inorganic photochemistry. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 33, p. 13012–13020, 2016.
- 11- BAROLET, D. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, n. 4, p. 227–238, dez. 2008.
- 12- MARCONI, A. *et al.* Dissecting the Interactions between Chlorin e6 and Human Serum Albumin. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2348–2348, 3 mar. 2023.
- 13- LIAO, S. *et al.* Antitumor Effect of Photodynamic Therapy/Sonodynamic Therapy/Sono-Photodynamic Therapy of Chlorin e6 and Other Applications. **Molecular pharmaceuticals**, v. 20, n. 2, p. 875–885, 2023.
- 14- MOJZISOVA, H. *et al.* The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: A physico-chemical approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1768, n.

2, p. 366–374, 2007.

- 15- BASELGA, J. The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 16–22, 2001.
- 16- GOULET, D. R. *et al.* Engineering an Enhanced EGFR Engager: Humanization of Cetuximab for Improved Developability. **Antibodies**, v. 11, n. 1, p. 6, 13 jan. 2022.
- 17- MAKKI, A. A. *et al.* Understanding the discrimination and quantification of monoclonal antibodies preparations using Raman spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 194, p. 113734, 2021.
- 18- HE, H. *et al.* Molecular imaging nanoprobe for theranostic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 186, p. 114320, 2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114320>
- 19- GAO, P. *et al.* COF-DNA Bicolor Nanoprobes for Imaging Tumor- Associated mRNAs in Living Cells. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 38, p. 13293–13299, 2022.
- 20- WANDERI, K.; CUI, Z. Organic fluorescent nanoprobe with NIR-IIb characteristics for deep learning. **Exploration**, v. 2, n. 2, p. 20210097, 2022.
- 21- MA, J. *et al.* Individual Plasmonic Nanoprobes for Biosensing and Bioimaging: Recent Advances and Perspectives. **Small**, v. 17, n. 8, 1 fev. 2021.
- 22- HOSSAIN, N. *et al.* Advances and significances of nanoparticles in semiconductor applications – A review. **Results in engineering**, v. 19, p. 101347–101347, 2023.
- 23- EDVINSSON, T. Optical quantum confinement and photocatalytic properties in two-, one- and zero-dimensional nanostructures. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 9, p. 180387, 2018.
- 24- CHENG, L. Multiple-Quantum-Well Perovskites for High-Performance Light-Emitting Diodes. **Advanced Materials**, v. 32, n. 15, 8 out. 2019.
- 25- LUO, L. *et al.* MXene-GaN van der Waals metal-semiconductor junctions for high performance multiple quantum well photodetectors. **Light: Science & Applications**, v. 10, n. 1, 2 set. 2021.
- 26- CUI, Q. *et al.* A New Metal-Free Molecular Perovskite-Related Single Crystal with Quantum Wire Structure for High-Performance X-Ray Detection. **Small**, v. 20, n. 13, 10 nov. 2023.
- 27- SHOUKAT, R.; KHAN, M. I. Carbon nanotubes: a review on properties, synthesis methods and applications in micro and nanotechnology. **Microsystem Technologies**, v. 27, n. 12, p. 4183-4192, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00542-021-05211-6> 2021.
- 28- ZHENG, J. *et al.* Gold Nanorods: The Most Versatile Plasmonic Nanoparticles. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 21, p. 13342–13453, 2021.

- 29- FAN, J.; SUN, M. Nanoplasmonic Nanorods/Nanowires from Single to Assembly: Syntheses, Physical Mechanisms and Applications. **The Chemical Record**, v. 20, n. 9, p. 1043–1073, 2020.
- 30- ZHU, M.; WANG, S. Functional Nucleic-Acid-Decorated Spherical Nanoparticles: Preparation Strategies and Current Applications in Cancer Therapy. **Small science**, v. 1, n. 3, 9 fev. 2021.
- 31- CÂNDIDO, M. *et al.* Gold-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized to EGF and Ce6 Complexes for Breast Cancer Diagnoses and Therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 100–100, 28 dez. 2022.
- 32- PINTO, B. C. S. *et al.* Synthesis, characterization, and evaluation of chloroaluminium phthalocyanine incorporated in poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 38, p. 102850, 2022.
- 33- RAGHUNANDAN, R. *et al.* A review of applications of principles of quantum physics in oncology: do quantum physics principles have any role in oncology research and applications? **Journal of Radiotherapy in Practice**, v.18, n.4, p. 383-394, 2019. <https://doi.org/10.1017/s1460396919000153>.
- 34- KLEIN, A. *et al.* The Fermi energy as common parameter to describe charge compensation mechanisms: A path to Fermi level engineering of oxide electroceramics. **Journal of electroceramics**, v. 51, n. 3, p. 147–177, 2023.
- 35- ZHAO, J.; HOLMES, M. A.; OSTERLOH, F. E. Quantum Confinement Controls Photocatalysis: A Free Energy Analysis for Photocatalytic Proton Reduction at CdSe Nanocrystals. **ACS Nano**, v. 7, n. 5, p. 4316–4325, 24, 2013.
- 36- OZCICEK, I. *et al.* The effects of surface functionality and size of gold nanoparticles on neuronal toxicity, apoptosis, ROS production and cellular/suborgan biodistribution. **Materials Science and Engineering: C**, v. 128, p. 112308, 2021.
- 37- SENUT, M.-C. *et al.* Size-Dependent Toxicity of Gold Nanoparticles on Human Embryonic Stem Cells and Their Neural Derivatives. **Small**, v. 12, n. 5, p. 631–646, 16 dez. 2015.
- 38- PAN, Y. *et al.* Gold Nanoparticles of Diameter 1.4 nm Trigger Necrosis by Oxidative Stress and Mitochondrial Damage. **Small**, v. 5, n. 18, p. 2067– 2076, 18 set. 2009.
- 39- KHALILI FARD, J.; JAFARI, S.; EGHBAL, M. A. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 5, n. 4, p. 447–454, 2015.
- 40- LI, J. J. *et al.* Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, n. 23, p. 5996–6003, ago. 2010.
- 41- KHANNA, V. K. Nanomaterials and Their Properties. *In*: KHANNA, V. K. **Nanoscience and technology**, 2016. p. 25–41. 10.1007/978-81-322-3625-2\_3

- 42- YANG, C.; WONG, C. P.; YUEN, M. M. F. Printed electrically conductive composites: conductive filler designs and surface engineering. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 26, p. 4052, 2013.
- 43- GOYAL, M. Shape, size and phonon scattering effect on the thermal conductivity of nanostructures. **Pramana**, v. 91, n. 6, 13 out. 2018.
- 44- RAWAT, K.; GOYAL, M. Thermal conductivity dependence on shape and size in nanomaterials. **Materials Today: Proceedings**, v. 81, p.1132-1137, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.409>.
- 45- ASHA, A. B.; NARAIN, R. Nanomaterials properties. *In*: NARAIN, R. (ed.). **Polymer Science and Nanotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 343–359.
- 46- RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 7, p. 583, 2006.
- 47- MALIK, M. A. Compound semiconductors: chalcogenides. *in*: REEDIJK, J.; POEPELMEIER, K. (eds.). **Comprehensive Inorganic Chemistry II**. Amsterdam: Elsevier, 2013. p.177-210. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-097774-4.00411-3>.
- 48- PATEL, J. K.; PATEL, A.; BHATIA, D. Introduction to Nanomaterials and Nanotechnology. *In*: PATEL, J. K.; PATHAK, Y. V. **Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing**. Switzerland: Springer Nature 2021. p. 3–23. [10.1007/978-3-030-50703-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50703-9_1)
- 49- HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 1, p. 13–28, jan. 2010.
- 50- TUNCER, E. Dielectric mixtures-importance and theoretical approaches. **IEEE electrical insulation magazine**, v. 29, n. 6, p. 49–58, 2013. [10.1109/mei.2013.6648753](https://doi.org/10.1109/mei.2013.6648753)
- 51- ZHAROV, A. A. *et al.* Grading plasmonic nanoparticles with light. **Physical review. A/Physical review, A**, v. 93, n. 1, 12 jan. 2016
- 52- LOCARNO, M.; BRINKS, D. Analytical calculation of plasmonic resonances in metal nanoparticles: A simple guide. **American Journal of Physics**, v. 91, n. 7, p. 538–538, 1 jul. 2023.
- 53- HAMMAMI, I. *et al.* Gold nanoparticles: Synthesis properties and applications. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, n. 7, p. 101560, 1 out. 2021.
- 54- ZHANG, Y. *et al.* Electrical and thermal conductivities of gold and silver nanoparticles in solutions and films and electrical field enhanced Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). **Proceedings of SPIE**, v. 5929, Physical Chemistry of Interfaces and Nanomaterials IV, 592912, 18 Aug. 2005. <https://doi.org/10.1117/12.614499>.
- 55- YANG, W. *et al.* Gold nanoparticle based photothermal therapy: Development and application for effective cancer treatment. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 22, p. e00109, 2019.

- 56- REIMERS, J. R. *et al.* Gold surfaces and nanoparticles are protected by Au(0)–thiyl species and are destroyed when Au(I)–thiolates form. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 11, p. E1424–E1433, 29 fev. 2016.
- 57- ELISA, A. *et al.* Gold Nanoparticles: A Didactic Step-by-Step of the Synthesis Using the Turkevich Method, Mechanisms, and Characterizations. **Analytica**, v. 4, n. 2, p. 250–263, 8 jun. 2023.
- 58- LENG, W.; PATI, P.; VIKESLAND, P. J. Room temperature seed mediated growth of gold nanoparticles: mechanistic investigations and life cycle assesment. **Environmental Science: Nano**, v. 2, n. 5, p. 440–453, 2015.
- 59- KUMAR, S.; GANDHI, K. S.; KUMAR, R. Modeling of Formation of Gold Nanoparticles by Citrate Method. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 10, p. 3128–3136, 2007.
- 60- GAO, Y.; TORRENTE-MURCIANO, L. Mechanistic insights of the reduction of gold salts in the Turkevich protocol. **Nanoscale**, v. 12, n. 4, p. 2740–2751, 2020.
- 61- TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55, 1951.
- 62- DOBROWOLSKA, P. *et al.* Application of Turkevich Method for Gold Nanoparticles Synthesis to Fabrication of SiO<sub>2</sub>@Au and TiO<sub>2</sub>@Au Core- Shell Nanostructures. **Materials**, v. 8, n. 6, p. 2849–2862, 2015.
- 63- SHI, D. *et al.* Gold nanoparticle aggregation: Colorimetric detection of the interactions between avidin and biotin. **Talanta**, v. 185, p. 106–112, 1 ago. 2018.
- 64- ABID, J.-P. **Laser Induced Synthesis and Nonlinear Optical Properties of Metal Nanoparticles**. 2003. Ph.D. Thesis, Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Lausanne, Switzerland, 2003. 10.5075/epfl-thesis-2823
- 65- TADROS, T. Electrostatic and Steric Stabilization of Colloidal Dispersions. *In*: OHSHIMA, H. (ed.). **Electrical Phenomena at Interfaces and Biointerfaces: Fundamentals and Applications in Nano-, Bio-, and Environmental Sciences**. New York: Wiley, 2012. p. 153–172. <https://doi.org/10.1002/9781118135440.ch10>
- 66- KUZNETSOVA, Y. V. *et al.* Ag<sub>2</sub>S interparticle interaction in an aqueous solution: Mechanism of steric and electrostatic stabilization. **Journal of Molecular Liquids**, v. 335, p. 116130, 2021.
- 67- OLIVEIRA, K. T. *et al.* Basic Concepts and Applications of Porphyrins, Chlorins and Phthalocyanines as Photosensitizers in Photonic Therapies. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, 2015. Disponível em: <https://rvq.sbgq.org.br/pdf/v7n1a16>
- 68- LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; OLSEN, A. M. Hematoporphyrin derivative: a new aid for endoscopic detection of malignant disease. **The journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 42, n. 5, p. 623–629, 1961.
- 69- HUANG, Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. **Technology in cancer research & treatment**, v. 4, n. 3, p. 283–293, 2005.

- 70- PENFOLD, T. J. *et al.* Spin-Vibronic Mechanism for Intersystem Crossing. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 15, p. 6975–7025, 2018.
- 71- VALEUR, Bernard. **Molecular fluorescence: principles and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2001.
- 72- DAS, A. New Innovative Methods for Determination of Spin Multiplicity, Spin State and Magnetic Properties of Diatomic Hetero Nuclear Molecules or Ions in a Very Short Interval of Time. **Indian Journal Of Applied Research**, v. 3, n. 8, p. 67–68, 2011.
- 73- PIETRZYK, D. J.; FRANK, C. W. Qualitative Analysis: Ultraviolet, Visible, and Infrared. *In: Analytical Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1979. p. 410–424. DOI:10.1016/B978-0-12-555160-1.50022-8
- 74- JAIN, A.; BLUM, C.; SUBRAMANIAM, V. Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging of Visible Fluorescent Proteins. **Advances in Biomedical Engineering**, p. 147–176, 2009.
- 75- ESCUDERO, A. *et al.* Photodynamic therapy: photosensitizers and nanostructures. **Materials Chemistry Frontiers**, v. 5, n. 10, p. 3788–3812, 2021.
- 76- CRAVCENCO, A. *et al.* Multiplicity conversion based on intramolecular triplet-to-singlet energy transfer. *Science Advances*, v. 5, n. 9, p. eaaw5978, set. 2019.
- 77- MARTINS, G. B. C.; SUCUPIRA, R. R.; SUAREZ, P. A. Z. A Química e as Cores. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1508–1534, 2015. Disponível em: <https://rvq-sub.s bq.org.br/index.php/rvq/article/view/1152>
- 78- HAMILTON, G.; SANABRIA, H. Multiparameter fluorescence spectroscopy of single molecules. *In: JOHNSON, Carey K. (ed.). Spectroscopy and Dynamics of Single Molecules*. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 269–333. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816463-1.00006-7>
- 79- CORREIA, J. H. *et al.* Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1332, 2021.
- 80- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, dez. 2004.
- 81- KOLAŘÍKOVÁ, M. *et al.* Photodynamic therapy: Innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments. **Medicinal Research Reviews**, v. 43, n. 4, p. 717–774, 9 fev. 2023. 10.1002/med.21935
- 82- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.
- 83- MARTA ERMINIA ALBERTO *et al.* Theoretical Exploration of Type I/Type II Dual

- Photoreactivity of Promising Ru(II) Dyads for PDT Approach. **Inorganic Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 11185–11192, 2016.
- 84- GUPTA, P.; LAKES, A.; DZIUBLA, T. A Free Radical Primer. *In*: DZIUBLA, T.; BUTTERFIELD, D. A. (eds.). **Oxidative Stress and Biomaterials**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 1–33.
- 85- HENKEL, R. ROS and DNA integrity—implications of male accessory gland infections. *In*: GIWERCMAN, A. *et al.* (Eds), **Clinical andrology**. London: CRC Press eBooks, 2010. p. 324–328. <https://doi.org/10.3109/9781841847474-37>
- 86- BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, n. 2, p. 141–155, 1997.
- 87- WANG, K.-K. *et al.* Lifetime and diffusion distance of singlet oxygen in air under everyday atmospheric conditions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 22, n. 38, p. 21664–21671, 2020.
- 88- O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053–1074, 2009.
- 89- KOU, J.; DOU, D.; YANG, L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, 11 ago. 2017.
- 90- HAK, A. *et al.* Chlorin e6: A Promising Photosensitizer in Photo-Based Cancer Nanomedicine. **ACS applied bio materials**, v. 6, n. 2, p. 349–364, 2023.
- 91- ALDALAWI, A. A. *et al.* Comparison of Wavelength-Dependent Penetration Depth of 532 nm and 660 nm Lasers in Different Tissue Types. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 14, p. e28–e28, 29 ago. 2023.
- 92- YAGHINI, E. *et al.* Endolysosomal targeting of a clinical chlorin photosensitizer for light-triggered delivery of nano-sized medicines. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, 20 jul. 2017.
- 93- YANG, H.; WANG, F.; ZHANG, Z. Photobleaching of chlorins in homogeneous and heterogeneous media. **Dyes and Pigments**, v. 43, n. 2, p. 109–117, 1999. [10.1016/s0143-7208\(99\)00049-2](https://doi.org/10.1016/s0143-7208(99)00049-2)
- 94- PAWLEY, J. **Handbook of Biological Confocal Microscopy**. 3. ed. New York: Springer Science & Business Media, 2013.
- 95- NGUYEN, P. V. *et al.* Nanomedicines functionalized with anti-EGFR ligands for active targeting in cancer therapy: Biological strategy, design and quality control. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 605, p. 120795, 2021.
- 96- BASUKI, K. T.; HASNOWO, L. A.; JAMAYANTI, E. Adsorption of uranium simulation waste using bentonite:titanium dioxide. **Urania**, v. 25, n.1, 2019. <https://doi.org/10.17146/urania.2019.25.1.4527>.
- 97- POURHAKKAK, P. *et al.* Fundamentals of adsorption technology. *In*: GHAEDI, M.

- (ed.). **Interface Science and Technology**. Amsterdam: Elsevier, 2021. p. 1–70.
- 98- HOLT, A. P. *et al.* Controlling Interfacial Dynamics: Covalent Bonding versus Physical Adsorption in Polymer Nanocomposites. **ACS Nano**, v. 10, n. 7, p. 6843–6852, 2016.
- 99- YOO, J.; WON, Y.-Y. Phenomenology of the Initial Burst Release of Drugs from PLGA Microparticles. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, n. 11, p. 6053–6062, 9 out. 2020.
- 100- KIM, H. *et al.* Noble Metal-Based Multimetallic Nanoparticles for Electrocatalytic Applications. **Advanced Science**, v. 9, n. 1, p. 2104054, 2021.
- 101- HAO, B. *et al.* Gold nanoparticles standing on PEG/PAMAM/thiol- functionalized nanographene oxide as aqueous catalysts. **Polymer Chemistry**, v. 11, n. 25, p. 4094–4104, 2020.
- 102- AMINA, S. J.; GUO, B. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 9823–9857, 2020.
- 103- LÓPEZ-PÉREZ, G. *et al.* Understanding gold nanoparticles interactions with chitosan: Crosslinking agents as novel strategy for direct covalent immobilization of biomolecules on metallic surfaces. **Journal of Molecular Liquids**, v. 302, p. 112381–112381, 2020.
- 104- MOHD-ZAHID, M. H. *et al.* Gold nanoparticles conjugated with anti- CD133 monoclonal antibody and 5-fluorouracil chemotherapeutic agent as nanocarriers for cancer cell targeting. **RSC Advances**, v. 11, n. 26, p. 16131–16141, 2021.
- 105- CONDE, J. *et al.* Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, 2014.
- 106- VRANA, N. E. *et al.* Double entrapment of growth factors by nanoparticles loaded into polyelectrolyte multilayer films. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 8, p. 999, 2014.
- 107- CHO, K. *et al.* Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1310–1316, 1 mar. 2008.
- 108- VRANA, N. E. *et al.* Double entrapment of growth factors by nanoparticles loaded into polyelectrolyte multilayer films. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 8, p. 999, 2014.
- 109- FANG, J.; ISLAM, W.; MAEDA, H. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 157, p. 142–160, 2020.
- 110- GANOTH, A.; MERIMI, K. C.; PEER, D. Overcoming multidrug resistance with nanomedicines. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 2, p. 223–238, 16 set. 2014.
- 111- REAÑO, R. L.; ESCOBAR, E. C. A review of antibody, aptamer, and nanomaterials

synergistic systems for an amplified electrochemical signal. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 12, 2024.

- 112- EL HALLAL, R.; LYU, N.; WANG, Y. Effect of Cetuximab- Conjugated Gold Nanoparticles on the Cytotoxicity and Phenotypic Evolution of Colorectal Cancer Cells. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 567, 22 jan. 2021.
- 113- NAVARRO, J. R. G.; WERTS, M. H. V. Resonant light scattering spectroscopy of gold, silver and gold–silver alloy nanoparticles and optical detection in microfluidic channels. **The Analyst**, v. 138, n. 2, p. 583–592, 2013.
- 114- OLVERA-ARIPEZ, J. *et al.* Biosynthesis of gold nanoparticles by fungi and its potential in SERS. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 47, n. 9, p. 1585-1593, 2024. <https://doi.org/10.1007/s00449-024-03053-w>
- 115- WANG, G. *et al.* Effects of gold nanoparticle morphologies on interactions with proteins. **Materials Science and Engineering: C**, v. 111, p. 110830–110830, 1 jun. 2020.
- 116- AMENDOLA, V.; MENEGHETTI, M. Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV–vis Spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 11, p. 4277–4285, 24 fev. 2009.
- 117- KREIBIG, U.; VOLLMER, M. **Optical Properties of Metal Clusters**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2013.
- 118- LEE, S.-R.; KIM, Y.-J. Hydrophilic Chlorin e6-Poly(amidoamine) Dendrimer Nanoconjugates for Enhanced Photodynamic Therapy. **Nanomaterials**, v. 8, n. 6, p. 445, 18 jun. 2018.
- 119- BLÁZQUEZ-CASTRO, A. Direct 1O<sub>2</sub> optical excitation: A tool for redox biology. **Redox Biology**, v. 13, p. 39–59, 2017.
- 120- GLADKOVA, O. L. *et al.* FTIR spectra and normal-mode analysis of chlorin e6 and its degradation-induced impurities. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 76, n. 3-4, p. 388– 394, 2010.
- 121- YUE, L. *et al.* Chlorin e6 conjugated chitosan as an efficient photoantimicrobial agent. **International journal of biological macromolecules**, v. 183, p. 1309–1316, 2021.
- 122- MOHSENIAN, N. B. *et al.* Mn-doped ZnS quantum dots-chlorin e6 shows potential as a treatment for chondrosarcoma: an in vitro study. **IET Nanobiotechnology**, v. 13, n. 4, p. 387–391, 1 jun. 2019.
- 123- Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. (2001). Introduction to Spectroscopy. 3rd Ed. Brooks/Cole: Pacific Grove, USA. 579p.
- 124- DIAS, L. D.; MFOUO-TYNGA, I. S. Learning from Nature: Bioinspired Chlorin-Based Photosensitizers Immobilized on Carbon Materials for Combined Photodynamic and Photothermal Therapy. **Biomimetics**, v. 5, n. 4, p. 53, 14 out. 2020.

- 125- ZHU, X. *et al.* Anti-Stokes shift luminescent materials for bio- applications. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 4, p. 1025–1039, 20 fev. 2017.
- 126- CASTILHO, M. L.; HEWITT, K. C.; RANIERO, L. FT-IR characterization of a theranostic nanoprobe for photodynamic therapy and epidermal growth factor receptor targets. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 903–908, 2017.
- 127- LI, S. *et al.* Preparation of soybean  $\beta$ -conglycinin epitope antibody and its preliminary application in frozen surimi detection. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 6, p. 1411–1423, 2 abr. 2021.
- 128- LIU, P.-F.; AVRAMOVA, L. V.; PARK, C. Revisiting absorbance at 230nm as a protein unfolding probe. **Analytical Biochemistry**, v. 389, n. 2, p. 165–170, jun. 2009.
- 129- CHEN, Y. Drug-to-antibody ratio (DAR) by UV/Vis spectroscopy. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N.J.), v. 1045, p. 267–273, 2013.
- 130- SENSI, S.; GOEBEL, A. Human Auto-IgG Purification from High Volume Serum Sample by Protein G Affinity Purification. **Bio- Protocol**, v. 12, n. 23, 2022.
- 131- KONG, J.; YU, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 8, p. 549–559, ago. 2007.
- 132- CASTILHO, M. L. *et al.* Chlorin e6-EGF conjugated gold nanoparticles as a nanomedicine based therapeutic agent for triple negative breast cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 33, p. 102186, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021>.
- 133- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. Geneve: Switzerland: International Organization for Standardization, 2009.
- 134- NEPOMUCENO, L. L. *et al.* Padronização metodológica in vitro do ensaio colorimétrico MTT para avaliação da atividade de formazan e dosagem do fármaco: padronização do teste colorimétrico MTT. *In: Farmacologia aplicada à enfermagem: aspectos teóricos e práticos*. São Paulo: Editora Científica Digital eBook, 2020. p. 149–161.