



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HELLEN CRISTINA NOVAIS DE OLIVEIRA

NANOCOMPÓSITO CONTENDO HEXACIANOFERRATO DE
COBALTO/NANOTUBOS DE CARBONO/ÁCIDO FÓLICO PARA A APLICAÇÃO EM
TERAPIA FOTODINÂMICA VISANDO O TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA

UBERLÂNDIA - MG
FEVEREIRO - 2025

HELLEN CRISTINA NOVAIS DE OLIVEIRA

NANOCOMPÓSITO CONTENDO HEXACIANOFERRATO DE COBALTO/NANOTUBOS DE CARBONO/ÁCIDO FÓLICO PARA A APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA VISANDO O TRATAMENTO DE CÂNCER DE MAMA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Edson Nossol

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tayana Mazin Tsubone

UBERLÂNDIA – MG

FEVEREIRO - 2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 2025	<p>Oliveira, Hellen Cristina Novais de, 1998- Nanocompósito contendo hexacianoferrato de cobalto/nanotubos de carbono/ácido fólico para a aplicação em terapia fotodinâmica visando o tratamento de câncer de mama. [recurso eletrônico] / Hellen Cristina Novais de Oliveira. - 2025.</p> <p>Orientador: Edson Nossol. Coorientadora: Tayana Mazin Tsubone. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2025.93 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Química. I. Nossol, Edson, 1981-, (Orient.). II. Tsubone, Tayana Mazin, 1989-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título.</p> <p>CDU: 54</p>
-------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 405, PPGQUI				
Data:	Sete de fevereiro de dois mil e vinte e cinco	Hora de início:	9h	Hora de encerramento:	
Matrícula do Discente:	12322QMI004				
Nome do Discente:	Hellen Cristina Novais de Oliveira				
Título do Trabalho:	Nanocompósito contendo hexacianoferrato de cobalto/nanotubos de carbono/ácido fólico para a aplicação em terapia fotodinâmica visando o tratamento de câncer de mama				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química do Estado Sólido e Eletroquímica Aplicada				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Nanocompósitos Multifuncionais: Aplicação de Estruturas Carbonáceas e Azul da Prússia na Preparação de Baterias, Supercapacitores e Sensores				
<u>ODS</u>	"ODS 3 - Saúde e bem-estar: assegurar uma vida saudável e promover o bemestar para todos, em todas as idades."				

Reuniu-se, por webconferência, pelo link: <https://teams.microsoft.com/dl/launcher/launcher.html?url=...>, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta pelos professores doutores: **Carolina Gonçalves Oliveira**, da Universidade Federal de Uberlândia - UFU/QUFU; **Eduardo Cividini Neiva**, da Universidade Regional de Blumenau; e **Edson Nossol**, orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. **Edson Nossol**, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Gonçalves Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 07/02/2025, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edson Nossol, Professor(a) do Magistério Superior**, em 07/02/2025, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Guilherme Cividini Neiva, Usuário Externo**, em 07/02/2025, às 12:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar saúde, sabedoria e perseverança ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Sua orientação e proteção foram fundamentais para que eu pudesse concluir essa jornada.

Aos meus pais, Sandra e Robson, minha eterna gratidão por confiarem em mim incondicionalmente, oferecendo todo o amor e suporte necessários. Obrigada por acreditarem na minha capacidade e afinidade com o que faço. Um agradecimento especial à minha mãe, cuja força e apoio foram essenciais para que eu pudesse perseguir meu sonho de ser pesquisadora. Te amo além do infinito, minha princesa.

Ao meu orientador, Edson Nossol, sou profundamente grata pela incrível oportunidade de fazer parte do grupo desde 2017, por me apresentar ao universo da pesquisa e por sempre ser uma inspiração. Sua paciência, confiança, ensinamentos e carinho ao longo desses anos foram pilares essenciais para que eu pudesse alcançar tanto. Obrigada por sempre apoiar minhas vontades e ambições.

Agradeço à Tayana, minha coorientadora, por sua paciência e dedicação em me explicar, desde o início, toda a parte biológica envolvida no meu trabalho. Também agradeço à Patrícia, que me acompanhou nos testes com muita prestatividade e paciência. O apoio de ambas foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao Pedro, que começou como amigo e colega de trabalho, mas se tornou meu parceiro. Obrigada por todos os ensinamentos, conversas, discussões científicas, momentos de descontração e por ser uma inspiração como pessoa e pesquisador. Sou muito feliz ao seu lado.

Aos demais integrantes do NANOSSOL, agradeço pelos momentos incríveis de risadas, pelo compartilhamento de frustrações com experimentos que não deram certo e pelas contribuições científicas e pessoais. Sem vocês, a jornada teria sido muito mais difícil.

Ao quarteto (Hellen, Michele, Rebecca e Thais), que foi substancial para minha saúde mental e física, por serem parceiras de garfo, musculação e natação. Agradeço, em especial, à Michele, a quem recorri em muitos momentos para desabafar sobre tudo (inclusive nossas alergias em comum).

Agradeço aos meus amigos Rafael e Laura, que, desde o ensino médio, compartilham comigo a afinidade que sempre tive por essa área e sempre me apoiaram. Rafael, saiba que, ano após ano, você continua sendo tudo para mim, por dividir, os gastos, as angústias e as vitórias da vida comigo.

À Yasmim, que, a cada ano que passa, ficamos mais próximas. Te admiro muito, e você sabe disso. Adoro falar sobre pesquisa, feminismo, livros e coisas da vida com você. Ao Samuel, por sempre

me ouvir sem reclamar e me ajudar sem medir esforços.

Agradeço também à Isabella, que foi minha vizinha durante quatro anos e se tornou uma amiga para a vida toda. Saiba que sinto sua falta diariamente e sei que torce verdadeiramente por mim.

Agradeço aos meus demais amigos e familiares de Patrocínio – MG, que, desde sempre, me apoiaram e acreditaram em mim. Em especial, à Carol, Ana Flávia e Letícia, que acompanharam minha vida durante todo esse tempo, proporcionando momentos de sabedoria, alegria, tristeza, conselhos, festas e conversas intensas. A amizade de vocês é muito importante para mim.

A todos os professores da Pós-Graduação em Química da UFU e aos membros do colegiado, pelos ensinamentos e apoio ao longo desses anos.

A todos os funcionários do Instituto de Química da UFU e aos demais que participaram, de forma direta e indireta, no apoio ao trabalho.

À CAPES, CNPq, INCT Nanocarbono, FAPEMIG e a todos os outros órgãos de fomento, por viabilizarem a pesquisa.

“Para termos, falta-nos apenas precisar.”

Clarice Lispector

A paixão segundo G.H. – 1964

RESUMO

Este estudo apresenta a síntese de um nanocompósito ternário contendo hexacianoferrato de cobalto, nanotubos de carbono e ácido fólico (HCFCo@NTCf@AF), desenvolvido pelo método de coprecipitação para aplicação em terapia fotodinâmica (TFD), uma abordagem minimamente invasiva no tratamento do câncer de mama triplo-negativo, que é conhecido por seu alto potencial invasivo e metastático. A escolha dos componentes análogos do azul da Prússia, nanotubos de carbono funcionalizados e ácido fólico baseou-se em suas propriedades fotossensibilizadoras e biocompatibilidade. A caracterização por MEV revelou aumento no tamanho médio das partículas, presença de todos os elementos constituintes (EDS) e estrutura cúbica de face centrada dos hexacianoferratos metálicos (DRX). Na análise de TGA, foi atestado que o material perdeu um total de 45% de água na estrutura, que pode ser comprovada via Raman e FTIR, que revelaram as bandas respectivas dos materiais. Além disso, os voltamogramas forneceram informações sobre estados de oxidação e picos correspondentes aos HCFCo. Os espectros de UV-Vis e reflectância difusa mostraram uma banda de absorção na região do visível, potencialmente útil no tratamento de tumores por TFD. Ensaio de viabilidade celular com a linha MDA-MB-231 mostraram que os materiais isolados apresentaram baixa citotoxicidade nas concentrações testadas. Sob irradiação com LED vermelho, o nanocompósito HCFCo@NTCf@AF promoveu 79% de morte celular nas concentrações de 0,8 e 1,0 mg mL⁻¹, demonstrando efeito fotodinâmico significativo. Os dados de apoptose corroboram com os de fotocitotoxicidade, confirmando que o nanocompósito ternário apresentou o melhor desempenho de indução de morte celular, via apoptose tardia das células tumorais. Esses resultados ressaltam as propriedades sinérgicas e o potencial deste nanocompósito como candidato para o tratamento do câncer de mama triplo-negativo por TFD.

Palavras-chave: análogos de azul da Prússia, nanotubos de carbono, terapia fotodinâmica; câncer de mama.

ABSTRACT

This study presents the synthesis of a ternary nanocomposite, HCFCo@NTCf@AF, developed through the coprecipitation method for application in photodynamic therapy (PDT), a minimally invasive approach for the treatment of triple-negative breast cancer, which is known for its high invasive and metastatic potential. The choice of components—Prussian blue analogs, functionalized carbon nanotubes, and folic acid—was based on their photosensitizing properties and biocompatibility. Characterization revealed an increase in the average particle size (SEM), the presence of all constituent elements (EDS), and the face-centered cubic structure of metal hexacyanoferrates (XRD). TGA analysis showed that the material lost a total of 45% water from its structure, which was further studied via Raman and FTIR, revealing the respective bands of the materials. Additionally, the voltammograms provided information on oxidation states and peaks corresponding to HCFCo. UV-Vis and diffuse reflectance spectra confirmed an absorption band in the visible region, potentially useful for tumor treatment by PDT. Cell viability assays with the MDA-MB-231 line showed that the isolated materials exhibited low cytotoxicity at the tested concentrations. Under red LED irradiation, the nanocomposite HCFCo@NTCf@AF induced 79% cell death at concentrations of 0.8 and 1.0 mg mL⁻¹, demonstrating significant photodynamic effect. Apoptosis data correlated with the phototoxicity results, confirming that the ternary nanocomposite showed the best performance in inducing cell death via late apoptosis of tumor cells. These results highlight the synergistic properties and potential of this nanocomposite as a promising candidate for the treatment of triple-negative breast cancer through PDT.

Keywords: prussian blue analogs; carbon nanotubes; photodynamic therapy; breast cancer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1. 1. Câncer	1
1. 2. Terapias convencionais	2
1. 3. Terapia fotodinâmica	2
1. 4. Princípio da TFD	3
1. 5. Tecnologia luminosa na TFD	6
1. 6. Fotossensibilizadores	8
1. 7. Azul da prússia.....	10
1. 8. Nanotubos de carbono	12
1. 9. Ácido fólico	13
1. 10. Nanocompósitos	15
2. OBJETIVOS	16
2. 1. Objetivos gerais	16
2. 2. Objetivos específicos	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3. 1. Materiais.....	17
3. 2. Métodos.....	18
3. 2. 1. Instrumentação.....	18
3. 2. 2. Preparação do nanocompósito HCFCo@NTCfs@AF e seus materiais controle	20
3. 3. Ensaios biológicos	22
3. 3. 1. Cultura celular e tratamentos	22
3. 3. 2. Ensaios Fotodinâmicos em células de câncer de mama humano (MDA-MB-231)	22
3. 3. 3. Ensaio viabilidade celular via método colorimétrico MTT	23
3. 3. 4. Citometria de fluxo com marcação dupla Anexina V e Iodeto de Propídio (FITC/PI)	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4. 1. Microscopia eletrônica de varredura	28

4. 2. Microscopia eletrtrônica de transmissão	30
4. 3. Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia	30
4. 4. Difração de raios X	31
4. 5. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier	34
4. 6. Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta – visível	36
4. 7. Espectroscopia de reflectância difusa	38
4. 8. Espectroscopia Raman	39
4. 9. Análise termogravimétrica	41
4. 10. Estudo eletroquímico – Voltametria Cíclica	43
4. 11. Efeito fotodinâmico dos nanocompósitos em células de câncer de mama.....	45
4. 12. Citometria de fluxo com marcação dupla Anexina V e Iodeto de Propropídio (FITC/PI)	48
5. CONCLUSÃO	51
6. REFERÊNCIAS	52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estados tripleto ($^3\text{O}_2$) e singleto ($^1\text{O}_2$) do oxigênio.	3
Figura 2: Diagrama de Jablonski relacionando os principais eventos que levam a reações do Tipo I e Tipo II. As letras A e B representam ERO (espécie reativa de oxigênio) e CIS (conversão intersistema).	5
Figura 3: Aplicação da TFD na clínica.	6
Figura 4: Região da janela fototerapêutica na TFD.	7
Figura 5: Penetração da luz na pele, ilustrando a profundidade à qual os comprimentos de onda penetram a pele humana.	8
Figura 6: Estrutura básica dos fotossensibilizadores orgânicos mais utilizados.	9
Figura 7: Estrutura cristalina esquemática das redes de AP ou AAPs: a) Uma rede intacta de $\text{A}_m\text{M}_x[\text{M}'(\text{CN})_6]$ sem defeitos estruturais. b) Uma rede defeituosa de $\text{A}_m\text{M}_x[\text{M}'(\text{CN})_6]$ com vacâncias e água intersticial presente em cada célula unitária.	11
Figura 8: Representação esquemática de um nanotubo de carbono de parede simples (SWCNT) (a) e de um nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) (b).	13
Figura 9: Molécula representativa do ácido fólico.	14
Figura 10: Imagem representativa do processo de síntese do material nanocompósito.	21
Figura 11: Fotografia do procedimento experimental dos ensaios biológicos. Materias dispersos em DMEM (a) e placa irradiada pelo LED vermelho (b).	23
Figura 12: Materiais dispersos em MTT fase inicial (a) e formação de cristais de formazam (b).	24
Figura 13: Esquema representativo da marcação de anexina V - FITC e PI em células apoptóticas iniciais e tardias.	25
Figura 14: Citograma representativo obtido durante a aquisição de dados e a análise dos resultados de apoptose via citometria de fluxo.	26
Figura 15: Imagens de MEV de HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b) e HCFCo@NTCf@AF (c) e seus	

repectivos histogramas.	29
Figura 16: Imagens de MET das amostras HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b) e HCFCo@NTCf@AF (c).	30
Figura 17: Espectros de raios X por dispersão em energia dos materiais desenvolvidos nesse trabalho: amostras HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b) e HCFCo@NTCf@AF (c).	31
Figura 18: Difratogramas dos meteriais HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF em (a) e divisão do pico (200) em $17,7^\circ$ em (b).	32
Figura 19: Representação da variação de K^+ na rede em (a) e distorção da rede cúbica do HCFCo para uma fase romboédrica em (b).	33
Figura 20: Espectros na região do infravermelho por transformada de Fourier do HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF (a) e destaque da região $\nu(\text{CN})$ de 2000 a 2500 cm^{-1} (b).	34
Figura 21: Medições de UV-Vis HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF dispersos em água.	37
Figura 22: Espectros de reflectância difusa de todos mateiais estudados.	38
Figura 23: Espectros Raman dos materiais sintetizados.	40
Figura 24: Análise termogravimétrica do HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b) e HCFCo@NTCf@AF (c).	41
Figura 25: Voltamograma cíclico do HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b), HCFCo@NTCf@AF (c) e todos os materiais junto em (d).	44
Figura 26: Estudos da (%) viabilidade de células MDA-MB-231 tratadas com AF (a), NTCf (b), HCFCo (c), NTCf@AF (d), HCFCo@NTCf (e) e HCFCo@NTCf@AF (f) em diferentes concentrações ($0,1$ a $1,0\text{ mg mL}^{-1}$) sob irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 630\text{ nm}$, dose de luz = 5 J/cm^2) ou protegida da luz (escuro). As barras representam a média \pm o desvio padrão de 5 experimentos independentes, com 4 repetições em cada replicata ($n = 20$) para ensaios no escuro; e duplicata independente, com 4	

repetições em cada replicata (n = 8) realizados na presença de luz. 46

Figura 27: (A) Gráficos de dispersão pseudo-coloridos mostrando a definição de 4 populações, de acordo com as respostas positivas e negativas à Anexina V-FITC e iodeto de propídio, em células não tratadas (controle) e em células tratadas com 1 mg/mL de NTCf, HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF e irradiadas com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 630 \text{ nm}$, dose de luz = 5 J/cm²). (B) Gráficos em barras com as porcentagens de cada quadrante evidenciando a mudança relativa em comparação com o controle das 4 populações definidas..... 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de reagentes utilizados no trabalho.	17
Tabela 2: Parâmetros do LED utilizado neste estudo.	23
Tabela 3: Dados da Lei de Scherrer e Lei de Bragg dos materiais estudados.....	33
Tabela 4: Frequência (em cm^{-1}) das bandas de absorção observadas no estudo dos nanocompósitos sintetizados e seus respectivos controles.....	35
Tabela 5: TGA: decomposição térmica.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	Análogo de azul da Prússia
AF	Ácido fólico
AP	Azul da Prússia
CIS	Cruzamento intersistema
CM	Câncer de mama
CMTN	Câncer de mama triplo negativo
CV	Carbono vítreo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRX	Difração de raios-X
EDX	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FITC	Fluoresceína Isotiocianato
FS	Fotossensibilizador
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho por transformada de Fourier
HCF	Hexacianoferrato
HCFCo	Hexacianoferrato de cobalto
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio
MWCNT	Nanotubo de carbono de parede múltipla
NTC	Nanotubo de carbono
NTCf	Nanotubo de carbono funcionalizado
PBS	Phosphate buffer solution
PI	Iodeto de propídio
SFB	Soro fetal bovino
SWCNT	Nanotubo de carbono de parede simples
TDF	Terapia fotodinâmica
TGA	Análise termogravimétrica
UV-Vis	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível
VC	Voltametria cíclica

1. INTRODUÇÃO

1. 1. Câncer

O câncer é uma doença complexa caracterizada pela transformação anormal de células, resultando em crescimento celular descontrolado e invasivo.¹ No organismo humano, as células possuem funções bem definidas, controladas por informações genéticas que regulam processos como proliferação, morfogênese e apoptose, os quais são fundamentais para a manutenção da homeostase celular.² Entretanto, mutações genéticas podem ocorrer, fazendo com que as células se tornem anormais e comecem a se multiplicar desordenadamente, podendo invadir tecidos vizinhos e até se espalhar para outras partes do corpo, um fenômeno conhecido como oncogênese.³

Esse processo de transformação celular é geralmente impulsionado por mutações acumuladas que alteram os mecanismos que regulam o ciclo celular, a morte celular programada (apoptose) e o reparo do DNA. As células de câncer também têm a capacidade de induzir angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) e de invadir tecidos saudáveis, o que torna a luta contra o câncer um grande desafio terapêutico.⁴ O câncer engloba mais de 200 tipos diferentes e impacta a comunicação e atividade molecular entre as células e os tecidos.⁵ Fatores externos, como substâncias carcinogênicas químicas, físicas ou biológicas, e fatores internos relacionados ao sistema imunológico, têm um papel significativo no surgimento dessas mutações.⁶

Devido à sua alta prevalência e impacto substancial na mortalidade, o câncer representa um dos maiores desafios globais para os sistemas de saúde. Diante desse contexto, o câncer de mama (CM) figura entre as doenças mais prevalentes e desafiadoras em mulheres globalmente. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o CM resultou em 670.000 mortes em 2022.⁷ Entre os diferentes subtipos de CM, o câncer de mama triplo-negativo (CMTN), especialmente a linha celular MDA-MB-231, destaca-se por sua agressividade, elevado poder invasivo e natureza metastática.⁸ Essas características dificultam seu tratamento devido à ausência de receptores de estrogênio (ER-), receptores de progesterona (PR-) e da proteína do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2-), limitando a eficácia das abordagens terapêuticas convencionais.^{9,10}

1. 2. Terapias convencionais

O tratamento convencional do câncer de mama geralmente envolve uma combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia, cada uma desempenhando um papel fundamental no controle da doença. A cirurgia, frequentemente a primeira abordagem, visa remover o tumor primário e, em alguns casos, os linfonodos afetados. A quimioterapia é administrada para eliminar células de câncer que possam ter se disseminado pelo corpo, sendo usada tanto antes da cirurgia (neoadjuvante) para reduzir o tamanho do tumor, quanto após a cirurgia (adjuvante) para prevenir recidivas. A radioterapia é aplicada para destruir células remanescentes na área tratada, diminuindo o risco de recorrência local. Essas terapias convencionais têm sido amplamente utilizadas e são responsáveis por significativos avanços no aumento da sobrevida de pacientes com câncer de mama.¹¹⁻¹³

Apesar dos benefícios comprovados, as terapias convencionais para o câncer de mama apresentam desafios significativos. Embora eficazes na redução e controle da doença, esses tratamentos podem ser invasivos e frequentemente estão associados a uma série de efeitos colaterais que impactam a qualidade de vida dos pacientes. Complicações físicas, desgaste emocional e danos aos tecidos saudáveis são comuns, além de uma redução na capacidade do corpo de se recuperar. Esses impactos cumulativos podem limitar a eficácia dos tratamentos a longo prazo, especialmente diante da resistência ao tratamento e da possibilidade de recidiva. Tais desafios ressaltam a necessidade de desenvolver e adotar terapias alternativas e complementares, que ofereçam abordagens mais específicas, menos invasivas e com potencial para melhorar os resultados clínicos e reduzir os efeitos adversos.^{14,15}

1. 3. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) tem suas origens no uso terapêutico da luz, prática comum em civilizações antigas como a egípcia, grega e indiana, onde a luz solar era combinada com substâncias naturais para tratar diversas condições de saúde. No início do século XX, Oscar Raab descobriu que certos corantes podiam eliminar micro-organismos na presença de luz, marcando o início do desenvolvimento do conceito moderno de TFD.¹⁶ Hermann von Tappeiner expandiu essa descoberta, cunhando o termo "fotodinâmica" para descrever a interação entre luz e fotossensibilizadores na indução de respostas terapêuticas.¹⁷ A TFD evoluiu significativamente desde então, consolidando-se como uma abordagem eficaz no tratamento de doenças como o câncer,¹⁸ sendo amplamente utilizada em oftalmologia¹⁹ e dermatologia,²⁰ devido à sua capacidade de destruir células seletivamente com menos efeitos colaterais.

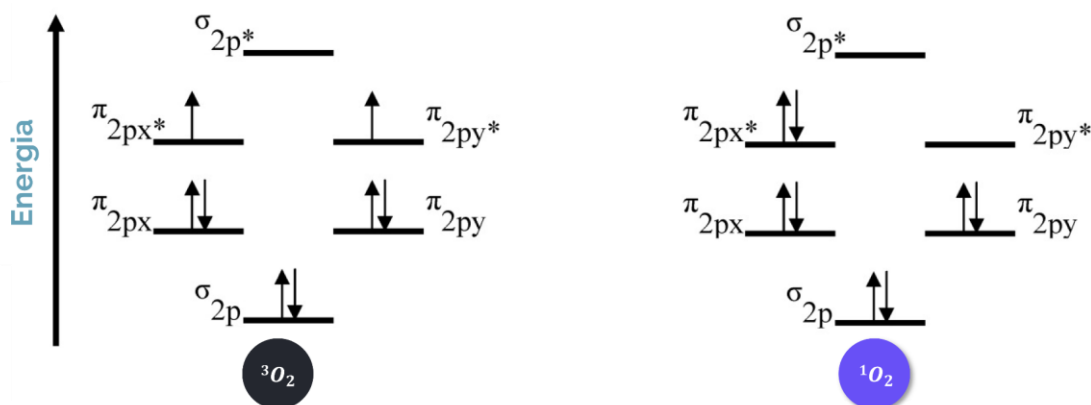
Com os avanços na pesquisa e na prática clínica, a TFD tem se consolidado como um método

minimamente invasivo e comprovadamente eficaz para o tratamento de tumores. Embora a maioria dos tratamentos contra o câncer apresente limitações, a TFD se diferencia dos métodos convencionais, destacando-se como uma alternativa promissora.²¹ Esta técnica é limitada a áreas onde a luz pode alcançar, não sendo adequada para o tratamento de tumores grandes que se disseminaram para múltiplas partes do corpo, bem como para pacientes com determinadas doenças hematológicas. Apesar dessas restrições, a TFD proporciona baixos efeitos colaterais, alta eficácia e é caracterizada por ser um procedimento de curta duração.²²

1. 4. Princípio da TFD

A TFD segue os princípios descritos no diagrama de Jablonski e opera através da ativação da luz, na qual a interação entre fotossensibilizadores (FS) e oxigênio molecular (O_2), utilizando laser, gera espécies instáveis, que são citotóxicas e, responsáveis pela eliminação das células tumorais.²³ O processo inicia-se com a absorção de luz pelo FS, que promove a transição do estado fundamental (S_0) para um estado singlete excitado (S_1), como representado na Fig. 1.

Figura 1: Estados triplete (3O_2) e singlete (1O_2) do oxigênio.



Adaptado de: A.B. Ormond²⁴

A figura ilustra as diferenças entre os estados triplete (3O_2) e singlete (1O_2) do oxigênio com base na ocupação de orbitais moleculares. No estado fundamental, o oxigênio molecular apresenta dois elétrons com spins paralelos ocupando orbitais π degenerados, caracterizando o estado triplete (3O_2). Essa configuração é relativamente estável, porém de baixa reatividade, uma vez que a conversão direta do oxigênio triplete para formas reduzidas, como o estado singlete, é proibida pela

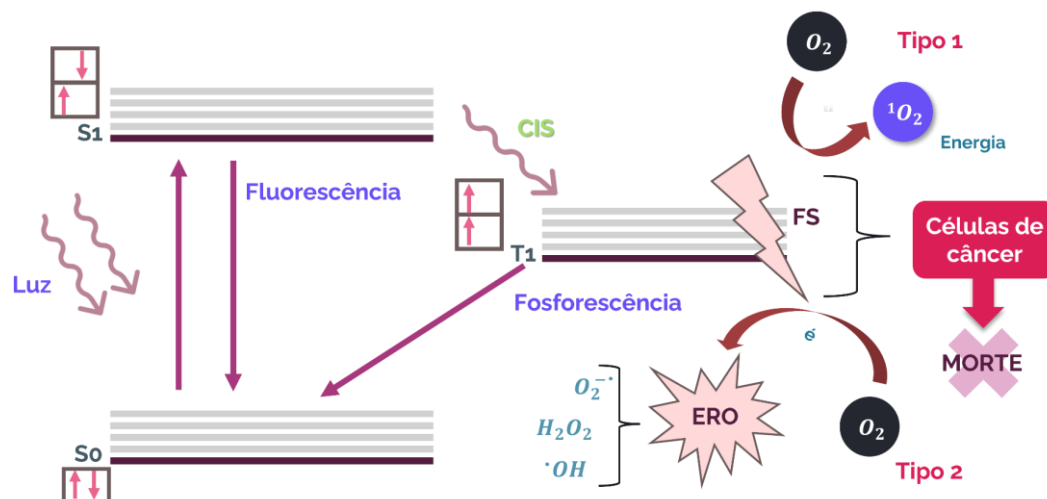
regra de conservação do spin. De acordo com essa regra, em uma transição eletrônica, a mudança de estado triplete para singlete não pode ocorrer espontaneamente, pois envolveria a inversão dos spins, o que não é permitido sem uma interação externa, como a absorção de luz. Nesse contexto, na TFD a radiação fornecida induz a promoção do oxigênio para o estado singlete ($^1\text{O}_2$), no qual os elétrons nos orbitais π^* emparelham seus spins, removendo a restrição imposta pela regra de conservação do spin e resultando em uma configuração eletrônica que torna o oxigênio singlete altamente oxidante.^{24,25}

Este estado é instável e pode decair de volta ao estado fundamental, liberando energia na forma de fluorescência ou calor.²⁶ Alternativamente, o estado singlete também pode sofrer uma conversão intersistema (CIS), onde a multiplicidade de FS é alterada, com a inversão de um spin de elétron, para formar um estado excitado triplete (T_1). Esse estado triplete possui maior tempo de vida em comparação ao S_1 , o que aumenta sua capacidade de desencadear reações fotoquímicas subsequentes por meio de dois mecanismos principais: (a) Tipo I: transferência de elétrons e (b) Tipo II: transferência de energia.²⁷

O mecanismo do tipo I é resultado da transferência de elétrons ou hidrogênio. Essa reação redox pode gerar um substrato (S) reduzido ou oxidado dando origem ao par correspondente de íons radicais ($\text{FS}^{\bullet-}$ e $\text{S}^{\bullet+}$; $\text{FS}^{\bullet+}$ e $\text{S}^{\bullet-}$). Esses íons radicais participam de um complexo de reações competitivas, que comumente produzem espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila (OH^\bullet), o íon superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que podem danificar as estruturas celulares essenciais.^{28,29}

No mecanismo tipo II da TFD, o excitado triplete (T_1) do FS transfere energia diretamente ao oxigênio molecular presente nos tecidos, convertendo-o em oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$),³⁰ uma forma altamente reativa de oxigênio.³¹ Este oxigênio singlete é responsável por induzir danos oxidativos nas células, levando à morte celular.²⁵ A Fig. 2 representa o diagrama mostrando como a formação das espécies (EROs) que são responsáveis pela eliminação de células doentes.^{32,33}

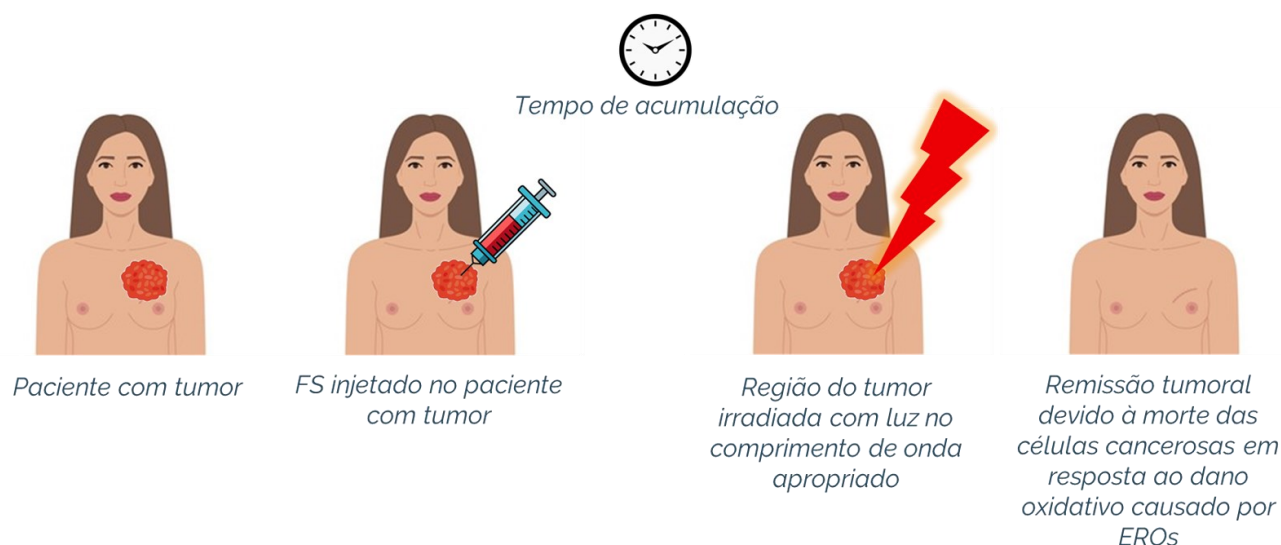
Figura 2: Diagrama de Jablonski relacionando os principais eventos que levam a reações do Tipo I e Tipo II. As letras A e B representam ERO (espécie reativa de oxigênio) e CIS (conversão intersistema).



Fonte: A autora.

Na prática clínica, a TFD consiste na administração de um FS, substância que é seletivamente absorvida pelas células tumorais. A via de administração do FS pode ser intravenosa ou tópica, dependendo da localização do tumor. Após um período necessário para a acumulação do fotossensibilizador nas células-alvo (tempo de acumulação), a área afetada é então exposta a uma fonte de luz específica, como ilustrado na Fig. 3. Embora a TFD seja mais eficaz em tumores superficiais, avanços significativos na pesquisa têm permitido a remissão de tumores mais profundos,³⁴ além de possibilitar a combinação com outras modalidades terapêuticas, para otimizar os resultados e reduzir as chances de recorrência.³⁵ O contínuo desenvolvimento de novos FSs e fontes luminosas tem ampliado a aplicabilidade da técnica, permitindo que o tratamento atinga uma eficácia tumoral mais eficaz em estágios avançados.³⁶

Figura 3: Aplicação da TFD na clínica.



Fonte: A autora

1. 5. Tecnologia luminosa na TFD

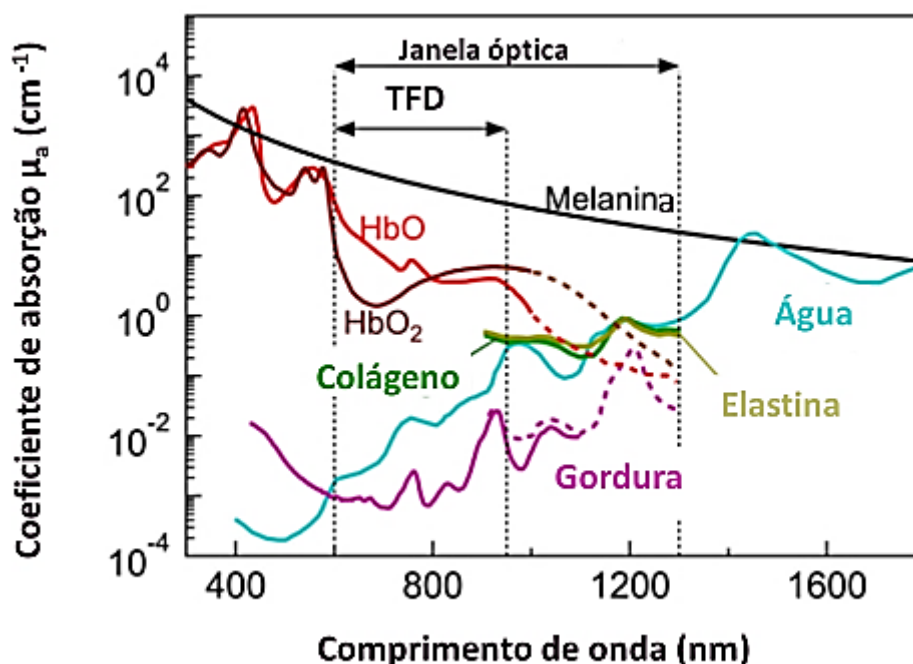
Como uma terapia dependente de luz, a TFD baseia-se fundamentalmente na interação entre a luz e o tecido, fator crucial para a ativação do fotossensibilizador (FS). Essa interação é influenciada pelas características da luz e pelas propriedades ópticas dos tecidos biológicos, que incluem absorção e espalhamento, determinadas pela composição celular e estrutural dos tecidos. A seleção precisa da fonte de luz e do comprimento de onda é essencial para a eficácia da TFD, pois esses parâmetros devem ser ajustados para maximizar a absorção pelo FS e a subsequente geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).³⁷

Cromóforos endógenos, incluindo desoxihemoglobina (HbO), oxihemoglobina (HbO₂) e melanina, exibem forte absorção de luz no espectro visível abaixo de 650 nm (Fig. 4). Esta é uma das razões pelas quais a luz azul penetra menos profundamente (< 1,5 mm) através do tecido. Acima de 950 nm, a luz é absorvida majoritariamente pela água, elastina, colágeno e gordura (Figura 3). Assim, um comprimento de onda maior ($\approx > 1.000$ nm) também penetra menos eficientemente através do tecido, devido à alta absorção da água. Isso significa que uma “janela fototerapêutica” otimizada está na faixa espectral entre 650 e 950 nm.²⁶

Para tratamentos superficiais, comprimentos de onda entre ~400–600 nm (UV-vis) são mais apropriados, proporcionando uma interação eficiente com tecidos próximos à superfície. A escolha do comprimento de onda correto dentro da janela fototerapêutica é, portanto, um componente fundamental

para o sucesso do tratamento, garantindo a eficácia na destruição seletiva das células tumorais.³⁸

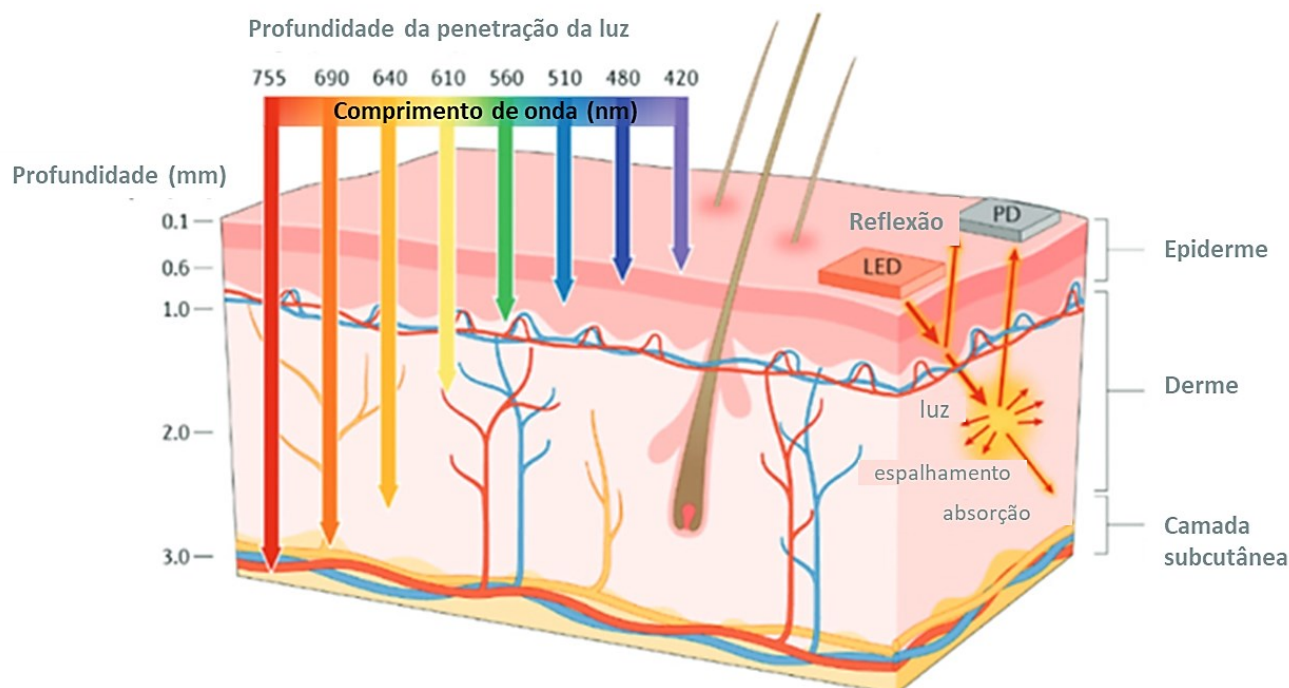
Figura 4: Região da janela fototerapêutica na TFD.



Adaptado de J.F. Algorri et. al.³⁸

A penetração luminosa nos tecidos constitui um fator crítico na eficácia da TFD, uma vez que a ativação do FS e a subsequente geração de espécies reativas de oxigênio EROs dependem diretamente da capacidade da luz de atingir as células-alvo. Em tecidos superficiais, a penetração é mais eficaz, facilitando a absorção da luz e a indução da resposta terapêutica. No entanto, em tumores localizados em camadas mais profundas, a luz sofre dispersão e absorção, limitando sua eficácia.³⁹ A extensão da penetração luminosa é influenciada por fatores como o comprimento de onda da luz, as propriedades ópticas do FS e as características do tecido, incluindo sua densidade e composição.⁴⁰ Como ilustrado na Fig. 5, diferentes comprimentos de onda têm capacidades distintas de penetração, atingindo diferentes camadas do tecido, o que impacta diretamente a eficácia da TFD.⁴¹

Figura 5: Penetração da luz na pele, ilustrando a profundidade à qual os comprimentos de onda penetram a pele humana.



Adaptado de: S. Thangudu et al.⁴²

Nesse contexto, a eficácia do tratamento depende diretamente da seleção do FS adequado, que deve possuir alta afinidade pelo tecido tumoral e ser ativado por comprimentos de onda específicos dentro da janela terapêutica. Diante disso, é necessário explorar as propriedades, estrutura química, seletividade tumoral e resposta fotoquímica, elementos cruciais para maximizar os resultados da TFD.

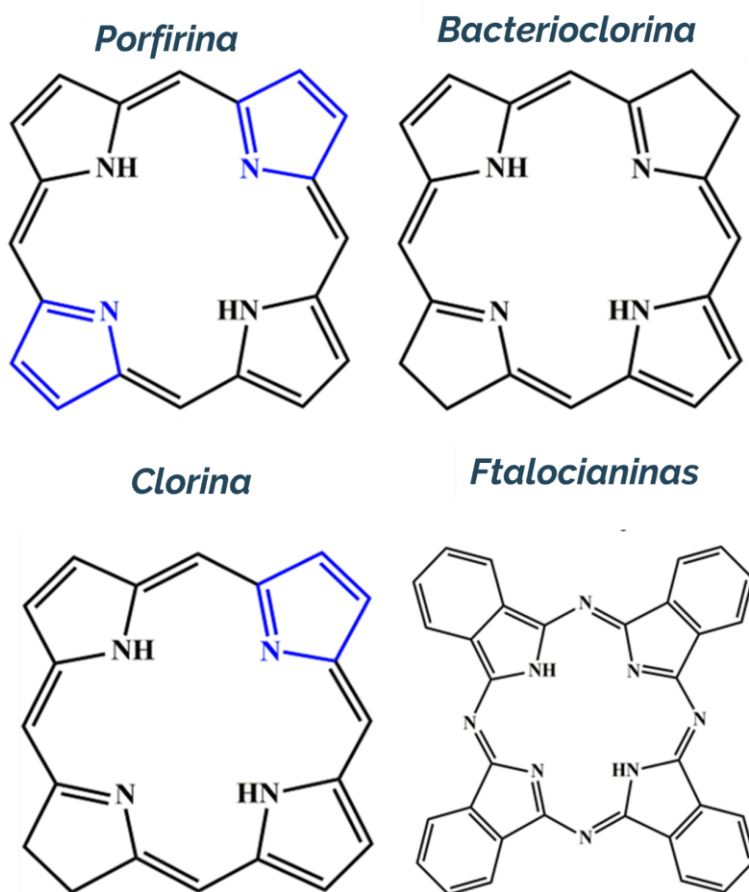
1. 6. Fotossensibilizadores

Fotossensibilizadores (FS) são agentes fotofísicos e fotoquímicos fundamentais para o processo de TFD. Um FS eficiente deve possuir alta absorção na faixa fototerapêutica, no visível e no infravermelho próximo (400 – 1350 nm), fáceis de sintetizar, com alta pureza química e alta fotoestabilidade.⁴³ Além disso, é importante que não seja tóxico até ser ativado por luz, indolor, comercialmente disponível e biocompatível. Sua distribuição nas organelas subcelulares é crucial, pois seu acúmulo em certas organelas pode alterar a resposta biológica da célula e o processo de morte celular.^{44,45}

O Photofrin, o primeiro fotossensibilizador aprovado clinicamente e comercialmente, é derivado das porfirinas sanguíneas, as Hematoporfirina (Hp), sendo amplamente utilizado para o

tratamento de cânceres no esôfago, pulmão e colo de útero. A modificação da Hp levou ao desenvolvimento de um derivado, o HpD, que se mostrou mais seletivo para os tumores e causou menor fotossensibilização da pele.⁴⁶ Além disso, outras classes de compostos como clorinas, derivados de porfirina, bacterioclorina e ftalocianinas, desempenham um papel crucial na terapia fotodinâmica devido à sua estrutura única, representas na Fig. 6. Essa estrutura, conhecida como tetrapirrólica, possui duplas ligações que, quando reduzidas, causam um deslocamento na absorção de luz para comprimentos de onda mais longos. Isso significa que esses FSs podem absorver mais luz de forma eficiente, o que é essencial para ativar o processo terapêutico.^{47,48}

Figura 6: Estrutura básica dos fotossensibilizadores orgânicos mais utilizados.



Fonte: Adaptado de: R. Baskaran et. al.⁴³

Embora amplamente reconhecidos, esses FSs apresentam algumas limitações, incluindo uma baixa compatibilidade, baixa pureza química, intervalos de absorção com diferentes alcances, tempo de meia-vida longo e dificuldades na obtenção e acúmulo.^{49,50} Essas restrições motivaram a busca por

alternativas mais eficazes, e, nesse contexto, o azul da Prússia (AP) e seus análogos têm despertado interesse crescente. Com propriedades vantajosas, como maior estabilidade e perfis de absorção mais adequados, o AP surge como um candidato promissor para superar as limitações dos FSs tradicionais na terapia fotodinâmica.

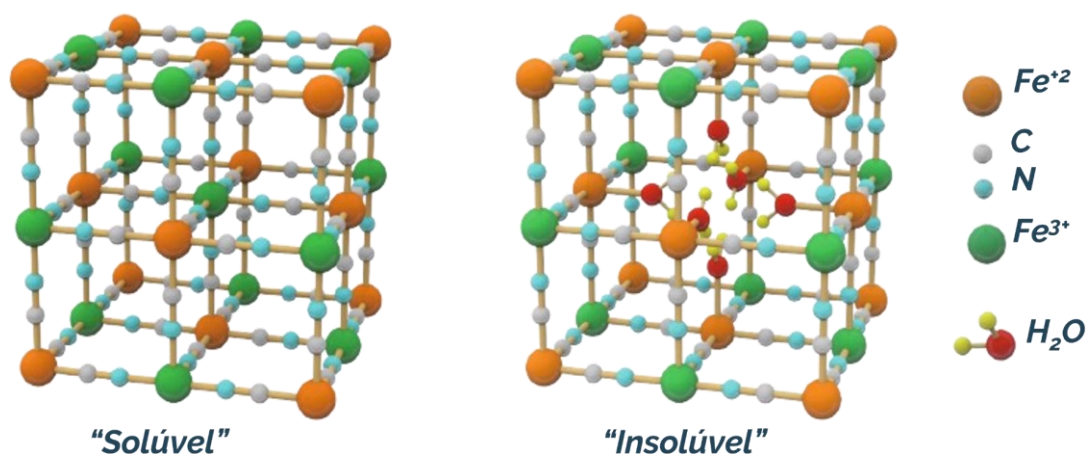
1. 7. Azul da Prússia

O azul da Prússia (AP), é um composto com uma rica história e ampla aplicação em diversas áreas, incluindo arte, tecnologia e medicina. Este pigmento azul escuro, aprovado pela FDA (do inglês - *food and drug administration*),⁵¹ tem sua fórmula química ideal $\text{Fe}_4^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, que é também conhecido como hexacianoferrato de ferro (HCFFe), e que consiste em sítios alternados de ferro(II) e ferro(III) coordenados octaedricamente por ligantes de cianeto, formando uma estrutura cúbica de face centrada, como representado na Fig. 7.⁵² Além disso, o AP apresenta propriedades zeolíticas, caracterizadas pela presença de cavidades interligadas tridimensionalmente (interstícios), que possibilitam o fluxo de íons e pequenas moléculas através do material.⁵³

A disposição estrutural do hexacianoferrato de ferro (HCFFe) também permite a substituição dos sítios de ferro por outros metais de transição, originando espécies com estrutura semelhante, mas composição distinta, conhecidas como análogos de azul da Prússia (AAP). A fórmula geral para essa classe de compostos é $\text{A}_m\text{M}_x[\text{M}'(\text{CN})_6]_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (onde A = cátions; M e M' = metais de transição) e a capacidade de alterar a composição dos sítios metálicos permite variar certas propriedades, o que, por sua vez, expande o número de áreas da ciência em que os hexacianoferrados metálicos (HCF) podem ser aplicados.^{54,55}

Essa flexibilidade estrutural também influencia diretamente a solubilidade do AP e seus análogos. A modificação dos cátions e metais de transição pode resultar em estruturas “solúveis” ou “insolúveis”. Atualmente, há um consenso generalizado de que ambas as formas de AP são insolúveis, ambos com produto de solubilidade aquosa na ordem de 10^{-41} .⁵⁶ A diferença reside no fato de que a estrutura “solúvel” forma uma suspensão coloidal estável de nanopartículas em água, resultando em uma aparência de solução azul, enquanto a estrutura “insolúvel” se deposita no fundo. As composições distintas foram determinadas analiticamente para ambas estruturas, o “solúvel” é representado por $\text{AFe}[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, onde A pode ser potássio (K), sódio (Na) ou amônio (NH_4), por exemplo. Já para “insolúvel”, a fórmula é $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, sem a presença de cátions alcalinos.^{57,58}

Figura 7: Estrutura cristalina esquemática das redes de AP ou AAPs:
a) Uma rede intacta de $A_mM_x[M'(CN)_6]$ sem defeitos estruturais.
b) Uma rede defeituosa de $A_mM_x[M'(CN)_6]$ com vacâncias e água intersticial presente em cada célula unitária.



Adaptado de: C. Xu et. al.⁵⁹

A capacidade de substituir um único sítio metálico na estrutura dos HCFs abre vastas oportunidades para a modulação de suas propriedades físico-químicas. Essa versatilidade é exemplificada por hexacianoferratos de diversos metais, como zinco,⁶⁰ prata,⁶¹ cobre,⁶² cobalto,⁶³ manganês,⁶⁴ entre outros. A substituição metálica não só diversifica as características do material, como também expande significativamente o espectro de suas aplicações. Essa alteração permite o desenvolvimento de materiais com propriedades aprimoradas para sensores⁶⁵ e biosensores,⁶⁶ eletrocatalisadores,⁶⁷ eletrodos de baterias⁶⁸ e dispositivos eletrocromáticos.⁶⁹ Além disso, suas propriedades podem ser exploradas nos âmbitos medicinais,⁷⁰ atuando como agente antibacteriano⁷¹ e, principalmente, na terapia fotodinâmica para o tratamento de câncer,⁷² onde suas propriedades podem ser ajustadas para otimizar a eficácia terapêutica.

O hexacianoferrato de cobalto (HCFCo) se destaca como um análogo particularmente interessante do AP devido a várias vantagens em comparação com outros compostos similares. Primeiramente, a viabilidade financeira é um aspecto crucial, e o cobalto (Co) destaca-se por seu custo significativamente mais acessível em comparação com metais preciosos como a platina (Pt), paládio (Pd), rutênio (Ru) e ródio (Rh), frequentemente utilizados em tratamentos de câncer.⁷³ No corpo humano, o cobalto não é utilizado diretamente como um íon metálico independente, mas sim como componente da vitamina B12 (cobalamina), que é essencial para a formação de glóbulos vermelhos, manutenção do sistema nervoso e síntese de DNA.⁷⁴ Além disso, o Co em forma de HCF

não apenas estabiliza o composto, mas também assegura sua durabilidade e consistência nas propriedades funcionais, tornando-o uma opção viável e eficiente para aplicações terapêuticas.⁷⁵

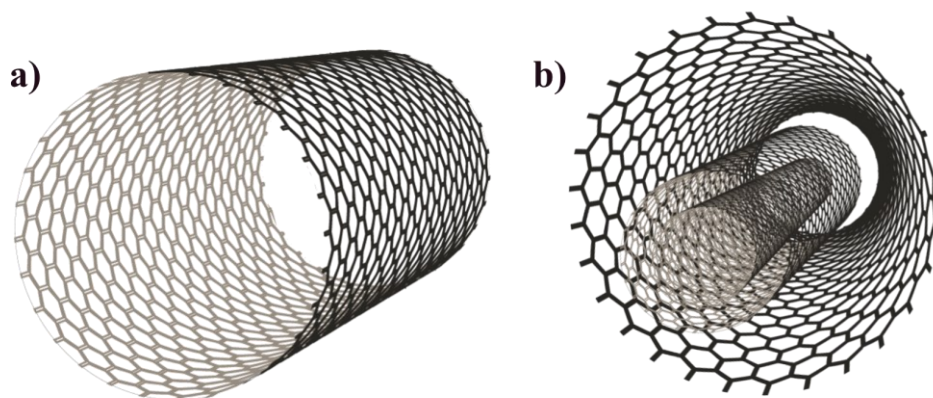
Os AAPs são diretamente influenciados pelos métodos de preparação aplicados. Usualmente, o produto é obtido através de uma reação direta entre um sal de ferricianeto ou ferrocianeto e um sal precursor de metal em um ambiente aquoso, precipitando imediatamente devido à sua insolubilidade.⁷⁶ No entanto, diversos métodos são empregados para controlar a formação e o crescimento das partículas dessas substâncias, resultando em diferentes características e propriedades. As rotas de preparação mais comuns incluem coprecipitação,⁷⁷ métodos eletroquímicos,⁷⁸ microemulsão,⁷⁹ sonoquímicos⁸⁰ e hidrotermais.⁸¹ A escolha do método de obtenção pode influenciar como esses materiais se integram com outras nanoestruturas, como os nanotubos de carbono, que oferecem propriedades complementares e podem ampliar suas funcionalidades.

1. 8. Nanotubos de carbono

A nanociência e a nanotecnologia se desenvolveram rapidamente nos últimos vinte anos, resultando em uma ampla variedade de nanomateriais disponíveis para aplicação em teranóstica.^{82,83} Nesse cenário, os materiais à base de carbono se destacam como excelentes candidatos para atuar como agentes de fototerapia e também como plataformas ou carreadores desses compostos fotossensibilizadores.⁸⁴ Mais especificamente, os nanotubos de carbono (NTCs) têm recebido crescente atenção na área medicinal devido a sua eficiência de carregamento de fármacos, biomoléculas ou FS.

Esses materiais são nanoestruturas compostas por camadas de grafeno enroladas em cilindros, podendo ser de parede simples (SWCNTs, do inglês *single-walled carbon nanotubes*) – Fig. 8a. ou de paredes múltiplas (MWCNTs, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*), representado na Fig. 8b.⁸⁵ Eles exibem excelente condutividade térmica, eletrônicas, propriedades ópticas e, especialmente, uma elevada capacidade de penetração em tecidos tumorais.⁸⁶ Dessa forma, os NTCs desempenham um papel significativo ao eliminar células cancerígenas, interrompendo suas condições básicas de sobrevivência, graças à sua capacidade de penetração no tumor e à ação de entrega de fármacos.⁸⁷

Figura 8: Representação esquemática de um nanotubo de carbono de parede simples (SWCNT) **(a)** e de um nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) **(b)**.



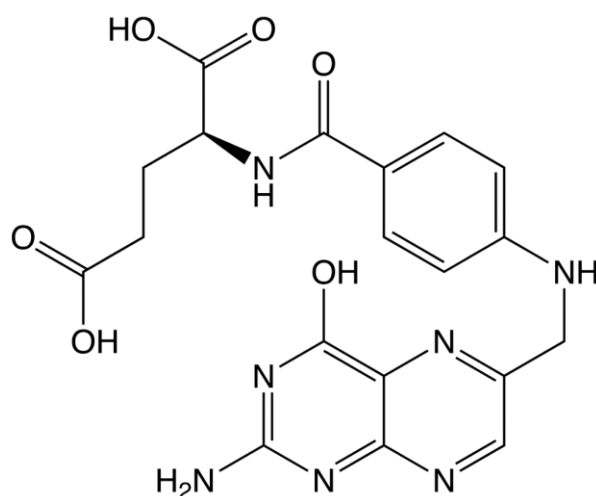
Adaptado de: S. Jabeen et. al.⁸⁸

A estrutura dos NTCs permite a funcionalização química (NTCf), o que facilita a conjugação com agentes terapêuticos, devido à permeabilidade, biocompatibilidade e especificidade de direcionamento, promovendo maior especificidade em tratamentos oncológicos.⁸⁹ Além disso, a exposição aos NTCs, tanto a curto quanto a longo prazo, induz a produção excessiva de ERO, perturbando o equilíbrio oxidativo celular.⁹⁰ As mitocôndrias, responsáveis por consumir 90% do oxigênio para produzir ATP e eliminar as EROs, são particularmente danificadas, o que dificulta a remoção dessas espécies reativas, levando a danos ao DNA e, consequentemente, a morte celular.⁹¹ Dessa maneira, os NTCs mostram-se como um excelente material na TFD, ao superar alguns efeitos colaterais dos tratamentos convencionais quando acoplados a FSs.

1. 9. Ácido fólico

O ácido fólico (AF) é uma molécula da vitamina do complexo B (Fig. 9) que demonstrou notável eficiência no desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas para o tratamento de câncer.⁹²

Figura 9: Molécula representativa do ácido fólico.



Adaptado de: J. Minigh et. al.⁹³

Sua importância se estabelece através de sua capacidade de interagir com receptores específicos, frequentemente superexpressos nas células tumorais de diversos tipos de câncer, como o uterino, ovariano, pulmonar e de mama.⁹⁴ Esses receptores, conhecidos como transportadores de folato, facilitam a internalização do AF nas células.⁹⁵ Em geral, o receptor de folato, um receptor de superfície celular ancorado em glicosilfosfatidilinositol, é superexpresso na maioria dos tecidos cancerosos, enquanto sua expressão permanece limitada em tecidos e órgãos saudáveis.⁹⁶ Assim, a interação entre o AF e o receptor de folato pode ser explorada para direcionar os nanotubos de carbono especificamente às células cancerosas, aumentando o acúmulo e a entrega seletiva do fotossensibilizador. Essa técnica não apenas aprimora a precisão do tratamento, como também diminui os efeitos adversos comuns aos tratamentos tradicionais, que impactam tanto as células saudáveis quanto as cancerosas.⁹⁷

O AF destaca-se por sua estabilidade, acessibilidade e ausência de resposta imunológica, atuando como um veículo ideal para a entrega direcionada de terapias antumorais. O mecanismo de ação do AF decorre de sua capacidade de se unir aos receptores folato, promovendo a entrada de moléculas conjugadas a ele.⁹⁸ Essa ligação permite que medicamentos terapêuticos, como quimioterápicos e agentes citotóxicos, sejam transportados para o interior das células malignas, potencializando a eficácia do tratamento e minimizando danos às células normais.⁹⁹ Dessa maneira, a alta especificidade do AF para células cancerosas, mostra-se um método superior para a entrega de agentes antitumorais no interior das células.¹⁰⁰

1. 10. Nanocompósitos

Além disso, a preparação de nanocompósitos pode aumentar significativamente a eficácia da TFD no tratamento de tumores, pois permitem um direcionamento melhorado, sendo projetados para se acumular especificamente em células cancerosas, minimizando danos aos tecidos saudáveis e melhorando a penetração.¹⁰¹ Além disso, os nanocompósitos atuam como transdutores de energia eficientes, facilitando a conversão de energia luminosa em EROs,¹⁰² que são cruciais para destruir células tumorais. Adicionalmente, esses nanomateriais oferecem multifuncionalidade, combinando funções como entrega de medicamentos e aprimoramento de imagens.¹⁰³ Por fim, eles otimizam terapias combinadas ao integrar TFD com tratamentos adicionais, como a quimioterapia, para maximizar os resultados na eliminação tumoral.¹⁰⁴

Assim, neste estudo, o nanocompósito HCFCo@NTCf@AF foi sintetizado pela primeira vez, em condições moderadas, pelo método de coprecipitação, e caracterizado por diferentes técnicas de difração, microscopia e espectroscopia. De acordo com as informações anteriores, espera-se que os nanocompósitos preparados sejam sensíveis à radiação visível e exibam um comportamento superior em comparação com os compostos individuais, sendo um candidato excepcional para a estratégia de TFD, sendo um potencial candidato tratamento contra células de câncer de mama triplo-negativo.

2. OBJETIVOS

2. 1. Objetivos gerais

Sintetizar, caracterizar e aplicar novos nanocompósitos a base de hexacianoferrato de cobalto conjugados com nanotubos de carbono e ácido fólico para terapia fotodinâmica em células de câncer de mama tripo-negativas.

2. 2. Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar o compósito contendo nanotubos de carbono funcionalizados (NTCf), hexacianoferrato de cobalto (HCFCo) e ácido fólico (AF);
- Testar a toxicidade (cito e foto) dos nanotubos de carbono e hexacianoferrato de cobalto em células tumorais;
- Investigar a localização intracelular do compósito em células tumorais;
- Avaliar se a morte celular causada pelos compósitos e seus controles são majoritariamente do tipo apoptose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. 1. Materiais

As soluções e dispersões empregadas neste trabalho foram preparadas com água destilada, na presença de oxigênio e à temperatura ambiente. A Tabela 1 apresenta os reagentes, suas fórmulas, teores de pureza e origens, que foram utilizados sem qualquer processo de purificação.

Tabela 1: Lista de reagentes utilizados no trabalho.

Reagentes	Fórmula	Pureza	Origem
Nitrato de cobalto hexahidratado	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\geq 98\%$	Synth (Brasil)
Ácido nítrico	HNO_3	$\geq 65\%$	Synth (Brasil)
Ferricianeto de potássio (III)	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	$\geq 99\%$	Êxodo Científica (Brasil)
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	$\geq 98\%$	Êxodo Científica (Brasil)
Citrato de sódio diidratado	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\geq 98\%$	Panreac (Espanha)
Ácido fólico	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$	$\geq 97\%$	Saint Louis (EUA)
Nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NC7000)	C_n	$\geq 90\%$	Nanocyl (Bélgica)
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	$\geq 99,5\%$	Êxodo Científica (Brasil)

Os MWCNTs utilizados possuem um diâmetro interno de ~ 1 nm a 2 nm e um diâmetro externo de aproximadamente 10 nm.

As células MDA-MB 231 (HTB-26TM) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e possuem um tamanho médio de 100 μm . O meio de cultura foi o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromida (MTT), solução salina tamponada com fosfato (PBS) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). LEDs emissores de luz vermelha (630 nm; densidade de potência: 5 J cm^{-2}) foram usados como fonte de luz para o experimento fotodinâmico.

3. 2. Métodos

3. 2. 1. Instrumentação

3. 2. 1. 1. Microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (MEV e EDS)

As imagens de microscopia eletrônicas de varredura foram obtidas por um microscópio Vega 3 da Tescan (República Tcheca) sob tensão de 20 kV utilizando um detector de elétrons secundários em conjunto com um detector EDX (Oxford Instruments, Bucks, Inglaterra). Para aquisição dos espectros foi utilizado uma voltagem de 10 kV. O equipamento situa-se no Laboratório de Caracterização de Materiais do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pertencente ao RELAM. A contagem de 100 partículas e estimativas de seus tamanhos foram realizadas utilizando ferramentas do software ImageJ.

3. 2. 1. 2. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão dos nanomateriais foram realizadas pela rede de Laboratório Multiusuário da UFU, sendo obtidas em um Microscópio Eletrônico de Transmissão da Hitachi HT7700, com tensão de aceleração de 100 kV. As amostras foram depositadas em redes de cobre (TedPella). O equipamento situa-se no bloco 6T, sala 05, pertencente ao RELAM, da Universidade Federal de Uberlândia.

3. 2. 1. 3. Difração de raios X (DRX)

A obtenção dos difratogramas de raios X, foi feita pelo equipamento Shimadzu XRD 6000 (Japão) equipado com radiação CuK α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), utilizando 40 kV e 30 mA em um intervalo de 5 a 80°. As medidas de DRX foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pertencente ao RELAM.

3. 2. 1. 4. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos utilizando um espectrofotômetro FTIR Frontier Single Range – MIR da Perkin Elmer, na região compreendida entre 4000 e 500 cm^{-1} e resolução de 1 cm^{-1} . As análises das amostras foram feitas no estado sólido, com a utilização do

acessório (*Attenuated total reflectance*, do inglês – reflectância total atenuada) com cristal de diamante. O espectrofotômetro utilizado pertence ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT) e fica localizado no Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT CM) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

3. 2. 1. 5. Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta – visível (UV-Vis)

Os espectros na região do UV-Vis foram obtidos nos espectrofotômetros Shimadzu modelo UV-2501 BC e Thermo Scientific modelo Eveloution 201, no modo absorbância, com um comprimento de onda na faixa de 200-800 nm. Na leitura dos ensaios foram utilizadas cubetas de quartzo no formato retangular com caminho óptico de 1,0 cm. O espectrofotômetro utilizado pertence ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT) localizado no Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT CM) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

3. 2. 1. 6. Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos em um equipamento LabRAM HR Evolution (HORIBA, Kyoto, Japão) usando um laser de argônio ($\lambda = 532$ nm) com uma incidência de 25% em relação à a faixa de 4000-200 cm^{-1} . As medidas foram realizadas no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores – LNMIS do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia pertencente ao RELAM.

3. 2. 1. 7. Espectroscopia de reflectância difusa

Os espectros na região do UV-Vis foram obtidos no espectrofotômetro Cary 5000 que possui acessório, DRA-2500, para medidas de reflectância difusa na região de 200 - 800 nm com alta resolução para amostras em pó e estado sólido. O espectrofotômetro utilizado pertence ao RELAM do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Pontal.

3. 2. 1. 8. Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria de ambas as amostras foi realizada sob fluxo de ar, com uma taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, utilizando o equipamento da Shimadzu, modelo DTG-60H na faixa de

temperatura de 10 a 500 °C. As medidas foram realizadas no Laboratório de Caracterização de Materiais do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pertencente ao RELAM.

3. 2. 1. 9. Medidas eletroquímicas

As preparações dos materiais e as medidas de voltametria cíclica (VC) foram executadas utilizando um fio de platina, um eletrodo preparado no laboratório de Ag(s)/AgCl(s)/Cl⁻(sat.) e um eletrodo de carbono vítreo (CV) de área de 0,0707 cm² como eletrodo auxiliar, referência e de trabalho, respectivamente. O equipamento utilizado foi o potenciostato/galvanostato Squidstat Solo (Admiral Instruments, EUA) controlado pelo software Squidstat User Interface, disponibilizado pela mesma empresa.

3. 2. 2. Preparação do nanocompósito HCFCo@NTCfs@AF e seus materiais controle

O procedimento de funcionalização dos NTCs foi realizado por oxidação química, envolvendo a combinação de ácido nítrico e ácido sulfúrico. Para o tratamento oxidativo, foram adicionados 0,428 g de NTCs e misturados com 100 mL das soluções ácidas (56 mL de ácido nítrico e 44 mL de ácido sulfúrico), sob agitação mecânica em uma chapa aquecida por 15 minutos a 60 °C. Posteriormente, a mistura foi submetida à ultrassonicação em um banho ultrassônico convencional por 2 h, promovendo a separação dos NTCs na solução ácida. Em seguida, o material foi filtrado e cuidadosamente lavado com água destilada e etanol até atingir pH = 7. Por fim, a suspensão foi seca em estufa com convecção a 70 °C por 24 h.

A síntese dos nanocompósitos foi baseada no método de coprecipitação. O primeiro passo consistiu na preparação das soluções ou dispersões A, B e C. A solução A era uma mistura de 50 mL contendo 0,006 mol L⁻¹ de nitrato de cobalto hexahidratado, 0,005 mol L⁻¹ de citrato de sódio di-hidratado e 0,0113 mol L⁻¹ de ácido fólico. Em contraste, a dispersão B consistia em 2,5 mg de NTCs funcionalizados em 100 mL de água destilada, os quais foram dispersos durante 20 minutos, utilizando um banho ultrassônico de 25 kHz (Ultronique). A solução C constituiu-se de 50 mL de hexacianoferrato de potássio (III) (0,004 mol L⁻¹). Em seguida, A, B e C foram misturadas sob agitação por 1 h, e a mistura resultante obteve uma coloração marrom avermelhada e foi deixada à temperatura ambiente por 18 h e centrifugada com água e etanol. Finalmente, o produto final foi seco por 24 h a 70 °C, conforme ilustrado na Fig. 10. O mesmo processo foi repetido para a preparação dos sólidos HCFCo@NTCf e HCFCo separadamente.

O HCFCo foi preparado usando uma solução A, uma mistura de 50 mL contendo $0,006 \text{ mol L}^{-1}$ de nitrato de cobalto hexahidratado, $0,005 \text{ mol L}^{-1}$ de citrato de sódio di- hidratado. A solução B consistiu apenas de 20 mL de água destilada e a solução C constituiu-se de 50 mL de hexacianoferrato de potássio (III) ($0,004 \text{ mol L}^{-1}$). O mesmo procedimento de mistura, centrifugação e secagem foram mantidos. Já o preparo do nanocompósito HCFCo@NTCf foi semelhante ao do material puro, diferindo-se somente referente a solução B, que nesse processo nos 20 mL de água destilada foram dispersos 2,5 mg de NTCf.

Figura 10: Imagem representativa do processo de síntese do material nanocompósito.



Fonte: a autora.

3. 2. 3. Preparação dos eletrodos modificados

A preparação do eletrodo de trabalho iniciou-se com uma lavagem cuidadosa em água destilada, seguida de secagem completa a 50°C em estufa. Posteriormente, $20 \mu\text{L}$ de uma dispersão aquosa 1 mg mL^{-1} de HCFCo foram depositados uniformemente na superfície de carbono vítreo utilizando o método de *drop casting*, onde o material foi cuidadosamente aplicado em forma de gotas e, em seguida, seco novamente sob as mesmas condições. A VC foi realizada em um sistema de três eletrodos, aplicando-se três ciclos de varredura a uma velocidade de 10 mV s^{-1} , dentro de uma faixa de potencial de 0,0 a $1,0 \text{ V}$ em relação ao eletrodo de referência $\text{Ag(s)}/\text{AgCl(s)}/\text{Cl}^{-}(\text{sat.})$. A solução utilizada continha $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl como eletrólito suporte. Esse procedimento foi replicado integralmente para os nanocompósitos HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF.

3. 3. Ensaios biológicos

3. 3. 1. *Cultura celular e tratamentos*

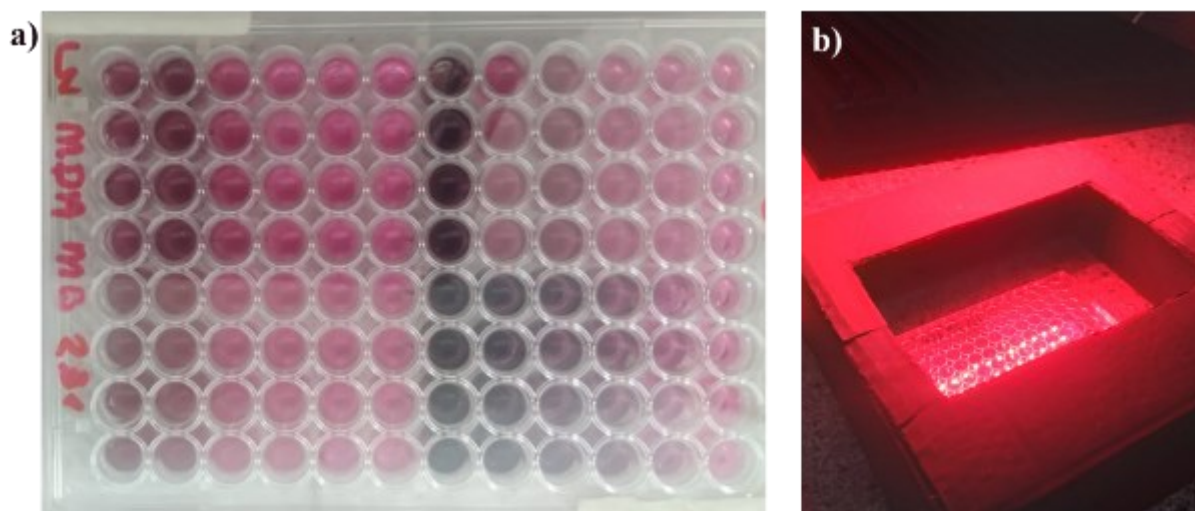
O cultivo de células foi realizado no Laboratório Biologia da Reprodução, coordenado pelo Professor Dr. Marcelo Beletti, situado no Campus Umuarama da UFU. A linhagem celular de câncer de mama humano triplo negativo, MDA-MB-231, foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e em seguida incubada em uma estufa umidificada contendo 5% de CO₂ a 37 °C. As células foram removidas com tripsina e lavadas com PBS para a realização dos experimentos.

3. 3. 2. *Ensaios Fotodinâmicos em células de câncer de mama humano (MDA-MB-231)*

Primeiramente, suspensões de HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCfs@AF foram preparadas em meio de cultura DMEM (10% SFB e 1% antibiótico) e diluídas para diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 1,0 mg mL⁻¹). Para garantir que as amostras estavam estéreis e livres de contaminação, os nanocompósitos foram autoclavados antes de serem diluídos em meio de cultura (já preparados estéreis).

As células MDA-MB-231 foram semeadas em 2 placas de 96 poços (30.000 células/poço) e mantidas sob 5% de CO₂, a 37 °C, por 18 h ou até a total adesão das células ao fundo dos poços. Em seguida, as células foram incubadas por 4 h com os nanocompósitos (HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCfs@AF) em diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 1,0 mg mL⁻¹). Após o período de incubação do nanocompósitos, as células foram lavadas com PBS. Uma das placas foi considerada como controle (sem irradiação por LED) e a outra placa foi irradiada. A placa de referência foi mantida sem incidência de luz por 15 minutos, enquanto a placa irradiada foi exposta a LED vermelho pelo mesmo período de tempo. O ensaio fotodinâmico foi realizado nas condições descritas na Tabela 2. A potência em mW do LED vermelho foi previamente medida com um Medidor de Potência Óptica Newport Modelo 1916-R, conectado a um detector Newport Modelo 818-UV S/N 10488 (EUA). Algumas imagens referentes ao ensaios biológicos estão dispostas nas Fig. 11a e Fig. 11b.

Figura 11: Fotografia do procedimento experimental dos ensaios biológicos. Materias dispersos em DMEM (a) e placa irradiada pelo LED vermelho (b).



Após a irradiação, o PBS foi descartado e 100 μ L de solução DMEM fresca foram adicionados.

Tabela 2: Parâmetros do LED utilizado neste estudo.

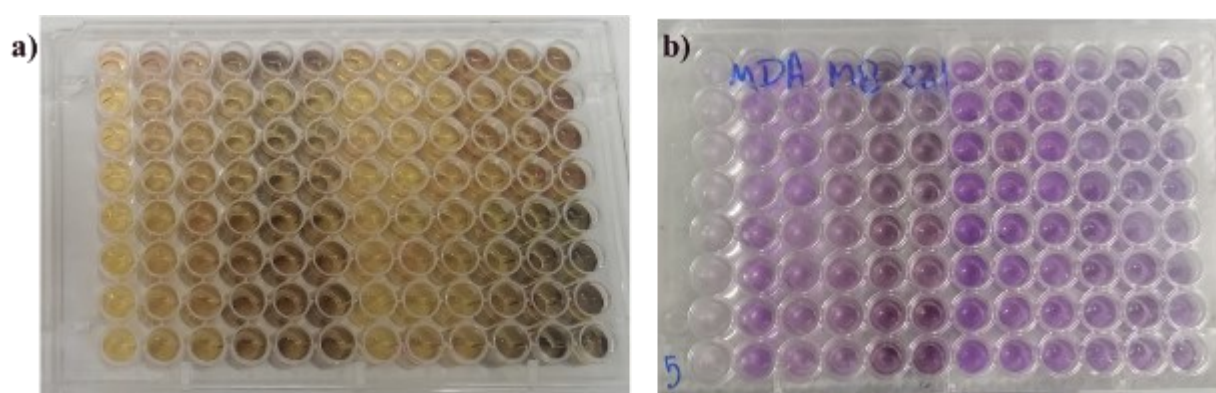
Parâmetro	LED
Comprimento de onda de máxima emissão	630 nm \pm 180 nm
Potência	4,6 mW
Duração da irradiação	900 s
Distância entre o LED e a amostra	7 cm
Área do sensor	0,785 cm ²
Densidade de energia	5 J cm ⁻²

3. 3. 3. Ensaio viabilidade celular via método colorimétrico MTT

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico utilizando 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT) para determinar a sobrevivência celular. Esse

processo pode ser analisado como um mecanismo redutor mitocondrial. Células vivas convertem o composto MTT em cristais de formazan insolúveis em meio aquoso, conforme é mostrado nas Fig. 12a e Fig. 12b. Os cristais resultantes foram solubilizados usando DMSO e sua concentração foi determinada por métodos espectrofotométricos utilizando uma leitora de microplacas do Laboratório de Imunoparasitologia "Dr. Mário Endsfieldz Camargo", coordenado pelo Prof. Tiago Mineo, no Campus Umuarama da UFU.

Figura 12: Materiais dispersos em MTT fase inicial (a) e formação de cristais de formazan (b).



A fototoxicidade e citotoxicidade foi medida após 24 h da fotossensibilização ou tratamento das placas irradiadas e não irradiadas, respectivamente. Resumidamente, após 24 da TFD, foram adicionados 80 μL de MTT ($0,75 \text{ mg mL}^{-1}$) ao meio de cultura, sob 5% CO_2 , por 3 h a 37°C . Após esse período os cristais de formazan formados precipitam, por serem insolúveis em meio aquoso. Por isso, removeu-se o sobrenadante (meio de cultura) dos poços, e dissolveu os cristais de formazan em 100 μL de DMSO. Em seguida, a absorbância foi registrada em 570 nm utilizando a leitora de microplacas. A determinação da % de células viáveis (vivas) foi realizada por meio de leituras de absorbância das células controle e das células tratadas usando a Eq. 1.

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{Abs_{\text{tratamento}}}{Abs_{CT}} \times 100 \% \quad \text{Equação 1}$$

Em que,

$Abs_{\text{tratamento}}$ = Absorbância em 570 nm das células tratadas (com TFD ou com nanocompósitos sem luz)

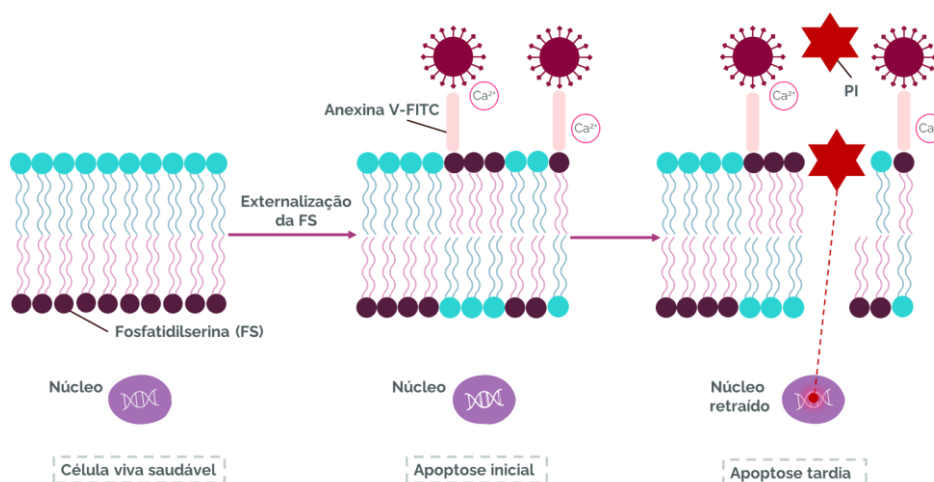
Abs_{CT} = Absorbância em 570 nm das células controles (sem tratamento com nanocompósitos e/ou luz).

Os experimentos foram feitos em duplicata independente, com 4 repetições em cada replicata ($n = 8$), e a análise do desvio padrão e a média foram realizadas através do método de *Holm-Sidak*, com o objetivo de avaliar as diferenças significativas para os valores de % viabilidade celular. Os dados foram tratados pelo software GraphPad Prism 5.0.

3.3.4. Citometria de fluxo com marcação dupla Anexina V- FITC e Iodeto de Propídio (FITC/PI)

A análise do mecanismo de morte celular via apoptose e/ou necrose, foi realizada utilizando um kit de detecção para apoptose e necrose (Invitrogen, #V13245), composto da proteína anexina V conjugada à fluoresceína (FITC, do inglês *Fluorescein isothiocyanate*) e do corante iodeto de propídeo (PI, do inglês *Propidium Iodide*). Os princípios deste ensaio são baseados na ligação da anexina V à fosfatidilserina (PS, do inglês *Phosphatidylserine*) e na capacidade do iodeto de propídeo (PI) de se ligar ao DNA. Em células viáveis, a fosfatidilserina (PS) se encontra na camada lipídica interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, a PS é translocada para a camada externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V. A anexina V marcada com um fluoróforo (FITC) pode identificar células apoptóticas ao se ligar ao PS exposto ao ambiente celular externo (Fig. 12). O iodeto de propídeo (PI) é impermeável à membrana plasmática de células vivas, mas em células mortas, cuja membrana está danificada e permeável, ele penetra e se liga ao DNA, emitindo fluorescência na região do vermelho (Fig. 13).

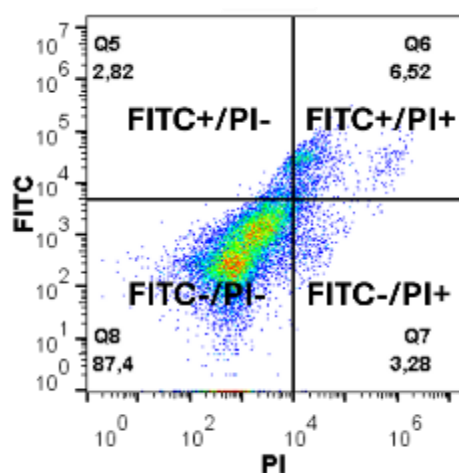
Figura 13: Esquema representativo da marcação de anexina V - FITC e PI em células apoptóticas iniciais e tardias.



Fonte: a autora

Portanto, neste ensaio é possível detectar a proporção de células viáveis (Anexina V-/PI-); células em estágio inicial de apoptose, onde ocorre apenas a exposição da PS na camada externa da membrana plasmática com consequente marcação da anexinaV-FITC (Anexina V+/PI-); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose, no qual além da exposição PS, a membrana plasmática foi danificada e se tornou impermeável ao PI (Anexina V+/PI+) (Fig. 14).

Figura 14: Citograma representativo obtido durante a aquisição de dados e a análise dos resultados de apoptose via citometria de fluxo.



Fonte: a autora.

Para realização do ensaio, células MDA-MB-231 foram semeadas em 1 placa de 12 poços (1×10^6 células/poço) e mantidas sob 5% de CO_2 , a 37°C , por 18 h ou até a total adesão das células ao fundo dos poços. Em seguida, as células foram incubadas por 4 h com os nanocompósitos (HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCfs@AF) na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Após o período de incubação do nanocompósitos, as células foram lavadas com PBS e irradiada com LED vermelho conforme condições descritas na Tabela 2 do item 3.3.2.

Vinte e quatro horas após a irradiação, as células tratadas e de controle (MB-MDA-231) foram desaderidas por tripsinização, lavadas e centrifugadas duas vezes com PBS e ressuspensas em $625 \mu\text{L}$ de solução tampão de ligação 1X (*Binding Buffer*® 1X: 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4). Além das amostras foram os seguintes controles foram usados para configurar compensação e quadrantes:

1. Células não coradas.
2. Células coradas com FITC Annexin V (sem PI).
3. Células coradas com PI (sem FITC Annexin V).

Em seguida, foram adicionados 5 μ L de Anexina V – FITC e 5 μ L de iodeto de propídio, resultando em um volume final de 500 μ L para cada amostra. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. A emissão de fluorescência foi então analisada por citometria de fluxo utilizando o BD Accuri™ C6 Flow Cytometer do Laboratório Nanobiotecnologia, coordenado pela Luciana Bastos, no Campus Umuarama da UFU. Para a Anexina V – FITC, a excitação foi realizada a 488 nm, com emissão registrada no verde com filtro 530/30 nm (FL1). Para o iodeto de propídio (PI), a excitação ocorreu a 633 nm, com emissão no vermelho utilizado o filtro 670 nm Long Pass (FL3). As amostras foram analisadas em triplicata, sendo adquiridos 20.000 eventos por leitura, e os dados obtidos foram processados e analisados utilizando o software FlowJo.

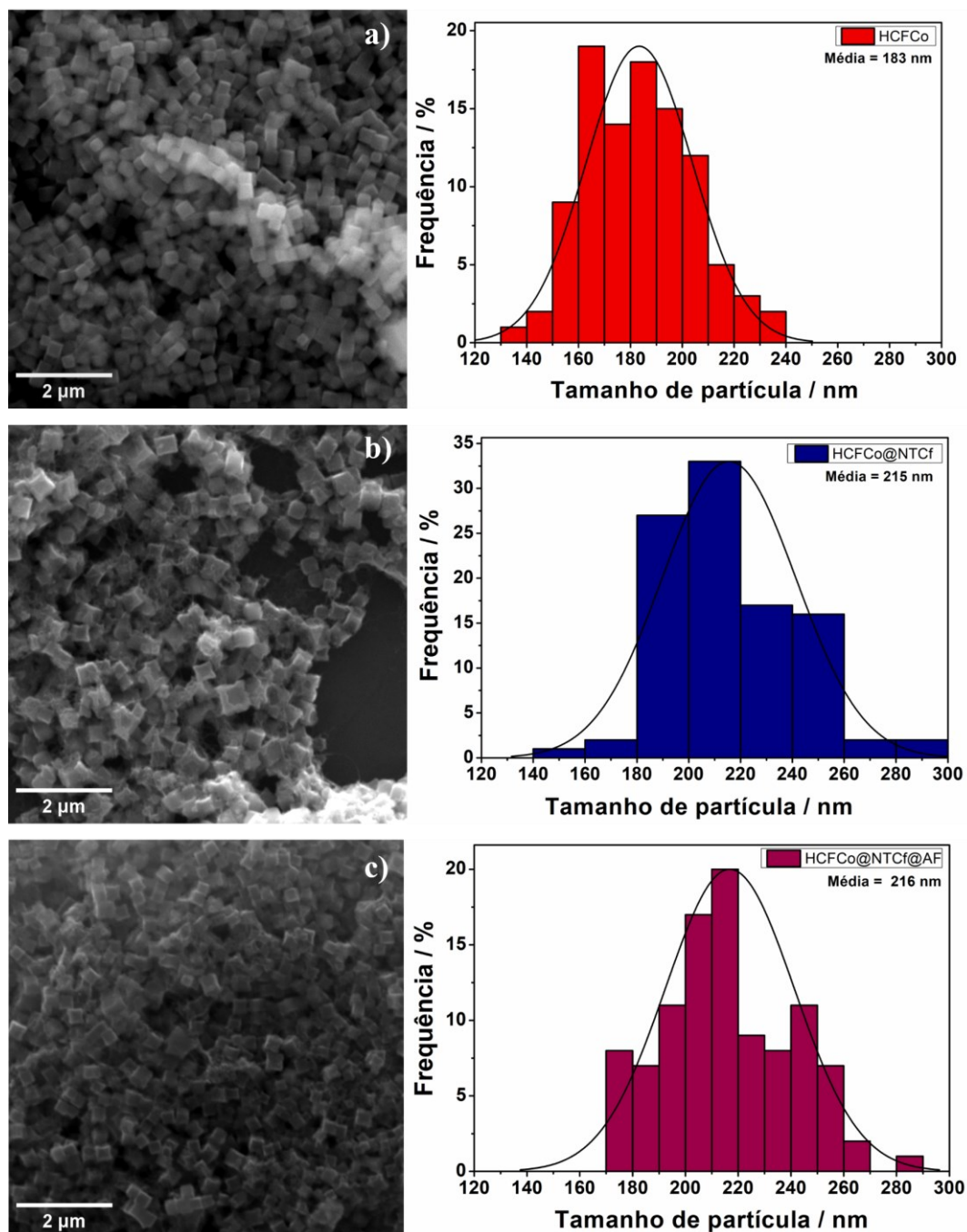
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1. Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica essencial para a caracterização de materiais, permitindo a obtenção de imagens de alta resolução da superfície de amostras. Utilizando um feixe de elétrons, o MEV proporciona uma visualização detalhada da morfologia e topografia, com ampliação que pode chegar a centenas de milhares de vezes. Essa técnica é particularmente importante para identificar características como a forma, tamanho das partículas, e eventuais defeitos superficiais, sendo amplamente utilizada em áreas como ciência dos materiais, biologia e nanotecnologia.¹⁰⁵

As imagens obtidas por MEV revelaram as características morfológicas dos materiais compostos por HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF, conforme mostrado na Fig. 15. Observou-se na Fig. 15a uma estrutura de nanocubos aglomerados de HCFCo. Na Fig. 15b, foi observado que os NTCs estavam totalmente entrelaçados com os nanocubos de HCFCo, formando uma rede integrada no nanocompósito HCFCo@NTCf. A presença do AF não foi claramente percebida no MEV (Fig. 15c), provavelmente devido ao baixo conteúdo e à alta dispersão deste material. Esses resultados mostram que os NTCs influenciaram significativamente o tamanho dos nanomateriais de HCFCo. Além disso, o tamanho médio das partículas pode ser observado nos histogramas obtidos a partir da contagem de aproximadamente 100 partículas apresentados junto com as imagens de MEV.

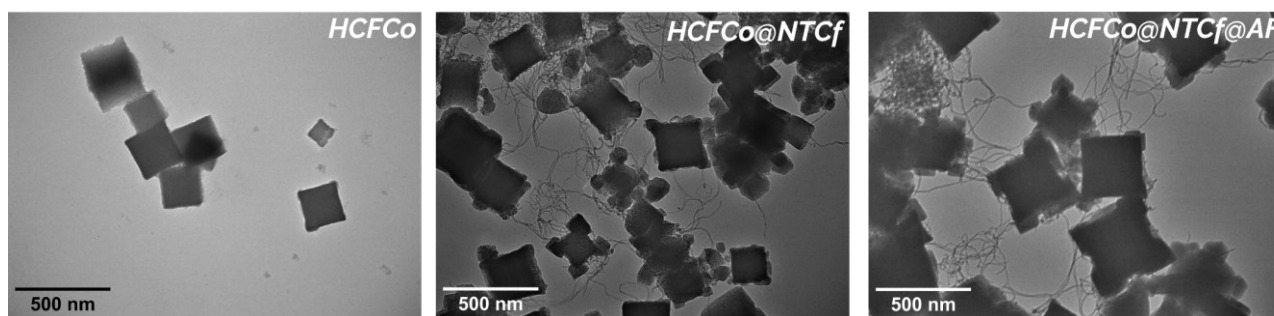
Figura 15: Imagens de MEV de HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b) e HCFCo@NTCf@AF (c) e seus respectivos histogramas.



4. 2. Microscopia eletrtrônica de transmissão

Para uma avaliação mais precisa do tamanho e da morfologia dos materiais sintetizados, todas as amostras foram analisadas por MET. Conforme evidenciado nas imagens da Fig. 16, todas as amostras exibiram uniformidade de distribuição de tamanho semelhantes às imagens mostradas pela MEV. Os nanocompósitos revelaram a presença de nanopartículas de HCFCo com morfologia bem definida em todos os compostos, distribuídas entre os nanotubos de carbono, que apresentam uma estrutura do tipo "*spaghetti-like*" (fios sobrepostos). Também nota-se, principalmente nos nanocompósitos contendo NTCs, a presença de nanocubos de menor diâmetro nos vértices dos cubos de maior diâmetro. O AF não exibiu uma morfologia característica e definida, sendo imperceptível nas imagens de MET, assim como nas de MEV.

Figura 16: Imagens de MET das amostras HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b) e HCFCo@NTCf@AF (c).



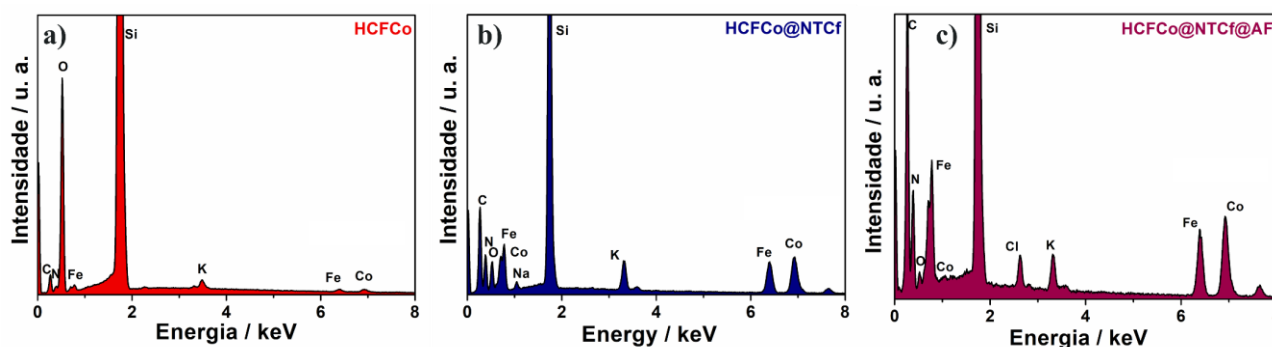
4. 3. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia

A espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX) é uma técnica complementar à MEV que permite a análise qualitativa e semi-quantitativa da composição elementar de materiais. Utilizando essa técnica é possível avaliar a presença e intensidade dos sinais de raios X característicos emitidos pelos elementos presentes na amostra, o EDS fornece informações detalhadas sobre a distribuição e concentração dos elementos químicos. Essa técnica é particularmente útil para identificar impurezas, investigar a homogeneidade do material e verificar a presença de elementos específicos em regiões de interesse, contribuindo para uma compreensão mais completa da amostra analisada.¹⁰⁶

A composição elementar dos materiais sintetizados pode ser observada na Fig. 17. Para essa caracterização, todos os nanomateriais foram depositados em substratos de silício (Si), o que explica a presença desse elemento em todos os espectros. A presença de potássio (K) se deve ao uso do

ferricianeto de potássio $K_3[Fe(CN)_6]$, que está ocupando os interstícios da estrutura do análogo.

Figura 17: Espectros de raios X por dispersão em energia dos materiais desenvolvidos nesse trabalho: amostras HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b) e HCFCo@NTCf@AF (c).

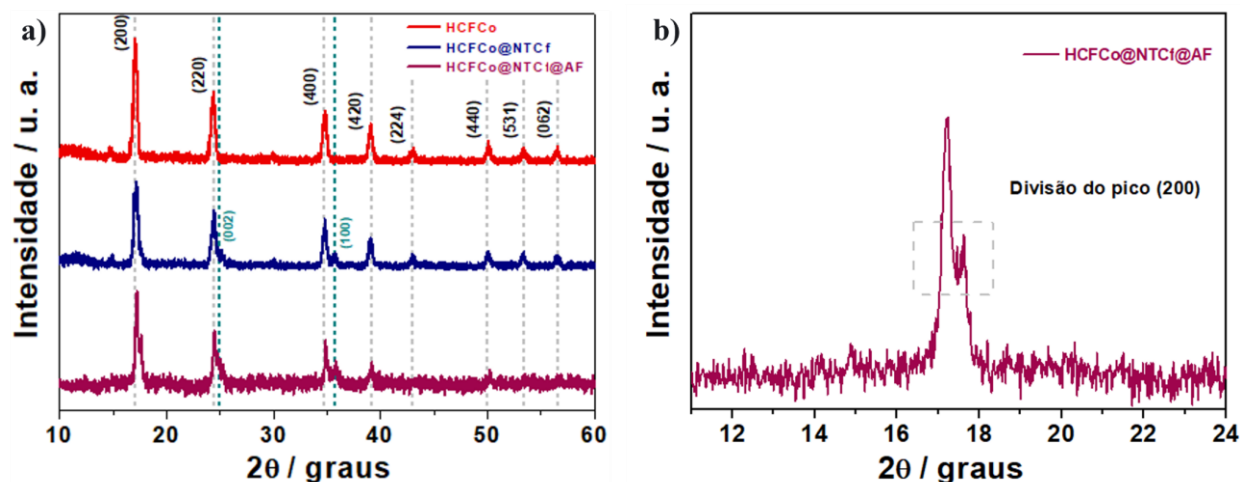


O espectro do HCFCo revelou picos característicos dos elementos ferro (Fe), cobalto (Co), nitrogênio (N) e carbono (C), confirmando a composição elementar do HCFCo. Nas amostras referentes ao nanocompósitos, observou-se a mesma composição elementar básica, com um aumento notável na proporção de Co/Fe. Essa razão de Co/Fe relacionada ao material puro é igual a 1.38, já para os nanocompósitos HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF, foram observadas razões de 1.40 e 1.46, respectivamente. Esse aumento pode ser atribuído diminuição de Fe que sugere uma maior quantidade de vacâncias de ferricianeto indicando que os NTCfs e AF induzem a formação destes defeitos estruturais.

4. 4. Difração de raios X

A difração de raios X (DRX) é uma técnica crucial para a caracterização de materiais cristalinos, permitindo a análise da estrutura atômica e a determinação da fase cristalina. Ao irradiar a amostra com raios X e examinar os padrões de difração resultantes, é possível obter informações sobre o arranjo atômico, o tamanho dos cristais e a presença de impurezas ou fases não-cristalinas. Além disso, a DRX oferece dados sobre a organização a longa distância do material, revelando a disposição ordenada das unidades estruturais em uma escala maior. Essa técnica é essencial para confirmar a identidade do material, como a cristalização de novos compostos ou a alteração na orientação dos cristais durante um processo. Na Fig. 18, é possível observar os difratogramas dos materiais nanocompósitos sintetizados.

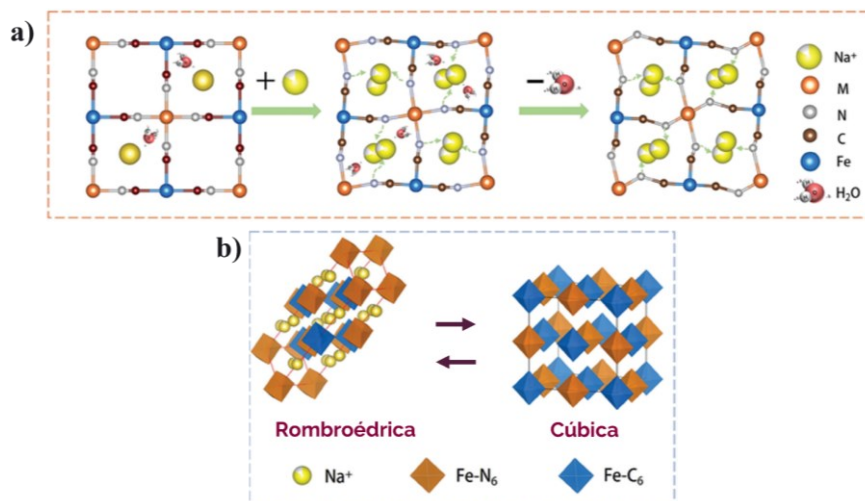
Figura 18: Difratogramas dos materiais HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF em (a) e divisão do pico (200) em $17,7^\circ$ em (b).



Para todas as amostras (Fig. 18a), foram observados picos de difração correspondentes à estrutura cristalina cúbica de face centrada (fcc) do HCFCo, relacionados aos planos hkl (200), (220), (400), (420), (224), (440), (531) e (620), indexados de acordo com o arquivo cristalográfico JCPDS (JCPDS 86-0502).¹⁰⁸ Além disso, picos podem ser observados na região de $2\theta = 25^\circ$ e 36° nas amostras de HCFCo@MWCNTf e HCFCo@MWCNTf@FA, os quais podem ser associados à distância interplanar das paredes dos nanotubos de carbono e ao alinhamento e regularidade do plano hexagonal, correspondendo aos planos (002) e (100), respectivamente. Os picos relacionados aos nanotubos de carbono sugerem que a estrutura da rede cristalina do material de carbono não foi danificada pela funcionalização.¹⁰⁹

Um leve deslocamento dos picos para maiores valores de 2θ também pode ser observado nos difratogramas dos nanocompósitos quando comparados ao do HCFCo puro, o que sugere alteração na rede. Esse fenômeno pode ser atribuído a presença de NTCfs e AF na estrutura do hexacianoferrato, causando uma mudança dos parâmetros de cela unitária do hexacianoferrato e formação de vacâncias do tipo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.¹¹⁰ Além disso, a Fig. 18b mostra um pico extra em $17,7^\circ$ para o HCFCo@NTCf@AF, que indica a distorção da rede cúbica do hexacianoferrato para uma fase romboédrica, mostrando uma variação na quantidade de K^+ na rede que distorce a estrutura. Essa transição de fase indica a presença de duas estruturas simultaneamente, que estão exibidas nas Fig. 19a e 19b, para os íons Na^+ , mas o mesmo comportamento pode ser observado para os íons K^+ .^{111–113}

Figura 19: Representação da variação de K^+ na rede em (a) e distorção da rede cúbica do HCFCo para uma fase romboédrica em (b).



Adaptado de: H. Yao et.al. ¹¹⁴

A Tabela 3 apresenta as análises da Lei de Scherrer e da Lei de Bragg, utilizadas para determinar o tamanho médio dos cristalitos e a distância interplanar (d) dos materiais sintetizados.

Tabela 3: Dados da Lei de Scherrer e Lei de Bragg dos materiais estudados.

Materiais	Lei de Scherrer \AA	Lei de Bragg (d)
HCFCo	178	5.20
HCFCo@NTCf	148	5.17
HCFCo@NTCf@AF	268	5.15

Os valores de t indicam que o HCFCo puro apresenta um cristalito de 178 \AA , enquanto a incorporação dos NTCf reduz esse tamanho para 148 \AA , sugerindo que os nanotubos podem restringir o crescimento dos cristalitos durante a síntese, possivelmente atuando como nucleadores secundários. No entanto, com a adição de AF, o tamanho do cristalito aumenta significativamente para 268 \AA , o que pode indicar um efeito de reorganização estrutural ou crescimento preferencial dos cristais devido a interações entre o ácido fólico e a matriz.

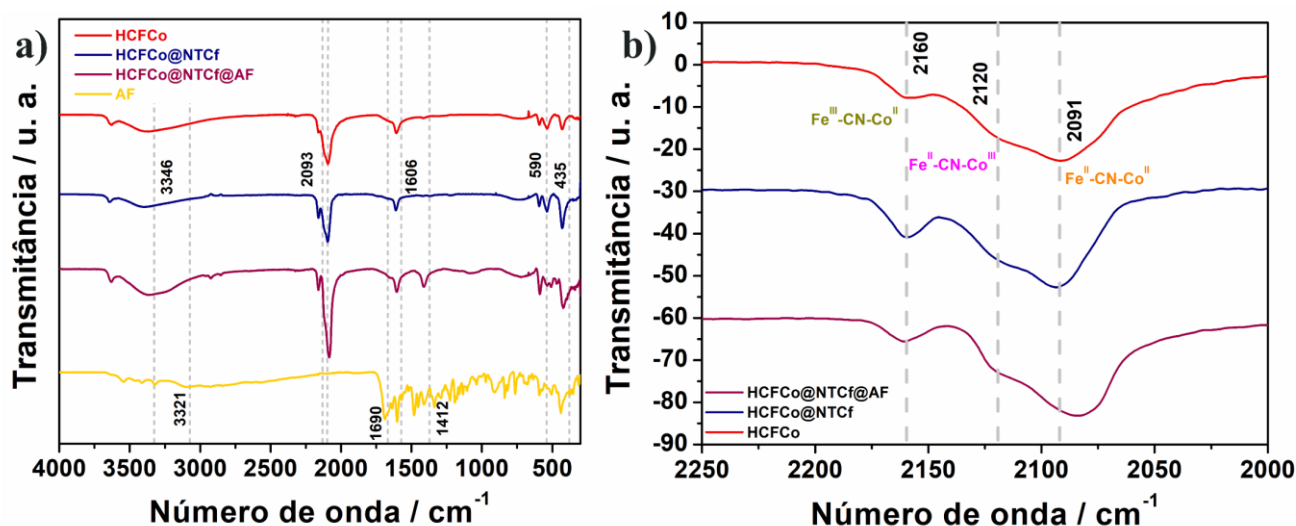
Em relação à Lei de Bragg, observa-se uma leve redução na distância interplanar (d) com a funcionalização. O valor de d para o HCFCo puro é 5,20 \AA , diminuindo ligeiramente para 5,17 \AA com

a incorporação dos nanotubos e para 5,15 Å com a incorporação adicional com AF. Essa diminuição sugere que a interação entre os NTCf e a matriz, assim como a introdução do AF, pode induzir um leve rearranjo estrutural, resultando em uma compactação da rede cristalina.

4. 5. Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de caracterização fundamental que permite a identificação e análise de compostos químicos com base na absorção de radiação infravermelha por suas ligações moleculares. Cada tipo de ligação vibra em frequências específicas, gerando um espectro único que funciona como uma "impressão digital" do material. Além de ser crucial para determinar grupos funcionais presentes na amostra e estudar interações químicas, a técnica também fornece informações sobre a estrutura organizacional de curto alcance, revelando detalhes sobre a disposição molecular e ligações dentro do material. Os espectros de todos os materiais podem ser visualizados na Fig. 20a, enquanto o recorte da área em 2100 cm^{-1} foi representado pela Fig. 20b.

Figura 20: Espectros na região do infravermelho por transformada de Fourier do HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF (a) e destaque da região $\nu(\text{CN})$ de 2000 a 2500 cm^{-1} (b).



A Fig. 20a revela que, em todos os compostos analisados que contêm HCFCo, as bandas $\nu(\text{OH})$, $\delta(\text{HOH})$ e $\nu(\text{CN})$ foram identificadas aproximadamente em 3346, 1606 e 2093 cm^{-1} , correspondendo aos grupos hidroxila, à presença de água e aos cianetos, respectivamente, conforme indicado na Tabela 4.

A banda $\nu(\text{OH})$ pode fornecer informações sobre a coordenação da molécula de água. A observação da mesma na faixa de absorção 3000 a 3700 cm^{-1} é uma indicação clara da presença de grupos -OH em moléculas de água na estrutura do material. Essa característica é típica de moléculas de água que estão inseridas nas cavidades estruturais, mas que não formam ligações fortes com a rede do material. Além disso, a banda em 3346 cm^{-1} é atribuída a moléculas de água fortemente ligadas por ligações de hidrogênio na estrutura, conforme relatado em estudos anteriores. Essa banda indica que, além das moléculas de água fracamente ligadas, há também uma fração de moléculas de água que estão firmemente coordenadas aos átomos da rede, provavelmente ocupando posições críticas na estrutura, como os locais de coordenação de cátions metálicos.¹¹⁵

As bandas apresentadas em números de onda abaixo de 600 cm^{-1} estão relacionadas às vibrações das ligações M-NC. Nesse mesmo contexto, foram observadas bandas de absorção características dos hexacianoferratos metálicos, que estão relacionadas à unidade octaédrica $[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, como $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{MCN})$, $\nu(\text{MC})$, $\nu(\text{OH})$ e $\delta(\text{HOH})$. Além disso, os nanocompósitos e os materiais controle apresentaram bandas na região de 422 e $\sim 590\text{-}537$ cm^{-1} , associadas a $\delta(\text{Co-NC-Fe})$ e $\nu(\text{Fe-C})$, respectivamente.^{113,116}

Tabela 4: Frequência (em cm^{-1}) das bandas de absorção observadas no estudo dos nanocompósitos sintetizados e seus respectivos controles.

<i>Amostras</i>	$\nu(\text{CN})$	$\delta(\text{MCN})$	$\nu(\text{MC})$	$\nu(\text{OH})$	$\delta(\text{HOH})$	$\nu(\text{NH})$	$\nu(\text{CO})$	$\nu(\text{CH})$
<i>HCFCo</i>	2093	590-537	422	3395	1606	-	-	-
<i>HCFCoNTCf</i>	2093	590-537	422	3395	1606	-	-	-
<i>HCFCoNTCfAF</i>	2084	590-537	422	3360	1606	3321	1690	1412

Em destaque, na Fig. 20b, é possível verificar que a intensidade relativa da banda e o deslocamento do estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$, relacionada a espécie $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Co}^{\text{II}}$, aumenta, indicando uma maior formação da espécie completamente reduzida do HCFCo, além de possível interação entre o análogo e AF. No entanto, também é possível observar a formação de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-CN-Co}^{\text{II}}$ misturado com pequenas

quantidades de $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-CN-Co}^{\text{III}}$, o que sugere a presença de uma mistura de diferentes estados de oxidação de Fe e Co na estrutura do HCFCo.¹¹⁷

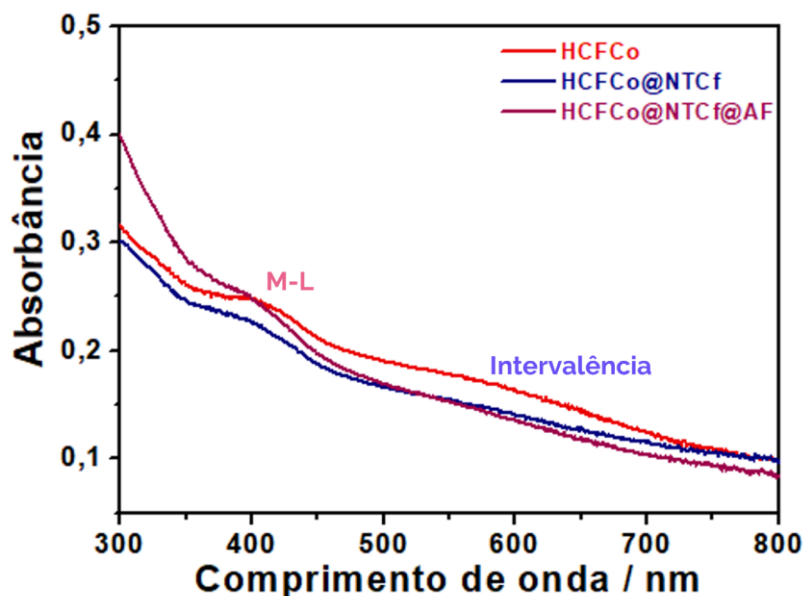
Como foi discutido no difratograma do nanocompósito ternário, o íon K^+ é uma variável que pode afetar as fases e as estruturas dos HCFs. Nesse contexto, é necessário lembrar que o K^+ atua como um contra-íon, estabilizando as cargas negativas dentro da rede cúbica do hexacianoferrato e sua presença na estrutura também promove uma redistribuição eletrônica, influenciando diretamente os estados de oxidação dos íons metálicos. Dessa maneira, a variação na concentração de K^+ pode resultar em diferentes estados de oxidação para as espécies de Fe e Co, como observado nas bandas distintas no espectro de FTIR. Analiando os resultados, as técnicas DRX e FTIR se complementam, proporcionando uma análise abrangente das mudanças estruturais na rede cristalina.

O espectro isolado do AF exibiu claramente vibrações características de $\nu(\text{NH})$, $\nu(\text{CO})$ e $\delta(\text{CH})$, que também foram identificadas no espectro do HCFCo@NTCf@AF, confirmando a presença do AF no nanocompósito ternário. As bandas em 3321 cm^{-1} , correspondem aos grupos amina, em 1412 cm^{-1} , atribuídas aos grupos C-H, e em 1690 cm^{-1} , relacionadas à cetona livre do grupo carboxílico.¹¹⁸ Essas observações confirmam a incorporação bem-sucedida dos grupos funcionais do AF e da incorporação da molécula inteira na estrutura do nanocompósito HCFCo@NTCf@AF, evidenciando sua integração efetiva e contribuição para as propriedades do material.

4. 6. Espectroscopia de absorção molecular na região do ultravioleta – visível

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica essencial para a caracterização de materiais, especialmente na análise de suas propriedades ópticas e eletrônicas. Ao medir a absorção de luz ultravioleta e visível, é possível obter informações detalhadas sobre a presença de grupos funcionais, estados de oxidação e interações moleculares. Além disso, essa técnica é crucial para estudos de fotoquímica e fotofísica, permitindo a investigação de transições eletrônicas e o comportamento dos materiais sob exposição à luz. Na Fig. 21, são exibidos os espectros dos materiais preparados nesse trabalho. O HCFCo e seus nanocompósitos foram dispersos em água e a leitura da absorbância foi feita na faixa de 300–800 nm, à temperatura ambiente, utilizando a concentração de $0,05\text{ mg mL}^{-1}$.

Figura 21: Medições de UV-Vis HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF dispersos em água.



Os HCFs, exibem características espectrais distintas que refletem suas interações eletrônicas complexas e estados de spin. Nos espectro de absorção do HCFCo e seus nanocompósitos, é observada uma banda em torno de 400 – 420 nm atribuída à transferência de carga do ligante para o metal (TCML), especificamente associada à transição de $\text{Fe}^{3+}\text{-CN-Co}^{2+}$ em estado de alto spin. Essa banda reflete a interação eletrônica entre o ligante cianeto e os íons metálicos.^{117,119}

Além disso, é possível observar uma banda de absorção entre 500 e 700 nm atribuída à transição eletrônica de Co^{2+} , que corresponde à transferência de carga intervalente $\text{Fe}^{2+}\text{-CN-Co}^{2+}$. Esta banda reflete a interação direta entre os íons metálicos, sugerindo uma mistura de fases com estados de spin diferentes. Essas transições d-d e TCML são indicativas das propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos HCFs, reforçando seu potencial para aplicações em terapias fotodinâmicas e outros usos baseados em suas capacidades de absorção de luz visível e transferência de carga.^{117,120,121}

No espectro de absorção do HCFCo@NTCf@AF, é possível notar um leve aumento na intensidade de absorbância nas regiões próximas a 400 nm, atribuído à contribuição do AF na composição do nanocompósito. Embora o AF puro apresente bandas características no UV-Vis, com destaque para a banda em 360 nm relacionada às transições $\pi\text{-}\pi^*$, a diferença de intensidade não é muito acentuada devido à baixa quantidade de AF incorporada na composição. Além disso, a elevada massa molar do ácido fólico contribui para que sua presença, embora perceptível, não cause uma

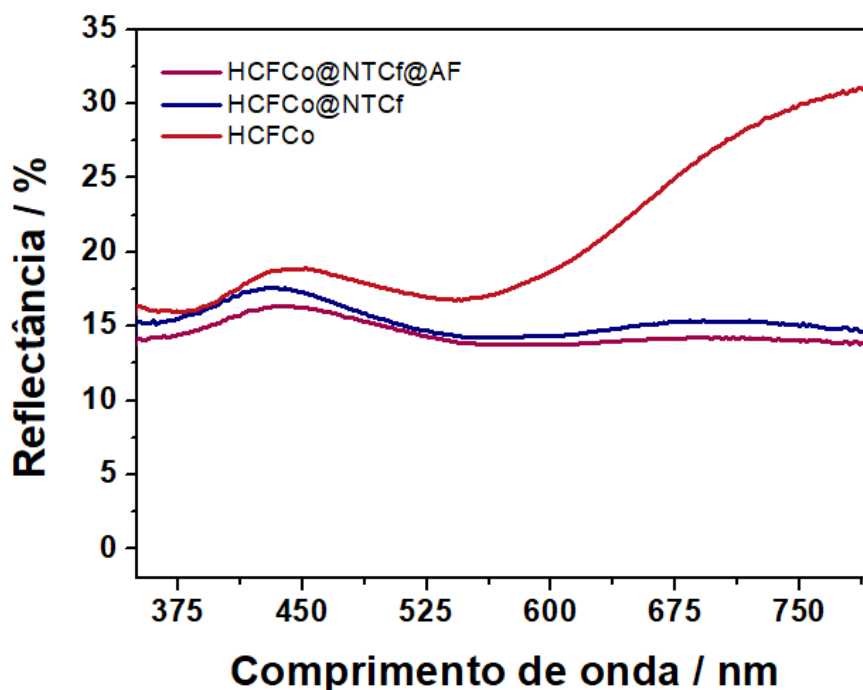
mudança significativa na absorbância geral do material.^{122,123}

Por outro lado, as bandas referentes aos NTCfs não são observadas no espectro, pois sua absorção ocorre predominantemente na região do UV, em torno de 250 nm. Esse comportamento sugere que, embora os nanotubos estejam presentes na estrutura do nanocompósito, sua contribuição espectral não é perceptível na região visível.¹²⁴

4. 7. Espectroscopia de reflectância difusa

A técnica de reflectância difusa é amplamente utilizada para analisar as propriedades ópticas de materiais sólidos, especialmente em amostras opacas. Essa técnica permite obter informações sobre a interação da luz com a superfície do material, refletindo dados sobre absorção, dispersão e, em alguns casos, estrutura cristalina. Com ela, é possível identificar bandas de absorção características e estudar transições eletrônicas e interações moleculares.¹²⁵ Os espectros dos materiais preparados nesse trabalho tiveram a leitura da reflectância feita na faixa de 300–800 nm, à temperatura ambiente, como mostrado na Fig. 22.

Figura 22: Espectros de reflectância difusa de todos materiais estudados.



O sinal de reflectância observado para o HCFCo coincide com os resultados de reflectância difusa relatados na literatura, onde o análogo de azul da Prússia apresenta uma banda característica na região de 500 nm.^{126,127} Essa banda também é visível no espectro UV-Vis, conforme ilustrado na Fig. 21. Essa característica torna o material viável para aplicação em TFD.

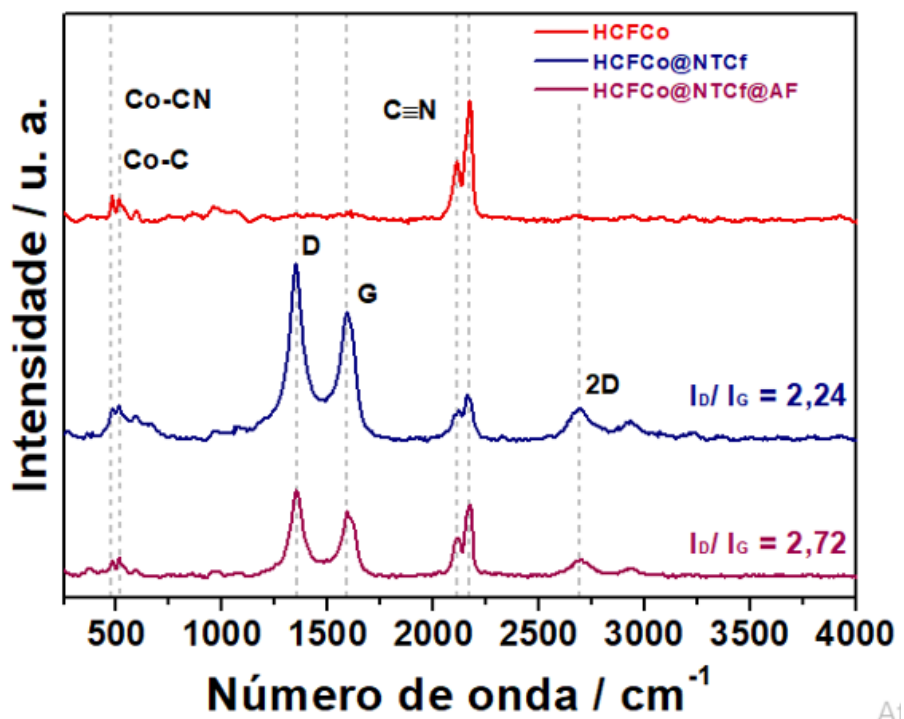
Os espectros de reflectância de HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF mostraram sinais semelhantes, com valores de reflectância inferiores ao do HCFCo puro. Essa redução pode ser atribuída à presença dos NTCf nos nanocompósitos, que possuem elevada capacidade de absorção de luz e as múltiplas reflexões ocorrendo dentro das cavidades dos nanotubos, contribuindo para a diminuição da reflectância global do nanocompósito.¹²⁸ Apesar da redução na reflectância, ambos os espectros mantiveram a banda característica do AAP, confirmando a presença e a integridade estrutural dos materiais.

A correspondência entre os dados de reflectância difusa e UV-Vis não apenas confirma a absorção na região visível, mas também destaca a consistência e a complementaridade das técnicas, proporcionando uma compreensão detalhada das propriedades eletrônicas e ópticas dos materiais analisados.

4. 8. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica de caracterização vibracional que fornece informações detalhadas sobre as interações moleculares e a estrutura química dos materiais. Além de permitir a identificação de distorções pontuais e interações locais na estrutura do material. Ao irradiar uma amostra com laser e medir a dispersão inelástica da luz, é possível identificar modos vibracionais específicos das moléculas presentes. Essa técnica é particularmente útil para estudar materiais carbonosos, e identificar grupos funcionais e defeitos estruturais.¹²⁹ Os espectros Raman dos materiais foram coletados utilizando um laser com comprimento de onda de 532 nm, conforme representado na Fig. 23.

Figura 23: Espectros Raman dos materiais sintetizados.



Em todos os espectros, pode-se notar a presença de bandas na região de 2100 cm^{-1} , atribuídas aos modos vibracionais dos grupos CN. Os valores de número de onda abaixo de 600 cm^{-1} , especificamente as bandas largas em $468\text{--}520\text{ cm}^{-1}$, estão associados aos modos de estiramento Fe–C e Co–N, além da deformação FeCo–CN.¹³⁰ Os nanocompósitos exibiram três bandas Raman ativas distintas atribuídas aos NTCf, centradas em 1347 , 1591 e 2692 cm^{-1} , representando, respectivamente, as bandas D, G e 2D da estrutura de carbono.

A banda D requer defeitos estruturais para sua ativação e indica a presença de heteroátomos, carbonos hibridizados em sp^3 e outros defeitos.¹³¹ A banda G geralmente aparece em todos os materiais sp^2 e está relacionada ao modo de alongamento das ligações C=C na rede hexagonal dos materiais carbonáceos.¹³² A banda 2D não requer defeitos para sua ativação e normalmente aparece em torno de $2600\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$, sendo a forma e a posição da banda um parâmetro importante que indica o número de camadas das folhas de grafeno e a qualidade do mesmo.¹³³

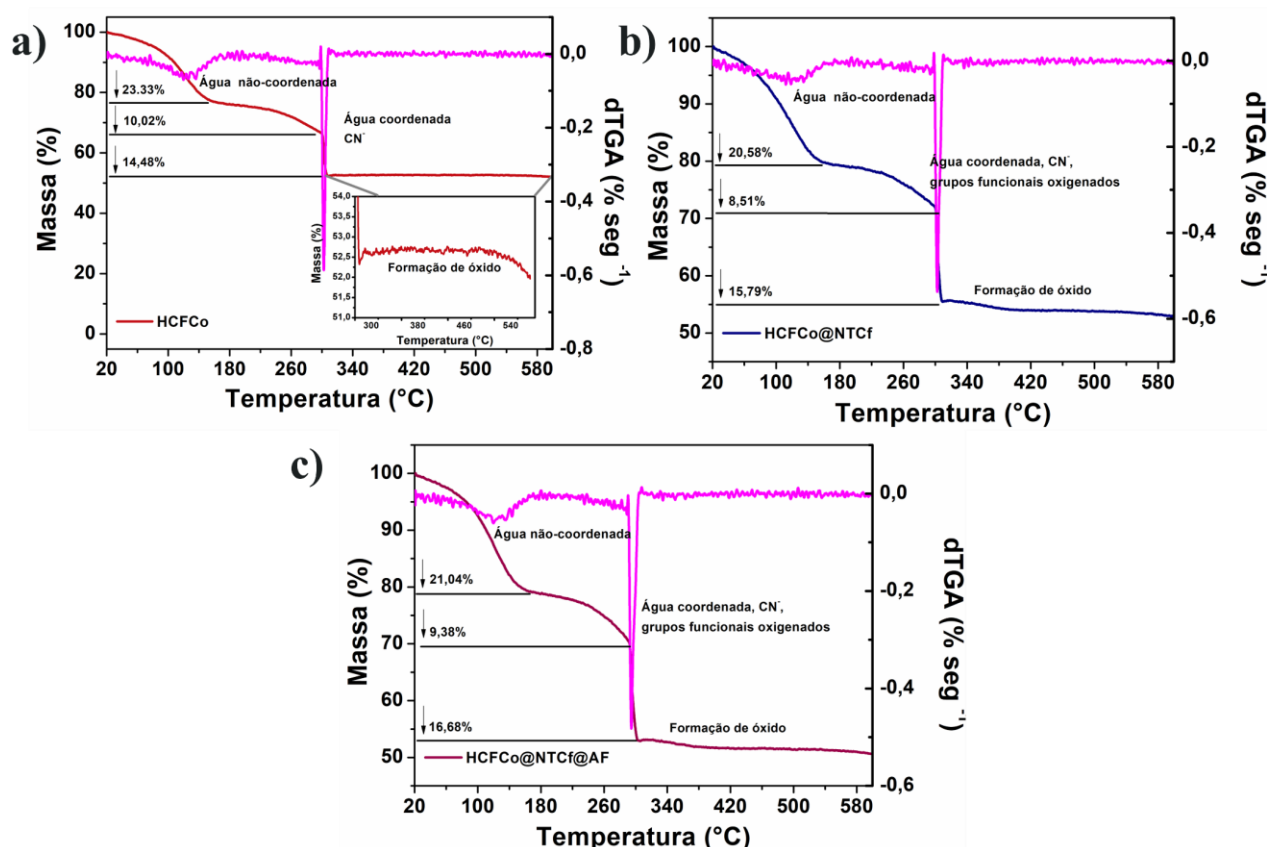
A razão de intensidade das áreas das bandas D e G (I_D/I_G) serve como parâmetro para determinar o grau de desordem nas estruturas dos NTCfs. Uma razão I_D/I_G elevada é indicativa de um aumento no número de defeitos presentes nos materiais. As análises espectrais do HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@FA revelaram razões I_D/I_G de 2,24 e 2,72, respectivamente. Essas observações sugerem que o processo de síntese dos nanocompósitos, na presença de AF, levou a modificações

estruturais e a um aumento na densidade de defeitos nos NTCfs, pois trabalhos anteriores do grupo utilizando esse mesmo nanotubo, porém não funcionalizado, revelou um valor de $I_D/I_G = 1,88$.¹³⁴

4. 9. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica importante para avaliar a estabilidade térmica e o comportamento de decomposição dos materiais. Essa técnica mede a variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo, permitindo identificar processos como a perda de solventes, decomposição de componentes e estabilidade térmica geral. Além disso, é possível analisar as frações químicas que compoem a estrutura do material e determinar a faixa de temperatura em que o FS começa a decompor-se para evitar sua degradação durante a irradiação com laser. como mostra a Fig. 24.¹³⁵

Figura 24: Análise termogravimétrica do HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b) e HCFCo@NTCf@AF (c).



Conforme discutido na seção de IV, dois tipos de moléculas de água estão presentes na estrutura do AAP: moléculas de água fracamente ligadas, localizadas nas cavidades estruturais, e moléculas de água fortemente coordenadas, que ocupam posições na rede cristalina. A remoção das moléculas de água não coordenadas ocorre inicialmente na faixa de 80–150 °C para todos os materiais, resultando em uma perda de massa em torno de 23% para o HCFCo e 21 e 20% para os nanocompósitos HCFCo@NTCf@AF e HCFCo@NTCf, respectivamente. Desse resultado é possível perceber que a presença dos nanotubos torna a amostra levemente menos higroscópica que a amostra pura.

Já a remoção das moléculas de água coordenadas ocorre entre 160–300 °C, com uma perda total de massa em torno de 45% para todos os materiais. Após essa faixa de temperatura, observa-se também a eliminação dos grupos CN^- , juntamente com as funções oxigenadas das nanoestruturas de carbono presentes nos nanocompósitos e grupos funcionais da molécula de AF. Acima de 300 °C, a variação da porcentagem da massa pode ser atribuída a formação de óxidos.^{108,135,136} As derivadas das temperaturas, mostradas na Tabela 5 foram obtidas através das curvas de TGA com intuito de observar o ponto de maior taxa de mudança na curva de perda de massa.

Tabela 5: TGA: decomposição térmica.

Materiais	1ª decomposição		2ª decomposição		3ª decomposição	
	% massa	dTGA _{max}	% massa	dTGA _{max}	% massa	dTGA _{max}
HCFCo	23,33	122 °C	10,02	270 °C	14,48	302 °C
HCFCo@NTCf	20,58	119 °C	8,51	272 °C	15,79	302 °C
HCFCo@NTCf@AF	21,04	125 °C	9,38	278 °C	16,68	295 °C

A dTGA mostra que a primeira decomposição, associada à perda de moléculas de água adsorvidas, ocorre entre 119–125 °C, sendo influenciada pelos NTCf e pelo AF. A incorporação de NTCf reduz a temperatura de decomposição para 119 °C e a perda de massa para 20,58%, devido à sua hidrofobicidade, enquanto a adição de AF eleva essa temperatura para 125 °C, sugerindo maior retenção de moléculas de água.

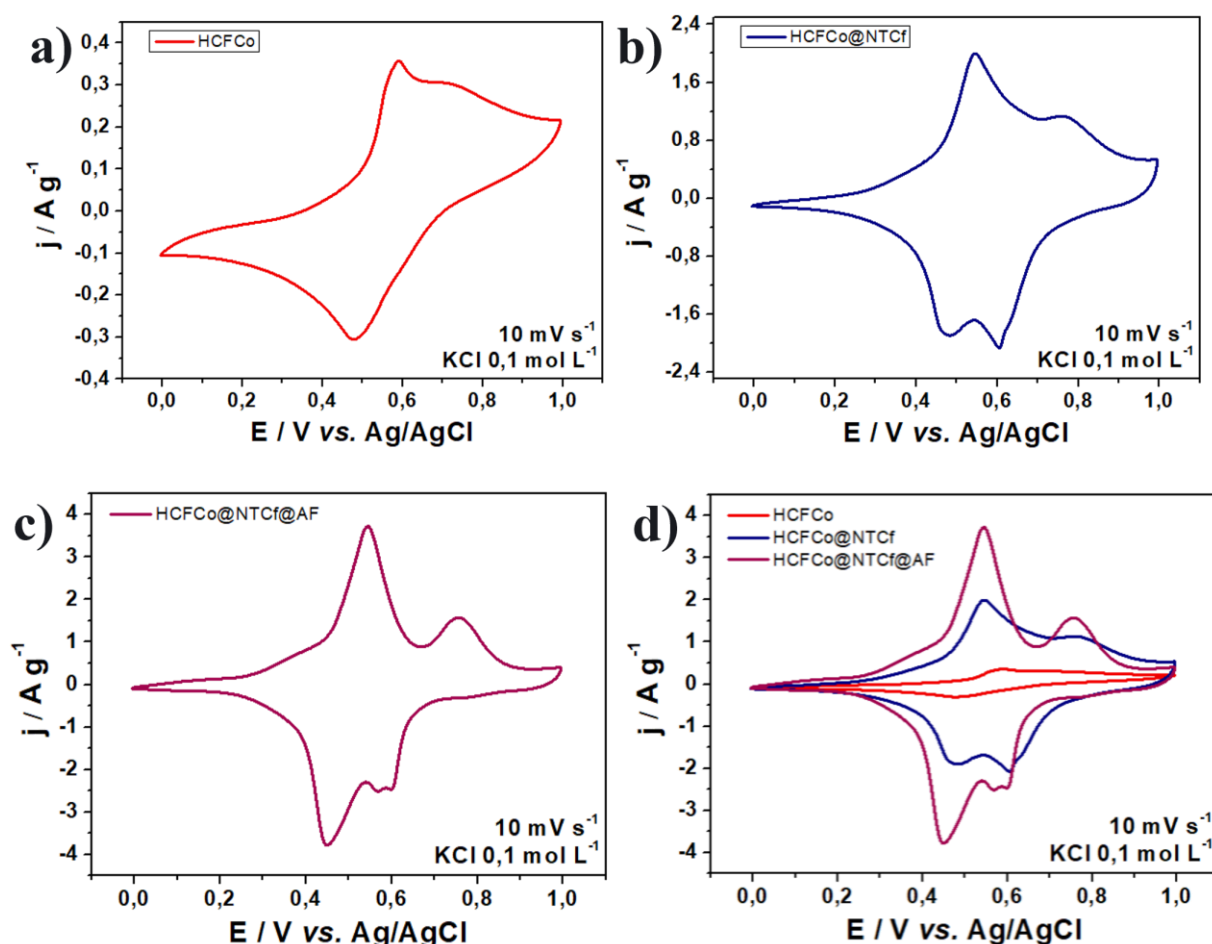
A segunda decomposição (270–278 °C) está relacionada à degradação dos grupos ciano e da matéria orgânica, sendo deslocada para temperaturas mais altas a medida que é incorporado os materiais na estrutura do análogo, indicando maior estabilidade térmica. O HCFCo puro apresenta decomposição a 270 °C, enquanto HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF apresentam valores maiores (272 °C e 278 °C, respectivamente), com menores perdas de massa, sugerindo interações entre os materiais.

A terceira decomposição (295–302 °C) está associada à degradação final da matriz, sendo mantida em 302 °C para HCFCo e HCFCo@NTCf, mas reduzida para 295 °C em HCFCo@NTCf@AF, possivelmente devido à degradação térmica do AF, que também resulta na maior perda de massa (16,68%), sugerindo que sua incorporação altera a estabilidade do sistema.

4. 10. Estudo eletroquímico – Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica amplamente utilizada para investigar as propriedades redox de materiais. Ela permite a análise da reversibilidade e da cinética das reações de oxidação e redução, além de fornecer informações sobre a estabilidade eletroquímica e os processos de transferência de carga. Durante o experimento, uma rampa de potencial é aplicada ao sistema, enquanto a corrente resultante é medida, gerando um voltamograma característico. A Fig. 25 mostra o voltamograma cíclico dos eletrodos a uma taxa de varredura de 10 mV s^{-1} , dentro de uma janela de potencial de 0,0 a 1,0 V em relação a um eletrodo de $\text{Ag(s)/AgCl(s)/Cl}^{-}(\text{sat.})$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl como eletrólito suporte.

Figura 25: Voltamograma cíclico do HCFCo (a), HCFCo@NTCf (b), HCFCo@NTCf@AF (c) e todos os materiais junto em (d).



Na Fig. 25a, dois picos redox pronunciados estão localizados em aproximadamente 0,5 V. O pico I corresponde à reação redox de Fe(II)/Fe(III) no HCFCo, acompanhada pela entrada e saída de íons K^+ na estrutura metálica para manter a neutralidade de carga local. O pico II também é atribuído a um par redox e está relacionado à transições Co(II)/Co(III).^{137,138}

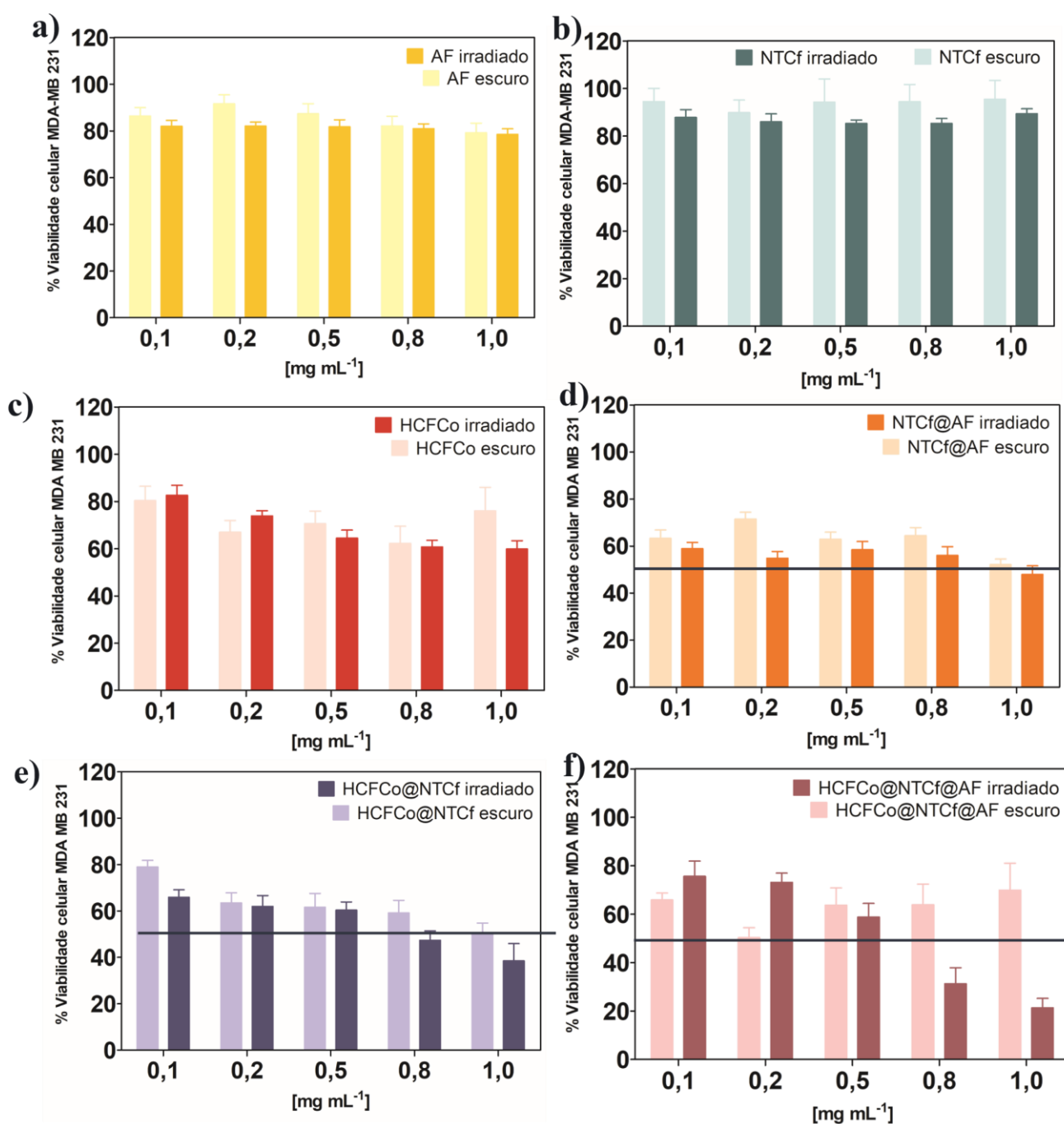
Observa-se na Fig. 25b um aumento significativo na corrente, indicando uma influência dos NTCf, que possuem propriedades eletrônicas que aceleram significativamente a transferência de elétrons, graças à sua grande área superficial específica e alta condutividade. Além disso, ocorreu um leve deslocamento nos potenciais de pico dos pares redox Fe(II)/Fe(III) e Co(II)/Co(III), refletindo mudanças na dinâmica das reações devido à modificação estrutural promovida pelos NTCf. Já a Fig. 25c, referente ao HCFCo@NTCf@AF teve resultados semelhantes ao nanocompósito HCFCo@NTCf no que refere-se a presença dos pares redox provenientes do HCFCo e o comportamento voltamétrico

característico dos NTCfs. Também nota-se um desdobramento do pico catódico situado em 0,6 V nos materiais contendo NTCfs, fato esse que pode estar relacionado com a mistura de estados de oxidação do cobalto no material, situados em diferentes ambientes químicos. Também foi observado no nanocompósito ternário o aumento mais significativo no valor de densidade de corrente, deslocamento dos picos redox e um aumento da área superficial devido aos grupos funcionais presentes na estrutura do ácido.^{139–142}

4. 11. Efeito fotodinâmico dos nanocompósitos em células de câncer de mama

A eficácia da TFD dos nanocompósitos foi investigada avaliando-se sua fototoxicidade em células MDA-MB-231 sob exposição à luz vermelha ($\lambda_{\text{máx}} = 630 \text{ nm}$, dose de luz = 5 J cm^{-2}) com concentrações de nanocompósitos variando entre 0,1 a $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ (Fig. 26). Além do efeito da luz, também foram realizados testes controle das amostras na ausência de luz (no escuro).

Figura 26: Estudos da (%) viabilidade de células MDA-MB-231 tratadas com AF (a), NTCf (b), HCFCo (c), NTCf@AF (d), HCFCo@NTCf (e) e HCFCo@NTCf@AF (f) em diferentes concentrações (0,1 a 1,0 mg mL⁻¹) sob irradiação com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 630$ nm, dose de luz = 5 J/cm²) ou protegida da luz (escuro). As barras representam a média \pm o desvio padrão de 5 experimentos independentes, com 4 repetições em cada replicata (n = 20) para ensaios no escuro; e duplicata independente, com 4 repetições em cada replicata (n = 8) realizados na presença de luz.



Nota-se que as células tratadas apenas com AF (Fig. 26a) ou NTCf (Fig. 26b) mantiveram-se viáveis (viabilidade celular manteve-se próximo de 100%) em toda faixa de concentração utilizada (0,1 a 1,0 mg mL⁻¹). Isso mostra que o AF ou os NTCf não são tóxicos para as células, quando utilizados isoladamente, nem no escuro, nem sob radiação (Fig. 26a e Fig. 26b). O nanocompósito NTCf@AF apresentou em torno de 40% de citotoxicidade em quase todas as concentrações utilizadas (Fig. 26d). A presença de luz, não aumentou a toxicidade de NTCf@AF indicando ausência de efeito fotodinâmico (Fig. 26d).

O composto HCFCo apresenta toxicidade de aproximadamente 30% nas células MDA-MB-231, dependendo da concentração utilizada (Fig. 26c). No entanto, não foi observada fototoxicidade do composto HCFCo sob irradiação com LED vermelho na maioria das concentrações estudadas, já que não houve diferença significativa na porcentagem de viabilidade celular entre as condições no escuro e sob irradiação (Fig. 26c), exceto para a maior concentração de 1,0 mg mL⁻¹. A citotoxicidade do nanocompósito HCFCo@NTCf manteve-se em torno de 30% nas células MDA-MB-231, entre as concentrações de 0,1 e 0,5 mg mL⁻¹, e foi independente do efeito da luz (Fig. 26e). Isso demonstra que, quando HCFCo é associado ao NTCf, o mesmo não aumenta significativamente a toxicidade que o HCFCo já possui quando utilizado isoladamente (Fig. 26e).

O nanocompósito HCFCo@NTCf@AF também apresenta em torno de 30% toxicidade no escuro (Fig. 26f), o que deve ser atribuído à toxicidade do composto HCFCo por si, já observado quando utilizado isoladamente (Fig. 26c) e que se manteve no nanocompósito HCFCo@NTCf (Fig. 26e). Em contraste com outros nanocompósitos, para o HCFCo@NTCf@AF foi possível observar uma diferença significativa entre os valores de % viabilidade celular das células no escuro e sob irradiação, especialmente em concentrações mais altas. Observou-se que, em média, 79% das células MDA-MB-231 morreram em contato com o nanocompósito na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ sob efeito da luz. Isso mostra que apesar de isoladamente, HCFCo, FA e NTCf não apresentarem fototoxicidade, quando associados, o HCFCo@NTCf@AF à 1,0 mg mL⁻¹ possui efeito fotodinâmico significativo, demonstrando seu potencial fotodinâmico.

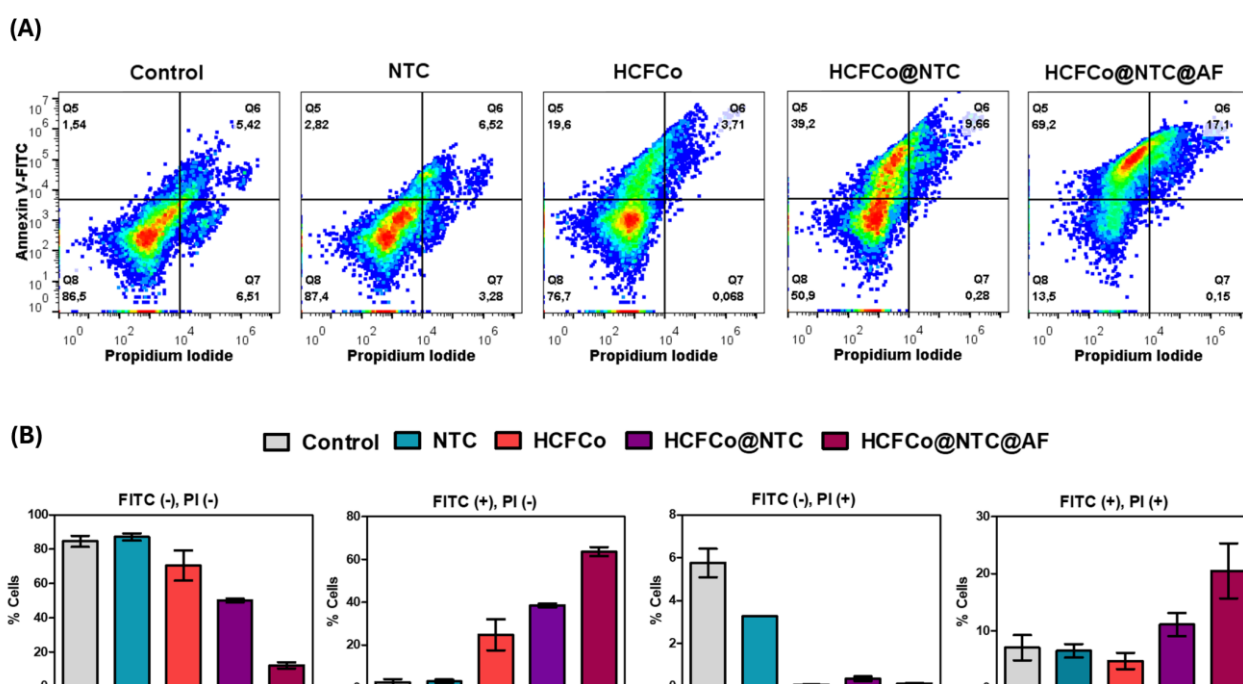
A incorporação do fotossensibilizador (HCFCo), do receptor de folato (FA) e do agente de penetração tumoral (NTCf) justifica-se pela combinação das propriedades dos três componentes em um único compósito, maximizando a morte celular sob efeito da luz. Consequentemente, a preparação dos nanocompósitos é crucial para alcançar resultados eficazes na TFD.

4. 12. Citometria de fluxo com marcação dupla Anexina V e Iodeto de Propídio (FITC/PI)

A marcação com anexina V e iodeto de propídio (PI) é uma maneira de identificar diferentes tipos de morte celular: necrose ou apoptose. A membrana celular apresenta uma distribuição assimétrica de fosfolípidios entre seus folhetos interno e externo. No folheto externo da bicamada lipídica, predominam a fosfatidilcolina e a esfingomielina, enquanto a fosfatidilserina é predominantemente localizada no folheto interno. Durante o processo de apoptose, essa organização assimétrica é rompida, resultando na exposição da fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática. Essa alteração pode ser detectada utilizando a proteína anticoagulante Anexina V, que possui alta afinidade pela fosfatidilserina. Quando conjugada a fluorocromos, a Anexina V permite identificar células apoptóticas de forma eficiente por meio da fluorescência detectada por citometria de fluxo. Além disso, iodeto de propídio (PI) é um corante impermeável à membrana plasmática de células viáveis, e só entra em células com membranas rompidas, característica observada na apoptose em estágio avançado e na necrose.

A análise de viabilidade, apoptose e necrose, realizados por citometria de fluxo com os marcadores Anexina V-FITC e PI estão mostrados na Fig. 27 e forneceram dados importantes para a compreensão dos efeitos dos diferentes tratamentos nas células MDA-MB-231.

Figura 27: (A) Gráficos de dispersão pseudo-coloridos mostrando a definição de 4 populações, de acordo com as respostas positivas e negativas à Anexina V-FITC e iodeto de propídio, em células não tratadas (controle) e em células tratadas com 1 mg/mL de NTCf, HCFCo, HCFCo@NTCf e HCFCo@NTCf@AF e irradiadas com LED vermelho ($\lambda_{\text{máx}} = 630 \text{ nm}$, dose de luz = 5 J/cm^2). (B) Gráficos em barras com as porcentagens de cada quadrante evidenciando a mudança relativa em comparação com o controle das 4 populações definidas.



As células não tratadas e aquelas tratadas com NTCf apresentaram predominância de células viáveis ($\approx 87\%$, Fig. 27.), como evidenciado pela marcação FITC(-), PI(-). Além disso, a incidência de apoptose inicial, determinada pela marcação apenas de Anexina V (FITC(+), PI(-)), foi baixa, sugerindo que os NTCf não induziram efeitos citotóxicos significativos. Este gráfico corresponde com os dados de cito e fototoxicidade, que mostram NTCs como materiais não tóxicos (com e sem luz).

Em contraste, o tratamento com HCFCo resultou em uma indução moderada de apoptose inicial (19,6% de FITC+/PI-, Fig.27.), evidenciada por um aumento na proporção de células marcadas apenas com Anexina V. Não houve número de células significativo com dupla marcação (3,71% de FITC+/PI+) ou marcadas apenas com PI (0,07% de FITC-/PI+) que indicassem células em apoptose tardia ou necrose. De fato, HCFCo indicou toxicidade de cerca de 20% nos dados de viabilidade celular pelo método MTT (Fig. 26c). Esse resultado sugere que HCFCo pode ter promovido a ativação das vias

apoptóticas nas células tumorais.

Quando HCFCo foi associado ao NTCf, formando o nanocompósito HCFCo@NTCf, nota-se um aumento na porcentagem de células em apoptose inicial (39,2% de FITC+/PI-, Fig.27.) e apoptose tardia ou necrose (9,66% de FITC+/PI+, Fig.27.), em comparação com HCFCo isolado. Isso sugere que a associação do NTCf ao HCFCo aumentou a indução de morte por apoptose nas células quando em presença de luz.

O nanocompósito HCFCo@NTCf@AF, resultou em uma indução mais expressiva de apoptose inicial (69,2% de FITC+/PI-, Fig.27.) e apoptose tardia ou necrose (17,1% de FITC+/PI+, Fig.27.). Esse aumento na apoptose sugeriu que a combinação de HCFCo com NTCf e AF potencializou os efeitos fototóxicos desses materiais, criando um ambiente mais propício à indução de morte celular programada. A hipótese de que moléculas bioativas, como o AF, desempenharam um papel crucial na melhoria da eficácia terapêutica dos materiais que foi reforçada por apresentar resultados que mostram que moléculas facilitaram a internalização dos nanomateriais nas células tumorais, promovendo uma interação mais eficiente entre os compostos e suas células-alvo.

A análise da apoptose tardia, evidenciada pela marcação simultânea de Anexina V e PI, revelou uma tendência de aumento dessa fase conforme a complexidade dos tratamentos. Os compostos HCFCo e suas variantes, particularmente o HCFCo@NTCf@AF, demonstraram uma maior indução das fases tardias da apoptose, o que sugeriu uma progressão mais acentuada do processo apoptótico. Esse resultado foi significativo, pois as células em estágios avançados de apoptose têm menor capacidade de sobreviver ou proliferar, tornando-as menos propensas à resistência terapêutica. Essa progressão mais acentuada do processo apoptótico pode ter sido atribuída à sinergia entre os materiais, que não apenas induziram a apoptose inicial, mas também favoreceram sua progressão para estágios finais, um aspecto desejável em tratamentos terapêuticos direcionados a células tumorais.

Dessa maneira, esses resultados revelaram que os materiais tem um potencial considerável para ser um agente antitumoral, uma vez que resultados de Anexin V/PI estão alinhados com os dados de fototoxicidade via MTT, como mostrado nos gráficos de viabilidade na Fig. 26, enfatizando o potencial do nanocompósito HCFCo@NTCf@AF como proposta para otimizar os efeitos fotodinâmicos terapêuticos.

5. CONCLUSÃO

Em resumo, este estudo relatou a síntese de um novo nanocompósito por meio do método de co-precipitação como um material para potencializar a atividade de TFD. A caracterização por MEV mostrou um aumento no tamanho médio das partículas quando os materiais foram combinados, além da morfologia esperada para os materiais. A medida de EDS apresentou todos os elementos correspondentes, enquanto o DRX indicou os picos relacionados majoritariamente à estrutura cúbica de face centrada dos hexacianoferratos metálicos, com presença de uma distorção romboédrica quando da presença do NTCf. Pela análise de TGA, foi possível perceber que o material apresenta um total de 45% de água na estrutura, esse fenômeno pode ser melhor avaliado pelos os espectros de Raman e FTIR, que revelaram as bandas respectivas para os nanocompósitos. Além disso, os voltmogramas forceram informações sobre estados de oxidação dos HCFCo e seus nanocompósitos. Os espectros de UV-Vis e refletância difusa atestaram uma banda de absorção na região visível, potencialmente útil no tratamento de tumores por TFD. Os resultados dos testes de citotoxicidade em células de câncer de mama humanas confirmaram uma menor toxicidade em concentrações mais baixas para os componentes isolados. O HCFCo possui em torno de 30% de citotoxicidade no escuro para as maiorias das concentrações estudadas, mas apresentou relativa fototoxicidade apenas na maior concentração. O mesmo foi observado para HCFCo@NTCf nas concentrações entre 0,1 e 0,5 mg mL⁻¹. Diferente dos outros compostos, o HCFCo@NTCf@AF apresentou efeito fotodinâmico acentuado na concentração de 0,8 e 1,0 mg mL⁻¹. A melhor condição para TFD contra a linha celular tumoral encontrada neste trabalho foi o tratamento com o nanocompósito HCFCo@NTCf@AF sob irradiação com LED vermelho, que resultou em 79% de morte celular. Os dados de apoptose corroboram com os de fotocitotoxicidade, atestando que o nanocompósito ternário apresentou o melhor desempenho, com indução de morte celular apoptose inicial das células tumorais. Este trabalho sugere propriedades promissoras dos materiais sintetizados para potencializar o tratamento do CMTN usando TFD.

6. REFERÊNCIAS

1. J. Gyamfi, J. Kim, J. Choi, Cancer as a Metabolic Disorder, *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 at <https://doi.org/10.3390/ijms23031155> (2022)(2022).
2. J. Shortt, R.W. Johnstone, Oncogenes in cell survival and cell death., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 (2012) <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009829>.
3. G. Bergers, S.-M. Fendt, The metabolism of cancer cells during metastasis, *Nat. Rev. Cancer* 21 (2021) 162–180. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00320-2>.
4. H. Saman, S.S. Raza, S. Uddin, K. Rasul, Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches, *Cancers* vol. 12 at <https://doi.org/10.3390/cancers12051172> (2020)(2020).
5. K. Takabe, M.G.K. Benesch, Types of Cancer and Research Covered in *World Journal of Oncology*., *World journal of oncology* vol. 13 at <https://doi.org/10.14740/wjon1558> (2022)(2022) 325–328.
6. C.B. Blackadar, Historical review of the causes of cancer., *World J. Clin. Oncol.* 7 (2016) 54–86. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.54>.
7. M.P. Sharma, S. Shukla, G. Misra, Recent advances in breast cancer cell line research., *Int. J. cancer* 154 (2024) 1683–1693. <https://doi.org/10.1002/ijc.34849>.
8. Z. Huang, P. Yu, J. Tang, Characterization of Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cell Spheroid Model., *Onco. Targets. Ther.* 13 (2020) 5395–5405. <https://doi.org/10.2147/OTT.S249756>.
9. N. Rajabi ... B. Baradaran, Photodynamic therapy with zinc phthalocyanine enhances the anti-cancer effect of tamoxifen in breast cancer cell line: Promising combination treatment against triple-negative breast cancer?, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 41 (2023) 103212. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103212>.
10. V. Jain ... S.S. Kesharwani, A review of nanotechnology-based approaches for breast cancer and triple-negative breast cancer, *J. Control. Release* 326 (2020) 628–647. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.003>.
11. J. Wang, S.-G. Wu, Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives., *Breast cancer (Dove Med. Press.* 15 (2023) 721–730. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S432526>.
12. J. Zhai, Y. Wu, F. Ma, V. Kaklamani, B. Xu, Advances in medical treatment of breast cancer in 2022, *Cancer Innov.* 2 (2023) 1–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cai2.46>.

13. D. Sonkin, A. Thomas, B.A. Teicher, Cancer treatments: Past, present, and future, *Cancer Genet.* 286–287 (2024) 18–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2024.06.002>.
14. R. Kaur, A. Bhardwaj, S. Gupta, Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers, *Mol. Biol. Rep.* 50 (2023) 9663–9676. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08809-3>.
15. H. Sung ... F. Bray, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA. Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
16. M.D. Daniell, J.S. Hill, A History Of Photodynamic Therapy, *Aust. N. Z. J. Surg.* 61 (1991) 340–348. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x>.
17. M. Kolarikova ... H. Kolarova, Photodynamic therapy: Innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments, *Med. Res. Rev.* 43 (2023) 717–774. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/med.21935>.
18. W. Jiang, M. Liang, Q. Lei, G. Li, S. Wu, The Current Status of Photodynamic Therapy in Cancer Treatment, *Cancers* vol. 15 at <https://doi.org/10.3390/cancers15030585> (2023)(2023).
19. S. Yordi, H. Soto, R.C. Bowen, A.D. Singh, Photodynamic therapy for choroidal melanoma: What is the response rate?, *Surv. Ophthalmol.* 66 (2021) 552–559. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2020.09.006>.
20. G. Balakirski, P. Lehmann, R.-M. Szeimies, S.C. Hofmann, Photodynamic therapy in dermatology: established and new indications., *J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft = J. Ger. Soc. Dermatology JDDG* 22 (2024) 1651–1662. <https://doi.org/10.1111/ddg.15464>.
21. W. Sun ... H. Chen, Gadolinium–Rose Bengal Coordination Polymer Nanodots for MR-/Fluorescence-Image-Guided Radiation and Photodynamic Therapy, *Adv. Mater.* 32 (2020) 2000377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adma.202000377>.
22. G.M. Calixto, J. Bernegossi, L.M. De Freitas, C.R. Fontana, M. Chorilli, Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review, *Molecules* vol. 21 at <https://doi.org/10.3390/molecules21030342> (2016)(2016).
23. R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed, The History of Photodetection and Photodynamic Therapy, *Photochem. Photobiol.* 74 (2001) 656–669. [https://doi.org/https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)0740656THOPAP2.0.CO2](https://doi.org/https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2).
24. A.B. Ormond, H.S. Freeman, Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy, *Materials* vol. 6 at <https://doi.org/10.3390/ma6030817> (2013)(2013) 817–840.

25. S. Cui ... Z. Huang, Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy, *Pharmaceutics* vol. 17 at <https://doi.org/10.3390/ph17101274> (2024)(2024).
26. T.K.L. Rezende ... J.L. Ferrari, Upconversion rare Earths nanomaterials applied to photodynamic therapy and bioimaging., *Front. Chem.* 10 (2022) 1035449. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1035449>.
27. M.S. Baptista ... T.M. Yoshimura, Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways, *Photochem. Photobiol.* 93 (2017) 912–919. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/php.12716>.
28. J.M. Dąbrowski, Chapter Nine - Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation, in *Inorganic Reaction Mechanisms* (eds. van Eldik, R. & Hubbard, C. D. B. T.-A. in I. C.) vol. 70 (Academic Press, 2017).(2017) 343–394.
29. T.M. Tsubone, M.S. Baptista, R. Itri, Understanding membrane remodelling initiated by photosensitized lipid oxidation, *Biophys. Chem.* 254 (2019) 106263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106263>.
30. M. Przygoda ... D. Aebisher, Cellular Mechanisms of Singlet Oxygen in Photodynamic Therapy, *International Journal of Molecular Sciences* vol. 24 at <https://doi.org/10.3390/ijms242316890> (2023)(2023).
31. J.H. Correia, J.A. Rodrigues, S. Pimenta, T. Dong, Z. Yang, Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions, *Pharmaceutics* vol. 13 at <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332> (2021)(2021).
32. X. Li, J.F. Lovell, J. Yoon, X. Chen, Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 17 (2020) 657–674. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0410-2>.
33. D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer* 3 (2003) 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
34. W.-P. Li, C.-J. Yen, B.-S. Wu, T.-W. Wong, Recent Advances in Photodynamic Therapy for Deep-Seated Tumors with the Aid of Nanomedicine, *Biomedicines* vol. 9 at <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010069> (2021)(2021).
35. G. Canti ... G. Valentini, Antitumor efficacy of the combination of photodynamic therapy and chemotherapy in murine tumors, *Cancer Lett.* 125 (1998) 39–44. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00502-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00502-8).
36. G. Canti ... A. Nicolin, Combination of photodynamic therapy + immunotherapy + chemotherapy

- in murine leukemia., *Neoplasma* 57 (2010) 184–188. https://doi.org/10.4149/neo_2010_02_184.
37. T.S. Mang, Lasers and light sources for PDT: past, present and future, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1 (2004) 43–48. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(04\)00012-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1572-1000(04)00012-2).
 38. J.F. Algorri, M. Ochoa, P. Roldán-Varona, L. Rodríguez-Cobo, J.M. López-Higuera, Light Technology for Efficient and Effective Photodynamic Therapy: A Critical Review, *Cancers* vol. 13 at <https://doi.org/10.3390/cancers13143484> (2021)(2021).
 39. S. Mallidi ... T. Hasan, Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy., *Theranostics* 6 (2016) 2458–2487. <https://doi.org/10.7150/thno.16183>.
 40. B. Li, L. Lin, Internal light source for deep photodynamic therapy, *Light Sci. Appl.* 11 (2022) 85. <https://doi.org/10.1038/s41377-022-00780-1>.
 41. C. Ash, M. Dubec, K. Donne, T. Bashford, Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods, *Lasers Med. Sci.* 32 (2017) 1909–1918. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2317-4>.
 42. S. Thangudu ... R. Vankayala, Recent advances in near infrared light responsive multi-functional nanostructures for phototheranostic applications, *Biomater. Sci.* 9 (2021) 5472–5483. <https://doi.org/10.1039/D1BM00631B>.
 43. R. Baskaran, J. Lee, S.-G. Yang, Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications, *Biomater. Res.* 22 (2018) 25. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0140-z>.
 44. S. Kwiatkowski ... J. Kulbacka, Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations, *Biomed. Pharmacother.* 106 (2018) 1098–1107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.
 45. N. Sobhani, A.A. Samadani, Implications of photodynamic cancer therapy: an overview of PDT mechanisms basically and practically, *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* 33 (2021) 34. <https://doi.org/10.1186/s43046-021-00093-1>.
 46. J. Zhang ... L.A. Muehlmann, An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy, *Acta Pharm. Sin. B* 8 (2018) 137–146. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>.
 47. X. Li ... J. Yoon, Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years, *Coord. Chem. Rev.* 379 (2019) 147–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.08.003>.
 48. H. Abrahamse, M.R. Hamblin, New photosensitizers for photodynamic therapy., *Biochem. J.* 473

- (2016) 347–364. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>.
49. D.K. Chatterjee, L.S. Fong, Y. Zhang, Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 1627–1637. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.003>.
 50. G. Gunaydin, M.E. Gedik, S. Ayan, Photodynamic Therapy-Current Limitations and Novel Approaches., *Front. Chem.* 9 (2021) 691697. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.691697>.
 51. L. Doveri ... P. Pallavicini, Prussian Blue nanoparticles: An FDA-approved substance that may quickly degrade at physiological pH, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 227 (2023) 113373. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113373>.
 52. C. Guichard, A.-S. Le Hô, H. Williams, Prussian Blue: Chemistry, Commerce, and Colour in Eighteenth-Century Paris, *Art Hist.* 46 (2023) 154–186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1467-8365.12695>.
 53. W.-J. Li ... S.-X. Dou, Chemical Properties, Structural Properties, and Energy Storage Applications of Prussian Blue Analogues, *Small* 15 (2019) 1900470. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/smll.201900470>.
 54. A. Azhar ... M. Hu, Nanoarchitectonics: A New Materials Horizon for Prussian Blue and Its Analogues, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 92 (2019) 875–904. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20180368>.
 55. M.B. Zakaria, T. Chikyow, Recent advances in Prussian blue and Prussian blue analogues: synthesis and thermal treatments, *Coord. Chem. Rev.* 352 (2017) 328–345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.09.014>.
 56. F. Grandjean, L. Samain, G.J. Long, Characterization and utilization of Prussian blue and its pigments, *Dalt. Trans.* 45 (2016) 18018–18044. <https://doi.org/10.1039/C6DT03351B>.
 57. L.I. Doumic ... M.A. Ayude, “Soluble” vs. “insoluble” Prussian blue based catalysts: influence on Fenton-type treatment, *RSC Adv.* 6 (2016) 46625–46633. <https://doi.org/10.1039/C6RA06618F>.
 58. A. Kraft, Some considerations on the structure, composition, and properties of Prussian blue: a contribution to the current discussion, *Ionics (Kiel)*. 27 (2021) 2289–2305. <https://doi.org/10.1007/s11581-021-04013-0>.
 59. C. Xu ... J. Shu, Prussian Blue Analogues in Aqueous Batteries and Desalination Batteries, *Nano-Micro Lett.* 13 (2021) 166. <https://doi.org/10.1007/s40820-021-00700-9>.
 60. L. Zhang, L. Chen, X. Zhou, Z. Liu, Towards High-Voltage Aqueous Metal-Ion Batteries Beyond 1.5 V: The Zinc/Zinc Hexacyanoferrate System, *Adv. Energy Mater.* 5 (2015) 1400930.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aenm.201400930>.
61. D. Jayasri, S.S. Narayanan, Electrocatalytic oxidation and amperometric determination of BHA at graphite–wax composite electrode with silver hexacyanoferrate as electrocatalyst, *Sensors Actuators B Chem.* 119 (2006) 135–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.11.064>.
 62. C.D. Wessells, R.A. Huggins, Y. Cui, Copper hexacyanoferrate battery electrodes with long cycle life and high power, *Nat. Commun.* 2 (2011) 550. <https://doi.org/10.1038/ncomms1563>.
 63. S. Vaucher, J. Fielden, M. Li, E. Dujardin, S. Mann, Molecule-Based Magnetic Nanoparticles: Synthesis of Cobalt Hexacyanoferrate, Cobalt Pentacyanonitrosylferrate, and Chromium Hexacyanochromate Coordination Polymers in Water-in-Oil Microemulsions, *Nano Lett.* 2 (2002) 225–229. <https://doi.org/10.1021/nl0156538>.
 64. D. Jayasri, S.S. Narayanan, Amperometric determination of hydrazine at manganese hexacyanoferrate modified graphite–wax composite electrode, *J. Hazard. Mater.* 144 (2007) 348–354. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.10.038>.
 65. S. Ying ... F.-Y. Yi, Synthesis and Applications of Prussian Blue and Its Analogues as Electrochemical Sensors, *Chempluschem* 86 (2021) 1608–1622. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cplu.202100423>.
 66. A.A. Karyakin, Advances of Prussian blue and its analogues in (bio)sensors, *Curr. Opin. Electrochem.* 5 (2017) 92–98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.07.006>.
 67. B.K. Barman, K.K. Nanda, Prussian blue as a single precursor for synthesis of Fe/Fe₃C encapsulated N-doped graphitic nanostructures as bi-functional catalysts, *Green Chem.* 18 (2016) 427–432. <https://doi.org/10.1039/C5GC01405K>.
 68. K. Hurlbutt, S. Wheeler, I. Capone, M. Pasta, Prussian Blue Analogs as Battery Materials, *Joule* 2 (2018) 1950–1960. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2018.07.017>.
 69. H.-C. Lu ... M. Higuchi, Durable Electrochromic Devices Driven at 0.8 V by Complementary Chromic Combination of Metallo-Supramolecular Polymer and Prussian Blue Analogues for Smart Windows with Low-Energy Consumption, *ACS Appl. Electron. Mater.* 3 (2021) 2123–2135. <https://doi.org/10.1021/acsaelm.1c00132>.
 70. H. Jiang ... Q. Huang, Construction and synthesis of Prussian blue analogues@Prussian blue (PBA@PB) nano-heterojunctions for enhanced antibacterial activity, *Mater. Des.* 242 (2024) 113022. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matdes.2024.113022>.
 71. J. Li ... S. Wu, Zinc-doped Prussian blue enhances photothermal clearance of *Staphylococcus*

- aureus and promotes tissue repair in infected wounds, *Nat. Commun.* 10 (2019) 4490. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12429-6>.
72. K. Tang ... J. Zhang, Recent advances in Prussian blue-based photothermal therapy in cancer treatment, *Biomater. Sci.* 11 (2023) 4411–4429. <https://doi.org/10.1039/D3BM00509G>.
 73. L.A. Gil-Alana, S. Chang, M. Balcilar, G.C. Aye, R. Gupta, Persistence of precious metal prices: A fractional integration approach with structural breaks, *Resour. Policy* 44 (2015) 57–64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resourpol.2014.12.004>.
 74. D. Osman ... M.J. Warren, The requirement for cobalt in vitamin B12: A paradigm for protein metalation, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1868 (2021) 118896. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118896>.
 75. A. Mohammad, Y. Yang, M.A. Khan, P.J. Faustino, Long-term stability study of Prussian blue- A quality assessment of water content and cyanide release., *Clin. Toxicol. (Phila)*. 53 (2015) 102–107. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.998337>.
 76. M.A. Busquets, J. Estelrich, Prussian blue nanoparticles: synthesis, surface modification, and biomedical applications, *Drug Discov. Today* 25 (2020) 1431–1443. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.05.014>.
 77. S. Liu, G.L. Pan, G.R. Li, X.P. Gao, Copper hexacyanoferrate nanoparticles as cathode material for aqueous Al-ion batteries, *J. Mater. Chem. A* 3 (2015) 959–962. <https://doi.org/10.1039/C4TA04644G>.
 78. P.H.S. Borges, A.C. Catto, E. Longo, E. Nossol, Electrochemical synthesis of reduced graphene oxide/ruthenium oxide hexacyanoferrate nanocomposite film and its application for ranitidine detection, *J. Electroanal. Chem.* 878 (2020) 114558. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114558>.
 79. C. Mansas, C. Rey, X. Deschanel, J. Causse, Scattering techniques to probe the templating effect in the synthesis of copper hexacyanoferrate nanoparticles via reverse microemulsions, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 624 (2021) 126772. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126772>.
 80. P. Rajchel-Mieldzioć ... P. Fita, Reaction kinetics of sonochemical oxidation of potassium hexacyanoferrate(II) in aqueous solutions, *Ultrason. Sonochem.* 63 (2020) 104912. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104912>.
 81. D.A. Peixoto, S.C. Silva, P.H.S. Borges, R.C. Lima, E. Nossol, Hydrothermal synthesis as a versatile tool for the preparation of metal hexacyanoferrates: a review, *J. Mater. Sci.* 58 (2023)

- 2993–3024. <https://doi.org/10.1007/s10853-023-08190-3>.
82. I. Kościk, D. Jankowski, A. Jagusiak, Carbon Nanomaterials for Theranostic Use, *C* vol. 8 at <https://doi.org/10.3390/c8010003> (2022)(2022).
 83. G. Lan, K. Ni, W. Lin, Nanoscale metal–organic frameworks for phototherapy of cancer, *Coord. Chem. Rev.* 379 (2019) 65–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.09.007>.
 84. K.J. Lagos, H.H. Buzzá, V.S. Bagnato, M.P. Romero, Carbon-Based Materials in Photodynamic and Photothermal Therapies Applied to Tumor Destruction, *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 at <https://doi.org/10.3390/ijms23010022> (2022)(2022).
 85. J. Prasek ... R. Kizek, Methods for carbon nanotubes synthesis—review, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 15872. <https://doi.org/10.1039/c1jm12254a>.
 86. V. Amenta, K. Aschberger, Carbon nanotubes: potential medical applications and safety concerns, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 7 (2015) 371–386. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wnan.1317>.
 87. M.F. Naief, S.N. Mohammed, A.M. Mohammed, Carbon nanotubes: A review on synthesis and drug delivery for cancer treatment, *Inorg. Chem. Commun.* 159 (2024) 111694. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111694>.
 88. S. Jabeen, A. Kausar, B. Muhammad, S. Gul, M. Farooq, A Review on Polymeric Nanocomposites of Nanodiamond, Carbon Nanotube, and Nanobifiller: Structure, Preparation and Properties, *Polym. Plast. Technol. Eng.* 54 (2015) 1379–1409. <https://doi.org/10.1080/03602559.2015.1021489>.
 89. L. Wang ... Z. Zhang, Photodynamic effect of functionalized single-walled carbon nanotubes: a potential sensitizer for photodynamic therapy, *Nanoscale* 6 (2014) 4642–4651. <https://doi.org/10.1039/C3NR06835H>.
 90. X. He ... Q. Ma, Multiwalled Carbon Nanotubes Induce a Fibrogenic Response by Stimulating Reactive Oxygen Species Production, Activating NF-κB Signaling, and Promoting Fibroblast-to-Myofibroblast Transformation, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 2237–2248. <https://doi.org/10.1021/tx200351d>.
 91. B. Xu ... X. Tian, Paradoxical Roles of Carbon Nanotubes in Cancer Therapy and Carcinogenesis, *Journal of Nanotheranostics* vol. 5 at <https://doi.org/10.3390/jnt5030006> (2024)(2024) 84–98.
 92. P. Ebrahimnejad, A. Sodagar Taleghani, K. Asare-Addo, A. Nokhodchi, An updated review of folate-functionalized nanocarriers: A promising ligand in cancer, *Drug Discov. Today* 27 (2022) 471–489. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.11.011>.

93. J. Minigh, Folic Acid, in (eds. Enna, S. J. & Bylund, D. B. B. T. T. C. P. R.) (Elsevier, New York, 2007).(2007) 1–6.
94. B. Stella ... P. Couvreur, Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting, *J. Pharm. Sci.* 89 (2000) 1452–1464. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200011\)89:11<1452::AID-JPS8>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200011)89:11<1452::AID-JPS8>3.0.CO;2-P).
95. C. Chen ... K. Melcher, Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors, *Nature* 500 (2013) 486–489. <https://doi.org/10.1038/nature12327>.
96. G.L. Zwicke, G. Ali Mansoori, C.J. Jeffery, Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics, *Nano Rev.* 3 (2012) 18496. <https://doi.org/10.3402/nano.v3i0.18496>.
97. P. Tagde, G.T. Kulkarni, D.K. Mishra, P. Kesharwani, Recent advances in folic acid engineered nanocarriers for treatment of breast cancer, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 56 (2020) 101613. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101613](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101613).
98. N. Ma ... S. Garg, Folic acid-grafted bovine serum albumin decorated graphene oxide: An efficient drug carrier for targeted cancer therapy, *J. Colloid Interface Sci.* 490 (2017) 598–607. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.097](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.11.097).
99. M. Fernández, F. Javaid, V. Chudasama, Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers, *Chem. Sci.* 9 (2018) 790–810. <https://doi.org/10.1039/C7SC04004K>.
100. J.A. Oshiro-Junior ... M. Chorilli, Phthalocyanine-loaded nanostructured lipid carriers functionalized with folic acid for photodynamic therapy, *Mater. Sci. Eng. C* 108 (2020) 110462. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110462](https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110462).
101. C. Wang, H. Tao, L. Cheng, Z. Liu, Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles, *Biomaterials* 32 (2011) 6145–6154. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.007](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.007).
102. S.-H. Seo ... E.-S. Jang, NIR-light-induced surface-enhanced Raman scattering for detection and photothermal/photodynamic therapy of cancer cells using methylene blue-embedded gold nanorod@SiO₂ nanocomposites, *Biomaterials* 35 (2014) 3309–3318. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.066](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.066).
103. L. Zhou ... Y. Zhao, Mesoporous NaYbF₄@NaGdF₄ core-shell up-conversion nanoparticles for targeted drug delivery and multimodal imaging, *Biomaterials* 35 (2014) 7666–7678. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.051](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.05.051).
104. J. Hu ... X. Yang, Nanocomposite-Based Photodynamic Therapy Strategies for Deep Tumor

- Treatment, *Small* 11 (2015) 5860–5887. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/sml.201501923>.
105. K.C.A. Smith, C.W. Oatley, The scanning electron microscope and its fields of application, *Br. J. Appl. Phys.* 6 (1955) 391. <https://doi.org/10.1088/0508-3443/6/11/304>.
 106. D.E. Newbury*, N.W.M. Ritchie, Is Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectrometry (SEM/EDS) Quantitative?, *Scanning* 35 (2013) 141–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/sca.21041>.
 107. M. Abd Mutalib, M.A. Rahman, M.H.D. Othman, A.F. Ismail, J. Jaafar, Chapter 9 - Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy-Dispersive X-Ray (EDX) Spectroscopy, in (eds. Hilal, N., Ismail, A. F., Matsuura, T. & Oatley-Radcliffe, D. B. T.-M. C.) (Elsevier, 2017).(2017) 161–179.
 108. A. Kumar ... V. Sudarsan, Synthesis of cobalt hexacyanoferrate nanoparticles and its hydrogen storage properties, *Int. J. Hydrogen Energy* 43 (2018) 7998–8006. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.03.011>.
 109. M.M. Ngoma, M. Mathaba, K. Moothi, Effect of carbon nanotubes loading and pressure on the performance of a polyethersulfone (PES)/carbon nanotubes (CNT) membrane, *Sci. Rep.* 11 (2021) 23805. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03042-z>.
 110. Y. Kang ... K.N. Hui, [Fe(CN)₆] vacancy-boosting oxygen evolution activity of Co-based Prussian blue analogues for hybrid sodium-air battery, *Mater. Today Energy* 20 (2021) 100572. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtener.2020.100572>.
 111. P. Jain, S. Jha, P.P. Ingole, Strong metal–support interaction in copper hexacyanoferrate nanocube decorated functionalized multiwall carbon nanotubes for enhanced bi-functional oxygen electrocatalytic activity and stability, *Sustain. Energy Fuels* 6 (2022) 1094–1107. <https://doi.org/10.1039/D1SE01635K>.
 112. M. Jiang, Z. Hou, L. Ren, Y. Zhang, J.-G. Wang, Prussian blue and its analogues for aqueous energy storage: From fundamentals to advanced devices, *Energy Storage Mater.* 50 (2022) 618–640. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ensm.2022.06.006>.
 113. M.M. Kaplun, Y.E. Smirnov, V. Mikli, V. V Malev, Structure of Cobalt Hexacyanoferrate Films Synthesized from a Complex Electrolyte, *Russ. J. Electrochem.* 37 (2001) 914–924. <https://doi.org/10.1023/A:1011992109433>.
 114. H. Yao ... S. Chou, Prussian Blue Analogues for Aqueous Sodium-Ion Batteries: Progress and Commercialization Assessment, *Adv. Energy Mater.* 14 (2024) 2401984. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aenm.202401984>.

115. D.O. Ojwang ... G. Svensson, Structure Characterization and Properties of K-Containing Copper Hexacyanoferrate, *Inorg. Chem.* 55 (2016) 5924–5934. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.6b00227>.
116. L. Xu ... L. Gan, Mechanistic study of cobalt and iron based Prussian blue analogues to activate peroxymonosulfate for efficient diclofenac degradation, *Sep. Purif. Technol.* 303 (2022) 122137. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122137>.
117. T. Lara-Estrada ... A. Gutiérrez-Becerra, Electron transfer in cobalt hexacyanoferrate nanoparticles promoted by reverse microemulsions prepared with Cetyltrimethylammonium surfactants, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 544 (2018) 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.02.010>.
118. M.G.A. El-Wahed, M.S. Refat, S.M. El-Megharbel, Synthesis, spectroscopic and thermal characterization of some transition metal complexes of folic acid, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 70 (2008) 916–922. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.10.008>.
119. R. Banavath, R. Srivastava, P. Bhargava, Improved non-enzymatic H₂O₂ sensors using highly electroactive cobalt hexacyanoferrate nanostructures prepared through EDTA chelation route, *Mater. Chem. Phys.* 267 (2021) 124593. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2021.124593>.
120. S. Zamponi ... A.M. Kijak, Cobalt hexacyanoferrate in PAMAM-doped silica matrix: 1. Solid state electrochemistry and thermochromism, *Electrochim. Acta* 51 (2005) 118–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.04.044>.
121. M. Yamada, T. Sato, M. Miyake, Y. Kobayashi, Temporal evolution of composition and crystal structure of cobalt hexacyanoferrate nano-polymers synthesized in reversed micelles, *J. Colloid Interface Sci.* 315 (2007) 369–375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.06.012>.
122. S. Jain, V. V. Rath, A.K. Jain, M. Das, C. Godugu, Folate-decorated PLGA nanoparticles as a rationally designed vehicle for the oral delivery of insulin., *Nanomedicine (Lond.)* 7 (2012) 1311–1337. <https://doi.org/10.2217/nmm.12.31>.
123. A.R. Chowdhuri, D. Laha, S. Pal, P. Karmakar, S.K. Sahu, One-pot synthesis of folic acid encapsulated upconversion nanoscale metal organic frameworks for targeting, imaging and pH responsive drug release, *Dalt. Trans.* 45 (2016) 18120–18132. <https://doi.org/10.1039/C6DT03237K>.
124. L. Jiang, L. Gao, J. Sun, Production of aqueous colloidal dispersions of carbon nanotubes, *J. Colloid Interface Sci.* 260 (2003) 89–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021->

9797(02)00176-5.

125. J. Torrent, V. Barrón, Diffuse Reflectance Spectroscopy, in *Methods of Soil Analysis Part 5—Mineralogical Methods* (2008).(2008) 367–385.
126. M. Zhang ... Y.-Q. Lan, Efficient Charge Migration in Chemically-Bonded Prussian Blue Analogue/CdS with Beaded Structure for Photocatalytic H₂ Evolution, *JACS Au* 1 (2021) 212–220. <https://doi.org/10.1021/jacsau.0c00082>.
127. B. Moss ... J.R. Durrant, Unraveling Charge Transfer in CoFe Prussian Blue Modified BiVO₄ Photoanodes, *ACS Energy Lett.* 4 (2019) 337–342. <https://doi.org/10.1021/acsenergylett.8b02225>.
128. S. Saini ... K. Bhattacharjee, Low reflectance of carbon nanotube and nanoscroll-based thin film coatings: a case study, *Nanoscale Adv.* 3 (2021) 3184–3198. <https://doi.org/10.1039/D0NA01058H>.
129. A.C. Ferrari, D.M. Basko, Raman spectroscopy as a versatile tool for studying the properties of graphene, *Nat. Nanotechnol.* 2013 84 8 (2013) 235–246. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.46>.
130. J.-G. Wang, Z. Zhang, X. Liu, B. Wei, Facile synthesis of cobalt hexacyanoferrate/graphene nanocomposites for high-performance supercapacitor, *Electrochim. Acta* 235 (2017) 114–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2017.03.094>.
131. P.H.S. Borges, C.B. Breslin, E. Nossol, Electrochemical determination of fenuron herbicide in environmental water samples by electro-reduced graphene oxide sensor, *J. Appl. Electrochem.* 54 (2024) 1861–1873. <https://doi.org/10.1007/s10800-024-02073-4>.
132. A. Jorio, R. Saito, Raman spectroscopy for carbon nanotube applications, *J. Appl. Phys.* 129 (2021) 21102. <https://doi.org/10.1063/5.0030809>.
133. F.M. Casallas Caicedo ... C. Wang, Synthesis of graphene oxide from graphite by ball milling, *Diam. Relat. Mater.* 109 (2020) 108064. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.diamond.2020.108064>.
134. M.N.T. Silva, D.A.C. Alves, E.M. Richter, R.A.A. Munoz, E. Nossol, A simple, fast, portable and selective system using carbon nanotubes films and a 3D-printed device for monitoring hydroxychloroquine in environmental samples, *Talanta* 265 (2023) 124810. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124810>.
135. D. Parajuli, H. Tanaka, K. Sakurai, Y. Hakuta, T. Kawamoto, Thermal Decomposition Behavior of Prussian Blue in Various Conditions, *Materials* vol. 14 at <https://doi.org/10.3390/ma14051151> (2021)(2021).

136. S.A. Agnihotry ... S.M. Shivaprasad, Electrodeposited Prussian blue films: Annealing effect, *Electrochim. Acta* 51 (2006) 4291–4301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.electacta.2005.12.008>.
137. S. Yang ... L. Qu, A novel nonenzymatic H₂O₂ sensor based on cobalt hexacyanoferrate nanoparticles and graphene composite modified electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 208 (2015) 593–599. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.11.055>.
138. I. Kang, W. Shin, S. Manivannan, Y. Seo, K. Kim, An Electrochemical Sensor for Hydrazine Based on In Situ Grown Cobalt Hexacyanoferrate Nanostructured Film, *J. Electrochem. Sci. Technol* 7 (2016) 277–285. <https://doi.org/10.5229/JECST.2016.7.4.277>.
139. Y. Zou ... C. Slim, Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotube-Based Aptasensors for Diclofenac Detection., *Front. Chem.* 9 (2021) 812909. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.812909>.
140. S. Husmann, A.J.G. Zarbin, Design of a Prussian Blue Analogue/Carbon Nanotube Thin-Film Nanocomposite: Tailored Precursor Preparation, Synthesis, Characterization, and Application, *Chem. – A Eur. J.* 22 (2016) 6643–6653. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.201504444>.
141. M. Seredych, D. Hulicova-Jurcakova, G.Q. Lu, T.J. Bandosz, Surface functional groups of carbons and the effects of their chemical character, density and accessibility to ions on electrochemical performance, *Carbon N. Y.* 46 (2008) 1475–1488. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbon.2008.06.027>.
142. S. Akbar, A. Anwar, Q. Kanwal, Electrochemical determination of folic acid: A short review., *Anal. Biochem.* 510 (2016) 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.07.002>.