



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

ROBERTA CLÁUDIA SANTOS NEVES

**PLATAFORMA MULTIFUNCIONAL A BASE DE GEL APLICADA À
TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA PARA CÂNCER DE PELE**

**Recife
2019**

ROBERTA CLÁUDIA SANTOS NEVES

**PLATAFORMA MULTIFUNCIONAL A BASE DE GEL APLICADA À
TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA PARA CÂNCER DE PELE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciência de Materiais.

Área de concentração: Materiais não metálicos.

Orientador: Prof. Dr.: Severino Alves Júnior.

Coorientador: Prof. Dr.: André Galambeck.

**Recife
2019**

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2105

N518p Neves, Roberta Cláudia Santos.
Plataforma multifuncional a base de gel aplicada a terapia fotodinâmica e fototérmica de câncer de pele/ Roberta Cláudia Santos Neves. – 2019.
160 f.: il., fig., tab.

Orientador: Severino Alves Júnior.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Ciência de Materiais. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Materiais não metálicos. 2. Alginato de Sódio. 3. Nanopartículas de Prata. 4. Nanobastões de Ouro. I. Alves Júnior, Severino. (orientador) II. Título.

620.19

CDD (22. ed.)

UFPE-CCEN 2020-169

ROBERTA CLÁUDIA SANTOS NEVES

**PLATAFORMA MULTIFUNCIONAL A BASE DE GEL APLICADA A
TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA DE CÂNCER DE PELE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 02/10/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Severino Alves Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Albuquerque de Farias (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ingrid Távora Weber (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ivani Malvestiti (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico de todo coração a minha Mãe,
Severina Zélia Santos Neves e ao meu Pai José Petrólio Neves.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me conceder muita fé, saúde física e mental, força, inteligência, coragem e determinação para chegar até este momento.

A minha família pelo incentivo e todo apoio aos meus estudos durante todo este tempo distante de casa, enfrentando juntos diversas dificuldades ao longo do doutorado, mais nunca perdendo a esperança de vencer esta etapa na minha vida.

Aos Professores da UFPE e UFRPE e pesquisadores doutores: Silvano Araújo, Iane Vasconcelos, Eduardo Falcão, Yêda Medeiros, Rinaldo Mota e André pelas discussões e a pronta disponibilidade para contribuir com o andamento deste trabalho ao longo do doutorado.

Em especial ao meu grande professor orientador, Severino Alves Júnior, pela oportunidade, confiança e maior respeito. Agradeço imensamente pela sua paciência e carinho que trata todos os seus alunos, através de seus ensinamentos profissionais acadêmicos e pessoais durante todos os dias dentro ou fora do laboratório.

Aos meus eternos amigos e colegas do laboratório do BSTR, no qual faço parte, grupo bastante querido, com bons profissionais, sempre contribuindo na sua formação acadêmica seja de uma forma direta ou indiretamente.

Aos amigos e colegas de outros laboratórios da UFPE, pertencente ao Departamento de Química Fundamental, Departamento de Física, Departamento de Genética, Engenharia Química, assim como os profissionais da central analítica que também ajudaram na realização deste trabalho e na execução dos experimentos.

Agradeço também as instituições UFRPE, UFS, UFG e os órgãos de pesquisa e fomento como: CNPq, FACEPE, CETENE, e a CAPES pela concessão da bolsa.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Química fundamental e ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, pela atenção e ajuda e todo o conhecimento compartilhado e nos auxílios burocráticos.

RESUMO

No Brasil, o câncer da pele responde por 33% de todos os diagnósticos, e segundo o Instituto Nacional do Câncer, cerca de 180 mil novos casos são registrados no Brasil. Uma alternativa promissora para solução deste problema é desenvolver uma plataforma multifuncional de gel a partir do biopolímero, alginato de sódio, associado com nanopartículas metálicas de prata e nanobastões de ouro, conjugado com a Protoporfirina IX aplicada à terapia fotodinâmica e fototérmica para câncer de pele. Os materiais obtidos foram avaliados por técnicas experimentais: Análise reológica, Espectroscopia de absorção no infravermelho próximo (UV-Vis-NIR), Espectroscopia por absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN- H^1), Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET), Análises térmicas (TGA e DSC), Atividade antimicrobiana, Efeito da terapia fotodinâmica (TFD), fototérmico (TFT) e quimiofototérmico. E realizar testes *in vitro* frente às linhagens de macrófagos murinos RAW 264.7 e a linhagem celular B16-F10 aplicada para câncer de pele. De acordo com os experimentos reológicos, os hidrogéis avaliados indicaram comportamento de fluido não-newtoniano. Ao incorporar os NBsAu, os hidrogéis exibiram ressonância plasmônica de 510 e 850 nm, com as NPsAg em torno de 420 nm, características das nanopartícula de prata. As imagens de MEV indicaram a formação de nanopartículas com tamanhos entre 20-40 nm. A razão de aspecto obtida por imagens de TEM para NBsAu, foi $4,4 \pm 0,116$. Os hidrogéis tiveram sensibilidade para os microrganismos testados, através das CIM/CBM e técnica de difusão de poço. O gel de alginato foi reticulado com agentes químicos (EDC/NHS), associadas aos NBsAu, NPsAg e conjugado com a Protoporfirina-IX (PpIX). Os resultados de reologia indicaram que os géis híbridos conjugados apresentaram comportamento não-newtoniano e características de um material pseudo-plásticos e classificados como sólido-viscoelásticos. Os resultados do UV-vis-NIR, indicaram bandas características da PpIX, NBsAu e NPsAg. As imagens por MEV revelaram para o gel de Alg@(EDC/NHS), morfologia superficial e transversal com tamanho dos poros em torno de 50 a 100 μm . As imagens obtidas por MET confirmaram a presença das NPsAg no gel híbrido PpIX@(NPsAg@Alg) e (NPsAg+NBsAu) no gel de PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, conforme morfologias de forma esféricas para NPsAg e bastões para NBsAu. O efeito fotodinâmico indicou que NPsAg ajudaram na produção de ROS. O gel de PpIX@(NPsAg@Alg), obteve maior rendimento quântico de 47,10%, após irradiação, com Laser 1 (660 nm, potência 30 mW). A propriedade fototérmica do gel híbrido PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, apresentou uma boa eficiência de conversão fototérmica de $\eta=54,3\%$, indicando como potencial fototérmico, após irradiação Laser 2 (785 nm, potência 1000mW). Os resultados *in vitro* dos géis híbridos conjugados foram promissores, principalmente para o gel PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, que após irradiação com os Lasers 1 (PDT) e Laser 2 (PTT), simultaneamente, tornou-se eficaz para o tratamento de melanoma, atribuída a seletividade para as mesmas, comparando com a linhagem de RAW 264,7, indicando um maior efeito sinérgico entre as terapia fotodinâmica + quimiofototermal. A viabilidade das células B16-F10 diminuiu significativamente para 9,83%, após irradiação dos lasers, considerando os géis como uma plataforma promissora, no tratamento de câncer de pele.

Palavras-chave: Alginato de Sódio. Nanopartículas de Prata. Nanobastões de Ouro. Atividade Antimicrobiana. Protoporfirina IX. Teste *in vitro*.

ABSTRACT

In Brazil, skin cancer accounts for 33% of all diagnoses, and according to the National Cancer Institute, about 180 thousand new cases registered in Brazil. A promising alternative to solve this problem is to develop a multifunctional gel platform from the biopolymer, sodium alginate, associated with silver metallic nanoparticles and gold nanorods, in conjugation with Protoporphyrin IX applied to photodynamic and photothermal cancer therapy skin. The materials used were tested by experimental techniques: Rheological analysis, Near Infrared Absorption Spectroscopy (UV-Vis-NIR), Fourier Transform Infrared Absorption Spectroscopy (FT-IR), Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$), Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission (TEM), Thermal Analysis (TGA and DSC), Antimicrobial Activity, Effect of Photodynamic (TFD), Photothermal (TFT), and Chemophotothermal Therapy. Perform *in vitro* tests against RAW 264.7 murine macrophage strains and a B16-F10 cell line applied to skin cancer. According to rheological experiments, hydrogels reduce the behavior of non-Newtonian fluid. By incorporating AuNRs, the hydrogels exhibit plasma resonance 510 and 850 nm, as AgNPs around 420 nm, characteristic of silver nanoparticles. SEM images indicated a formation of nanoparticles between 20-40 nm in size. The aspect ratio of TEM to AuNRs images was 4.4 ± 0.116 . The hydrogels were susceptible to the microorganisms tested by CIM / CBM and well diffusion technique. The alginate gel was cross-linked with chemical agents (EDC/NHS), associated with AuNRs, AgNPs and Protoporphyrin-IX (PpIX) conjugated. The rheology results indicated that the conjugated hybrid gels showed non-Newtonian behavior and characteristics of a pseudo-plastic material and gels are classified as solid viscoelastic. The UV-vis-NIR results indicated characteristic bands of PpIX, NBsAu and NPsAg. SEM images revealed for Alg gel (EDC/NHS) surface and transverse morphology with pore size around 50 to 100 μm . The images obtained by MET confirmed the presence of AgNPs in the hybrid, PpIX@AgNPs@Alg and (AgNPs + AuNRs) gel in the PpIX@(AuNRs+AgNPs)@Alg, as spherical morphologies for AgNPs and rods for AuNRs. The photodynamic effect indicated that AgNPs helped in the production of ROS. PpIX@AgNPs@Alg gel obtained the highest quantum yield of 47.10% after irradiation with Laser 1 (660 nm, power 30 mW). The photothermal property of the hybrid PpIX@(AuNRs + AgNPs)@Alg gel showed a good photothermal conversion efficiency of $\eta = 54.3\%$, indicating gel as photothermal potential after laser irradiation 2 (785 nm, power 1000mW). The *in vitro* results of the conjugated hybrid gels were promising, mainly for the PpIX@(AuNRs + AgNPs)@Alg gel, which after irradiation with Lasers 1 (PDT) and Laser 2 (PTT) simultaneously became effective for the melanoma treatment, attributed to its selectivity, compared with the RAW 264.7 line, indicating a greater synergistic effect between photodynamic + chemophotothermal therapy. The viability of B16-F10 cells decreased significantly to 9.83% after laser irradiation, thus considering the conjugated gels, a very platform in the treatment of skin cancer.

Keywords: Sodium Alginate. Silver Nanoparticles. Gold Nanorods. Antimicrobial Activity. Protoporphyrin IX. *in vitro* Test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema mostrando diferentes tecnologias aplicada a partir dos hidrogéis. Fonte: Adaptações segundo (ULLAH et al., 2015).	27
Figura 2-	Composição do alginato: cadeia de resíduos de ácido manurônicos; (b) cadeia de resíduo de ácido gulurônicos (c) cadeia de resíduo de ácido manurônicos e ácido gulurônicos alternados (KAWAGUTI & SATO, 2008).....	28
Figura 3-	Força de cisalhamento aplicada sobre um fluido para determinação da viscosidade de fluidos, segundo experimentos de Newton. Fonte: (Adaptado por NAVARRO, 1997).....	30
Figura 4-	Comportamento da curva de fluxo e curva de viscosidade. Fonte: (SHELLAND, 1967).....	31
Figura 5-	Curva de escoamento de fluido não-newtonianos de propriedades dependentes do tempo de cisalhamento. Fonte: (SKELLAND,1967).....	33
Figura 6-	Deformação sob cisalhamento num sólido cúbico. Fonte: (NAVARRO,1997).....	35
Figura 7-	Escala nanometrica de diversos tipos de materiais. Fonte: (LAURA, 2016). http://elfaronanotec.blogspot.com.br/2016/10/que-es-la-nanotecnologia-el-tamano-si.html	37
Figura 8-	a) Nanopartícula de ouro no tratamento contra o câncer; b) Folha plana de grafeno. Fonte: http://pt.chinananomaterial.com/info/the-biological-mechanisms-of-gold-nanoparticle Guangdong Nanhai ETEB Technology Co.,Ltd. (2017). https://megaarquivo.wordpress.com,/grafeno-o-material-do-futuro	39
Figura 9-	(a) Esquema ilustrativo do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície. Fonte: (BAYAZITOGU, TONI, TULLIUS, 2013) (b) Espectros de absorção óptica de nanobastões de ouro com diferentes dimensões (JAQUE et al., 2014).....	40
Figura 10-	Ilustração esquemática do método mediado por sementes para o crescimento de nanobastão de ouro. Fonte: (CHEN et al., 2013).....	41
Figura 11-	a) Reação entre Poli vinil pirrolidona (PVP) e Ag; b) Mecanismo de obtenção das NPsAg, através dos íons citrato. Fonte adaptada de:	

	MIRZAEI et al.,2017; HO et al.,2016.....	43
Figura 12-	Diagrama resumindo a interação das Nanopartículas de prata com células bacterianas. Fonte: (DAMM; MÜNSTEDT; RÖSCH; 2008; Neal, 2008).....	44
Figura 13-	Ilustração do procedimento da microdiluição seriada e placa Elisa, para realização do experimento para CIM (Concentração Inibitória Mínima). Fonte: Autor.....	53
Figura 14-	Ilustração do procedimento para o experimento da técnica difusão em poço. Fonte: Autor.....	54
Figura 15-	Curva da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, dos hidrogéis de Alg, NBAu@Alg, NPAg@Alg e (NBAu+NPAg)@Alg em diferentes concentrações de (4%, 6% e 8%).....	56
Figura 16-	Dependência da viscosidade em função da taxa de cisalhamento, dos hidrogéis de Alg, NBAu@Alg, NPAg@Alg e (NBAu+NPAg)@Alg em diferentes concentrações (4%, 6% e 8%).....	57
Figura 17-	a) Curva do teste de varredura da frequência oscilatória dinâmica, para o módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G'') em função da frequência angular (ω) para os hidrogéis de: alginato de sódio puro, NBAu@Alg; NPAg@Alg e (NBAu+NPAg)@Alg em diferentes concentrações (4%, 6% e 8%). b) Curva do teste de varredura da frequência oscilatória dinâmica, para o módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G'') em função da frequência angular (ω) para os hidrogéis de: alginato de sódio puro, NBAu@Alg; NPAg@Alg e (NBAu+NPAg)@Alg na concentração de 8%.....	58
Figura 18-	Espectro de UV-VIS-NIR normalizado a partir dos hidrogéis: (a) Alginato puro; (b) NBAu@Alg (4%); (c) NPAg@Alg (4%) e (d) (NBAu+NPAg)@Alg (4%).....	62
Figura 19-	Difratograma das seguintes amostras: (a) NBAu@Alg (4%), (b) NBAu , (c) NPAg@Alg (4%) e (d) Alginato de sódio puro.....	64
Figura 20-	Espectro de FT-IR para os hidrogéis de alginato de sódio puro para as concentrações: Alg.(4%); Alg. (6%) e Alg.(8%).....	65
Figura 21-	Espectro de FT-IR para os hidrogéis: NBAu@Alg (4%); NBAu@Alg (6%); NBAu@Alg (8%).....	66

Figura 22-	Espectro de FT-IR para os hidrogéis: NPAg@Alg (4%); NPAg@Alg (6%); NPAg@Alg (8%).....	67
Figura 23-	Espectro de FT-IR para os hidrogéis de: (NBAu+NPAg)@Alg (4%); (NBAu+NPAg)@Alg (6%); (NBAu+NPAg)@Alg (8%).....	68
Figura 24-	Curvas de TGA para os hidrogéis de alginato puro nas concentrações: Alg 4%; Alg 6%; Alg 8%.....	69
Figura 25-	Curvas de TGA para hidrogéis de: Alg 8%; NBAu@Alg 8%.....	70
Figura 26-	Curvas de TGA para hidrogéis de: Alg 4%; NPAg@Alg 4%.....	70
Figura 27-	Curvas de TGA para hidrogéis de: Alg 4%; Alg 6%; Alg 8%; (NBAu+NPAg)@Alg 4%; (NBAu+NPAg)@Alg 6%; (NBAu+NPAg)@Alg 8%.....	71
Figura 28-	Curvas de DSC para os hidrogéis de: Alg 4%; NBAu@Alg 4%; (NBAu+NPAg)@Alg 4%; NPAg@Alg 4%; Alg 6%; NBAu@Alg 6%; (NBAu+NPAg)@Alg 6%; NPAg@Alg 6%.....	72
Figura 29-	a) Imagens do MEV das NPsAg; b) Histograma dos tamanhos de partículas obtidos a partir da imagem de MEV, das nanopartículas de prata (Barra de escala: 500 nm).....	73
Figura 30-	a) Imagens do TEM do NBsAu; b) Histograma da razão de aspectos dos nanobastões de ouro.....	74
Figura 31-	Atividade antimicrobiana obtida pela zona de inibição dos hidrogéis de: Alg, NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg na concentração de 8% do Alginato, e das soluções de NBsAu e NPsAg, frente as bactérias (a): <i>Staphylococcus Aereus</i> -UFPE e (b): <i>Staphylococcus Epidermides</i> -ATCC, através do método de difusão em poço adaptado por Kirby-Bauer, 1966.....	78
Figura 32-	Estrutura do melanoma. Fonte adptada por (DHINAGAR; CELENK; AKINLAR, 2011).....	83

Figura 33-	As vias seguem o mecanismo (tipo I) fotofísico e (tipo II) fotoquímico para a terapia fotodinâmica, através de irradiação de luz laser para excitação do fotossensibilizador obtendo a geração de espécies reativas de oxigênio e oxigênio singlete. Adaptado de MOKWENA et al., (2018).....	85
Figura 34-	Estrutura Química da Protoporfirina IX. Fonte: O autor adaptada de (KRAMMER; ÜBERRIEGLER, 1996).....	86
Figura 35-	<i>Scaffolds</i> a partir de hidrogel envolvendo agente fototérmico natural a partir do extrato da semente de uva, aplicada em terapia melanona e cicatrização de feridas (MA et al., 2019).....	88
Figura 36-	a) Esquema de irradiação laser 1 :NIR 660 nm, potência 30 mW, 5 minutos cada poço. b) Laser 2: NIR 785 nm, potência de 1000mW, 5 minutos cada poço. c) Esquema ilustrativo dos lasers (1+2) irradiados simultaneamente.....	100
Figura 37-	Mecanismo de reação e funcionalização da PpIX e a reticulação do gel a partir do alginato de sódio.....	102
Figura 38-	Fotografias dos géis de Alg@(EDC/NHS), PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg.....	103
Figura 39-	Análise reológica dos géis híbridos de Alg@(EDC/NHS), PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg medindo (a) viscosidade em função da taxa de cisalhamento, (b) gráfico do módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') versus frequência angular, (c) $\tan(\delta)$ (G''/G') versus frequência angular, em temperatura da placa de 25°C.....	105
Figura 40-	Espectro de infravermelho por Transformada- Fourier (FTIR) de (a) Alg, (b) Alg@(EDC/NHS), (c) gel híbrido de PpIX@(NPsAg@Alg), (d) gel híbrido de PpIX@Alg, (e) gel híbrido de PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg) e (f) PpIX.....	106
Figura 41-	Espectro de RMN ¹ H 300 MHz do (a) Alginato em D ₂ O, (b) PpIX, (c) gel híbrido conjugado de PpIX@Alg, (d) PpIX@(NPsAg@Alg) e (e) PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg em DMSO-d ₆	108
Figura 42-	TGA do Alginato em EDC/NHS, PpIX@(NPsAg@Alg), PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg), PpIX@Alg e	

	PpIX.....	109
Figura 43-	Curva dos géis de: Alg@EDC/NHS, PpIX@(NPsAg@Alg), PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg), PpIX@Alg e PpIX.....	111
Figura 44-	Espectro de Uv-vis-NIR dos géis híbridos da PpIX@(NPsAg@Alg), PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg), PpIX@Alg, PpIX e Alginato. O NBsAu e NPsAg foram feito em solução.....	112
Figura 45-	Imagens do MEV de uma vista superficial do gel de Alg@EDC/NHS, com magnificação de a) 338x e vista transversal com magnificação de b) 3.39 kx e c) 1.40kx.....	113
Figura 46-	Imagens do MEV de uma vista superficial do gel híbrido de a) PpIX@Alg e b) PpIX@(NPsAg@Alg) com magnificação de 180 kx.....	114
Figura 47-	Imagem do TEM para a) NPsAg e b) gel híbrido de PpIX@(NPsAg@Alg). Insert: Indica o padrão SAED.....	115
Figura 48-	Histograma de distribuição de tamanho de partículas para a) NPsAg e b) PpIX@(NPsAg@Alg).....	116
Figura 49-	Imagem do TEM para o gel híbrido de PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg; Insert: Indica o padrão SAED.....	117
Figura 50-	Histograma de distribuição de tamanho de partículas para o gel de PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg.....	118
Figura 51-	a) Variação da absorbância da banda em 414 nm da solução de DPBF na presença de géis híbridos PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg: Insert: variação da absorbância máxima na faixa DPBF para todos os géis. b) Fotodecomposição de DPBF através da produção de oxigênio singleto irradiado com um laser de 660 nm CW.....	120
Figura 52-	Variação da absorbância da banda máxima em 414 nm da solução de DPBF nos géis híbridos de PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@Alg.....	120
Figura 53-	a) Efeito fototérmico da irradiação dos géis durante 5 min de irradiação (laser ON) NIR (785 nm) e 3 min de resfriamento (laser OFF). b) Variação da temperatura em função da potência de irradiação 500 a 1000 mW, laser CW 785 nm.....	122

- Figura 54-** Fit linear do período de resfriamento (180 s) versus o logaritmo natural negativo da temperatura da força motriz (Θ)..... 123
- Figura 55-** O efeito dos lasers usados para realizar efeito fotodinâmico e eficiência de conversão fototérmica: Laser 1 (NIR CW 660 nm e 30 mW) e Laser 2 (NIR CW 785 nm, sob diferentes densidade de potência, variando de (800 a 1000 mW) na viabilidade celular de célula Raw 264.7 e B16-F10. Os valores são mostrados com medias \pm DP; **P* < 0.05..... 124
- Figura 56-** Citotoxicidade de PpIX livre, PpIX@Alg, PpIX(AgNPs@Alg) e PpIX@(AuNRs + AgNPs)@Alg em diferentes concentrações frente às linhagens de macrófagos Raw 264.7. **a)** e de melanoma B16-F10. **b)** após 48 horas de exposição. Os valores estão apresentados em média \pm desvio padrão; **P* < 0.05..... 125
- Figura 57-** Terapia fotodinâmica e Quimiofototerma dos géis híbridos conjugados de PpIX(AgNPs@Alg) e PpIX@(AuNRs + AgNPs)@Alg, irradiados por: Laser 1 (NIR CW 660 nm e 30 mW), Laser 2 (NIR CW 785 nm, na potência 1000 mW) e os Lasers 1 e 2, simultaneamente em células tumorais B16-F10. Valores mostrados em média \pm DP; **P* < 0.05..... 126

LISTA DE ESQUEMA

Esquema 1-	Comportamento de líquidos e sólidos viscoelásticos.....	36
-------------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais.....	47
Tabela 2-	Propriedades térmicas de Alg (4 a 8%), NPAg@Alg 4%, NBsAu@Alg 8%, (NBsAu+NPsAg) @Alg de 4 a 8%.....	71
Tabela 3-	Concentração Mínima Inibitória (CIM) para NPAg, NBAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg contra patógenos.....	75
Tabela 4-	Valores dos halos de inibição em (mm) para os hidrogéis a (4%), NBsAu e NPsAg que apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos.....	77
Tabela 5-	Valores dos halos de inibição em (mm) para os hidrogéis a (8%), NBsAu e NPsAg que apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos.....	78
Tabela 6-	Rendimento quântico e oxigênio singleto de alguns fotosensibilizador relatados.....	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alg	Alginato
AS	Alginato de sódio
AR	Aspecto de Razão
ATCC	Coleção de cultura do tipo americana
B16F10	linhagem celular de melanoma
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFC	Cúbica de face centrada
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTAB	Brometo de Cetrimônio
DPBF	1-3, Difenilbenzofurano
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria diferencial por varredura
DQF	Departamento de Química Fundamental
D ₂ O	Água deuterada
EDC	N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimide hidrocloreto
EDTA	Etilenodiamona
FA	Folato
FS	Fotossensibilizador
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
G	Ácido poli- α -L-gulurônico
h	Coeficiente de transferência de calor
LAC	Laboratório de Combustível
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MBC	Minimum bacterial concentration
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
MH	Müeller-Hinton
Mm	Milímetro
NBs	Nanobastões
M	Ácido poli- β -D-manurônico
η	Eficiência de conversão fototérmica
NHS	N-hidroxisuccinimida
NH ₂ -TPP	Tetrakis (4-aminofenil) porfirina

NPs	Nanopartículas
Nm	Nanômetro
NBsAu	Nanobastões de ouro
NpsAg	Nanopartículas de prata
OD	Densidade óptica
PAA	Ácido poli acrílico
PDT	Terapia Fotodinâmica
PEM _s	Polieletrólítica
PLLA	Ácido linoleico
PNIPA	Poli (N-isopropilacrilamida)
PpIX	Protoporfirina IX
PSS	Poli estireno sulfonado
PVA	Poli vinil álcool
PTT	Terapia Fototérmica
Q ₀	Calor gerado pela cubeta de quartzo
RAW	Linhagem de macrófago murino
ROS	Espécies reativas de oxigênio
R	Referência
S	Amostra
S	Área de superfície do recipiente
T _{vis}	Temperatura ambiente
τ _s	Constante de tempo do sistema
T _{max}	Temperatura de equilíbrio
TGA	Análise termogravimétrica
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
UATR	Acessório Universal de Amostragem com o braço de pressão
UFC	Unidades Formadoras de Coluna
UFG	Universidade Federal de Goiás
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UV-Vis	Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível
UV-Vis-NIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho próximo
(Φ _s)	Rendimento quântico do oxigênio singleto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	APRESENTAÇÃO GERAL	22
1.2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
1.2.1	Polímeros	24
1.2.2	Géis e hidrogéis poliméricos	25
1.2.3	Alginato de sódio	27
1.2.4	Fundamentos da reologia	29
1.2.4.1	Parâmetros e Características reológicas.....	31
1.2.5	Nanotecnologia e nanomaterias	36
1.2.6	Nanobastões de ouro	39
1.2.7	Atividade antimicrobiana de nanobastões de ouro com matrizes poliméricas	41
1.2.8	Nanopartículas de prata	43
1.2.9	Atividade antimicrobiana das nanopartícula de prata com matrizes poliméricas	44
2	OBJETIVOS	46
2.1	OBJETIVO GERAL.....	46
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
3	EXPERIMENTAL	47
3.1	REAGENTES.....	47
3.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	47
3.2.1	Preparação de síntese dos nanobastões de ouro	47
3.2.2	Preparação das nanopartículas coloidal de prata	48
3.2.3	Preparação para o fluido coloidal e os hidrogéis a base do alginato de sódio	48
3.2.4	Preparação para os hidrogéis de alginato de sódio com os nanobastões de ouro	49
3.2.5	Preparação para o fluido coloidal e hidrogéis de alginato de sódio com nanopartículas de prata	49
3.2.6	Preparação para os hidrogéis de alginato de sódio com nanobastão de ouro e nanopartícula de prata	49

5	SÍNTESES DE GÉIS HÍBRIDOS A BASE DO ALGINATO DE SÓDIO RETICULADO COM EDC/NHS, ASSOCIADAS ÀS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (NPsAg E NBsAu) E CONJUGADO COM A PROTOPORFIRINA IX, VISANDO APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA EM CÂNCER DE PELE.....	82
5.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E OBJETIVOS.....	82
5.2	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	83
5.3	TERAPIA FOTOTÉRMICA.....	87
5.4	OBTENÇÃO DE BIOMATERIAIS ESTRUTURADOS A PARTIR DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS E APLICAÇÕES ATRAVÉS DE TESTES <i>IN VITRO</i> e <i>IN VIVO</i>	88
6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	94
6.1	MATERIAIS.....	94
6.2	PREPARAÇÃO DE SÍNTESE DOS NANOBASTÕES DE OURO.....	94
6.3	PREPARAÇÃO DE SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS COLOIDAI DE PRATA.....	95
6.4	PREPARAÇÃO DA SÍNTESE DO GEL HÍBRIDO CONJUGADO PpIX@Alg.....	95
6.5	SÍNTESE DA PpIX@(NPsAg@Alg) E PpIX@(NBsAu+ NPsAg)@Alg.....	95
7	CARACTERIZAÇÕES.....	96
7.1	ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL (UV-VIS)- (NIR).....	96
7.2	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	96
7.3	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR- (RMN).....	96
7.4	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA TGA).....	97
7.5	CALORIMETRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (DSC).....	97
7.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	97
7.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	97
7.8	COMPORTAMENTO REOLÓGICO.....	97
7.9	DETECÇÃO E PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO (1O_2) (ROS).....	98
7.10	EFEITO FOTOTERMAL DE PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg E EFICIÊNCIA DE CONVERSÃO FOTOTÉRMICA (η).....	98
7.11	LINHAS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA PARA ENSAIO <i>IN VITRO</i>	99
7.12	TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA DOS GEÍIS HÍBRIDOS <i>IN</i>	

	<i>VITRO</i>	99
7.13	CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	100
7.14	EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA E QUIMIOFOTOTÉRMAL <i>IN VITRO</i> DE GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADOS.....	100
7.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	101
8	RESULTADOS E DISCUSSÕES	102
8.1	SÍNTESES DOS GÉIS HÍBRIDOS A PARTIR DO ALGINATO DE SÓDIO RETICULADO EDC/NHS CONJUGADO COM A PROTOPORFIRINA IX FUNCIONALIZADA.....	102
8.2	COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE ACORDO COM MÉTODO ROTACIONAL E OSCILATÓRIO.....	103
8.3	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FT-IR) E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN H^1) DOS GÉIS HÍBRIDOS A PARTIR DO CONJUGADO DA PpIX-ALGINATO.....	106
8.4	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	109
8.5	CALORIMETRIA DIFERENCIAL POR VARREDURA (DSC).....	110
8.6	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (UV-VIS-NIR) DA PpIX E DOS GÉIS HÍBRIDOS.....	111
8.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO GEL DE ALGINATO RETICULADO COM AGENTES QUÍMICOS E DOS GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADOS COM A PROTOPORFIRINA-IX.....	112
8.8	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DOS GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADOS COM A PROTOPORFIRINA-IX.....	114
8.9	GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO DOS GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADO COM PpIX.....	119
8.10	TERAPIA FOTOTÉRMICA DOS GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADOS-PpIX.....	121
8.11	TESTES <i>IN VITRO</i> DOS GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADO COM PPIX, APLICADA A TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD), FOTOTÉRMICA (TFT) E QUIMIOFOTOTERMAL.....	123
9	CONCLUSÕES PARCIAIS	129
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	132
11	PERSPECTIVAS	134
	REFERÊNCIAS	135
	APÊNDICE A - PATENTES DEPOSITADAS	159
	ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO	160

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO GERAL

A ciência de biomateriais tem proporcionado uma interessante interconexão entre a química, ciência dos materiais, engenharia mecânica, biologia e medicina (SHANMUGAPRIYA; KIM; KANG, 2019; RATNER et al.,2013). Essa multidisciplinaridade tem levado a um considerável aprimoramento técnico-científico, sobretudo no que consiste na introdução de novos biomateriais que contribuam para longevidade e padrões de vida superiores de seres humanos, tendo como exemplo, na liberação controlada de fármacos, aplicação biomédica, agentes antimicrobianos, engenharia de tecidos e na terapia câncer (BANORIYA; PUROHIT; WIVEDI, 2017; KIM et al., 2019; MA et al., 2019; CAPLIN; GARCÍA, 2019).

O câncer se tornou uma grande ameaça à saúde humana no mundo, por ser considerada uma das doenças com maior risco de vida (GREENLEE et al., 2000; CHEN et al., 2017). Os tratamentos convencionais de câncer, como quimioterapia, radioterapia, e cirurgia, têm sido incapazes de satisfazer a demanda da terapia câncer devido a sua resistência (PEER et al., 2007), o desafio mais crítico nesses tratamentos está associada aos efeitos colaterais tóxicos indesejáveis dos agentes anticâncer que são entregues em maneira inespecífica nos tecidos de células normais e baixa eficiência terapêutica (ZENG et al., 2018; PEER et al., 2007). Dentre os diversos tipos de câncer destaca-se o melanoma, pois é considerado resistente em alguns tratamento como quimioterapia e/ou radioterapia. É importante ressaltar o desenvolvimento de biomateriais promissores para tratamento de câncer assim como para cicatrização de feridas em terapia de melanoma (JUNG et al., 2014; JIANG et al.,2017). Em vista disso, um esforço considerável foi dedicado durante várias décadas ao desenvolvimento de novas tecnologias para diagnóstico e terapia do câncer (CHU; DUPUY, 2014). Dentre essas terapias que vem se destacando nos últimos anos encontram-se a fotodinâmica (TFD) que leva à destruição seletiva de células cancerosas, induzida por reações fotoquímicas, pois espécies reativas de oxigênio citotóxica são geradas através da ativação de luz NIR (KEMPA et al., 2015; JING et al., 2016), Este tratamento envolve também agentes fotossensibilizadores que incluem a classe de macrociclos como por exemplo, a porfirina e a protoporfirina IX (HAEDICKE et al., 2015, PENON et al., 2016), existe também a terapia fototérmica (TFT) que é considerada como tratamento por hipertemia minimamente invasivo. Estes agentes fototérmicos podem ser

obtidos utilizando as nanopartículas metálicas e também os biopolímeros naturais nas quais possuem algumas vantagens, como biocompatibilidade satisfatória e biodegradabilidade (WANG et al., 2016; YANG et al., 2016; TIAN et al., 2011; XU et al., 2018). O tratamento através dessas terapias são consideradas bastantes favoráveis e podem ser indicadas como alternativa para vários tipos de câncer gástrico, esôfago, pulmão, bexiga (KEMPA et al., 2015; JING et al., 2016), incluindo câncer pele (SIDOROFF e THALER, 2010).

Sabe-se que os hidrogéis, consistem em redes reticuladas de polímeros hidrofílicos, cercada por uma grande quantidade de água (KIRSCHNER & ANSETH, 2013). Eles geralmente têm propriedades semelhantes aos tecidos o corpo humano e são considerados uma das classes mais importantes dos biomateriais, por serem utilizados a uma variedade de aplicação, como por exemplo: tecido artificial, cicatrização de feridas, administração de medicamentos, implantes médicos, além disso, eles podem promover regeneração e angiogênese no local da ferida da pele (ZHOU et al., 2018; SUN et al., 2018; VAN VLIERBERGHE; DUBRUEL; SCHACHT, 2011; HOFFMAN, 2012; WEISS et al., 2010).

Nos últimos anos, a aplicação de nanopartículas metálicas (NPs) em vários campos expandiu consideravelmente. Nanopartículas de ouro (NPsAu) e de prata (NPsAg), por exemplo, foram aplicadas com sucesso nos âmbitos médicos e farmacêuticos para a distribuição de agentes terapêuticos, no diagnóstico de doenças crônicas e em sensores biomédicos (ZHANG et al., 2008). Além disso, as NPsAg foram examinadas quanto à sua capacidade de reduzir infecções microbianas na pele (PADDLE et al., 2006) e para prevenir colonização de bactérias em vários dispositivos de superfície, como cateteres e próteses (MAKI, 2010).

Contudo, um fator importante a ter em consideração quando pretende-se usar nanopartículas é a forma como elas serão transportadas para o local de ação. Para isso, vários métodos, como filmes, nanocápsulas, espumas e géis têm sido usados. A combinação de nanopartículas metálicas e polímeros tem atraído muita atenção devido às suas possíveis aplicações (SÁMANO-VALENCIA et al., 2014). Muitos trabalhos relataram a estabilização eficiente de nanopartículas de ouro esféricas em alginato, mostrando melhorias no desempenho da administração de drogas (XU et al., 2014) e cicatrização de feridas (BALAKRISHNAN et al., 2005).

Diante do exposto e levando em consideração as propriedades do alginato de sódio e sua aplicação como biomaterial, somado com a possibilidade de ampliar sua função biológica mediante a introdução de nanopartículas metálicas, esta tese tem como tema o desenvolvimento de novos materiais híbridos a partir de hidrogéis a base de alginato de sódio com nanobastões de ouro e nanopartículas de prata, com intuito de obter um promissor hidrogel com propriedades antimicrobianas e ampla aplicabilidade na área biomédica. Nesta tese, foi abordado também como alvo de investigação, o uso dos géis híbridos conjugado ao fármaco fotossensibilizador protoporfirina IX, com finalidade de investigar a terapia fotodinâmica, fototérmica e quimiofototérmica e realizar testes *in vitro* frente à linhagem tumoral melanoma (B16-F10).

1.2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.2.1 Polímeros

Um polímero é uma macromolécula composta por muitas unidades de repetição (meros) ligadas por uma ligação covalente. A matéria-prima para a formação de um polímero é um monômero, ou seja, uma molécula com uma unidade de repetição. Para a síntese de polímeros é necessário que pequenas moléculas (monômeros) se liguem entre si, formando a cadeia polimérica (CANEVAROLO, 2010).

Em relação à origem, os polímeros podem ser sintéticos ou naturais. Os polímeros sintéticos incluem, por exemplo: polietileno glicol (PEG), poli-caprolactona (PCL), ácido polilático (PLA) e polivinilpirrolidona (PVP). Estes polímeros possuem boas propriedades mecânicas e estabilidade térmica, uma vez que são de natureza hidrofóbica e quimicamente mais forte em comparação com os polímeros naturais (TABATA, 2009). Eles são classificados de acordo com o processo de síntese utilizado, podendo então ser divididos em dois grupos diferentes: polímero de adição e polímero de condensação. O primeiro é produzido pela junção simples de pequenas moléculas que possuem ligação dupla. Estas ligações duplas quebram-se, possibilitando uma arrumação que possibilita a união destas unidades sem a formação de subprodutos. Enquanto que os polímeros de condensação são formados a partir de reação de condensação com a eliminação de pequenas moléculas tais como, água, ácido clorídrico e metanol (CAROTHERS, 1929).

Os polímeros naturais por sua vez, são compostos por monômeros hidrofílicos e dentre os mais conhecidos destacam-se: amido, quitosana, celulose, glicogênio e alginato de sódio. Estes polímeros geralmente são: atóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (SUH e MATTHEW, 2000). Tais características tornam o polímero natural um vantajoso material com potencial utilização em sistemas regenerativos e sistemas de liberação controlada de medicamentos (NATESAN et al., 2012).

1.2.2 Géis e Hidrogéis Poliméricos

O termo "gel", segundo uma definição mais clássica, (Flory,1978), é utilizado para designar um material formado por uma rede polimérica unida por ligações covalentes e intumescida devido à presença de um solvente. Outra definição (Ferry,1980), afirma que um gel é um sistema substancialmente diluído, que não apresenta fluxo quando em repouso. Uma definição ainda mais recente para os géis foi (Almdal e colaboradores, 1993), baseada em características fenomenológicas, comportamento e aspecto similar aos sólidos ou quase sólido no qual consiste de dois ou mais componentes, onde um é líquido, presente em quantidade substancial.

Os géis poliméricos são constituídos de um solvente e pelo menos um polímero que esteja estruturado em forma de rede. Os pontos de junção da rede podem ser formados permanentemente por ligações covalentes (TAGER, 1978; RUSSO, 1987; HIKMET, CALLISTER, e KELLER, 1988). Nesse contexto, os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais, reticulados e absorventes de água. São em grande parte hidrofílicos e altamente flexíveis, geralmente são preparados a partir de moléculas poliméricas hidrofílicas, que são reticuladas devido à presença de grupos como: $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-CONH_2$, $-CONH-$ e $-SO_3H$, através das ligações covalentes, ligações de hidrogênio e interações de van der Waals (PEPPAS et al., 2000). De acordo com os seus constituintes químicos, eles podem ser divididos em hidrogéis de polímeros sintético, hidrogéis de polímeros naturais e a combinação entre as duas classes. Os hidrogéis a partir de polímeros sintéticos incluem a poliacrilamida (PAM), poli (vinil álcool) (PVA), polietilenoglicol (PEG), poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) (AKHTAR, HANIF e RANJHA, 2016). Os hidrogéis baseados em polímeros naturais, incluindo macromoléculas extraídas de colágeno animal, plantas e algas marinhas, são tipicamente polissacarídeos e proteínas constituídos por glicosídeos e unidades de repetição de aminoácidos (TALAAT, 2008).

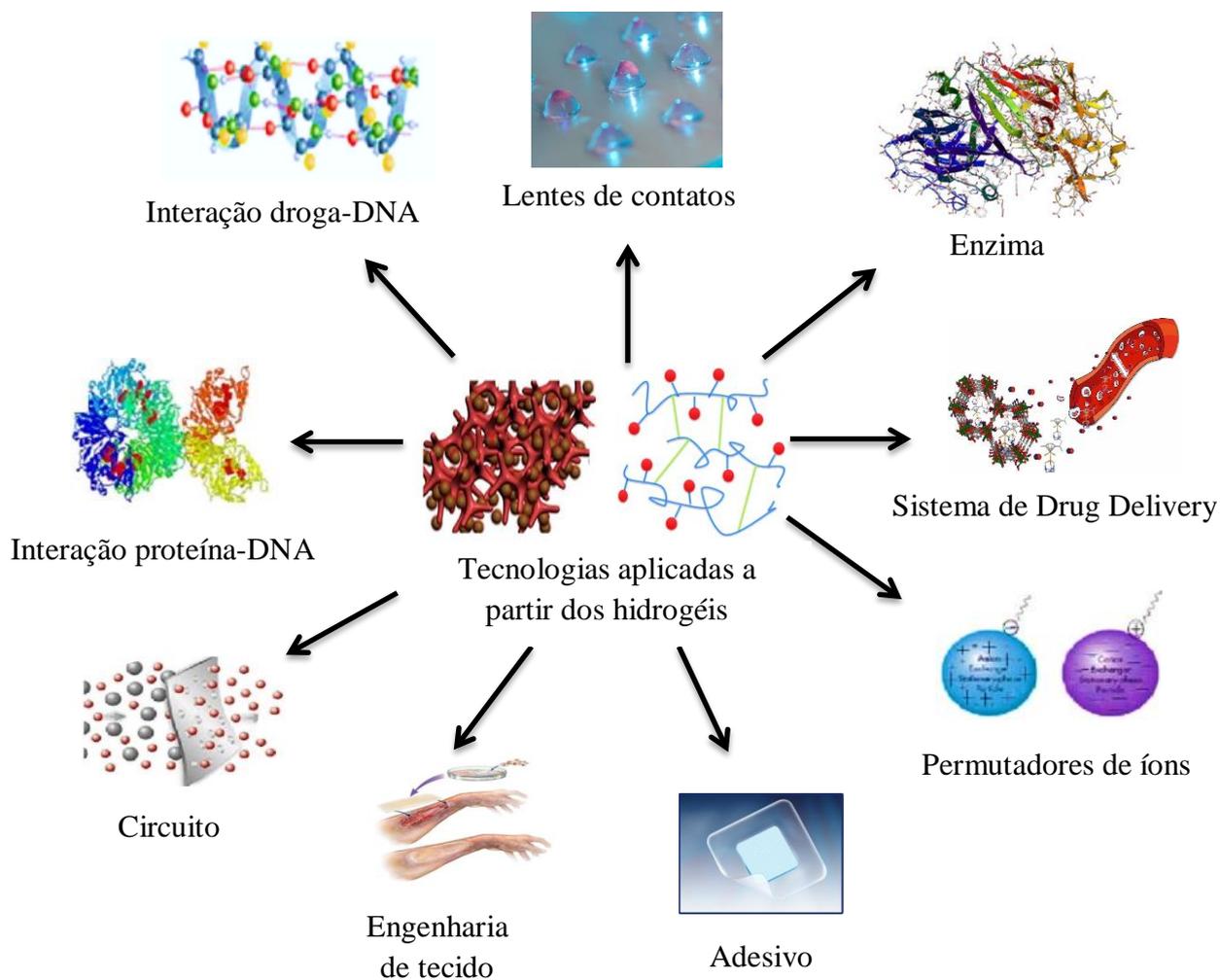
Do ponto de vista sintético, eles podem ser obtidos por polimerização de enxerto, polimerização de reticulação e formação de rede polimérica solúvel em água e dividida em grupos de acordo com sua estrutura, podendo ser amorfa, semicristalina, agregados cristalinos ou hidro coloides (AHMED et al., 2013).

Esses hidrógeis podem ainda ser classificados em função do tipo de interação observada na reticulação. Se houver interações físicas, emaranhados, interações eletrostáticas ou ligação de hidrogênio, são reversíveis devido às mudanças conformacionais. Se as interações forem químicas, a reticulação covalente química (simultaneamente ou pós-polimerização) é utilizada para preparar um hidrogel em que são permanentes e irreversíveis devido a mudanças na configuração (HACKER e MIKOS, 2011). Segundo Hoffman (2012), outras técnicas para obtenção de hidrogéis, podem ser citadas, como, por exemplo, aquecimento/resfriamento de uma solução polimérica para formar um gel, reticulação em solução aquosa, abaixamento do pH em solução aquosa, solução de mistura para formar um gel de coacervação, gelificação de uma solução polieletrólítica com um íon multivalente de carga oposta.

Os hidrogéis podem ser aplicados na agricultura (AMULYA, 2010), sistemas de entrega de drogas (MEHRDAD, AMIR e PEDRAM, 2009), aditivos alimentares (CHEN et al., 1995), produtos farmacêuticos (KASHYAP, KUMAR e KUMAR, 2005), aplicações biomédicas (STAMATIALIS et al., 2008), medicamentos regenerativos e engenharia de tecidos (LING et al., 2011), conforme está ilustrado na Figura 1.

Os hidrogéis também podem ser responsáveis pela obtenção de biomateriais estruturados, chamados de: *scaffolds*, que por sua vez, podem ser aplicados à engenharia de tecidos com a finalidade de serem usados como adesivos entre tecido e superfície de materiais (DRURY e MOONEY, 2003). Dentre os diversos tipos de polímeros naturais, estão os primeiros materiais *scaffolds* biodegradáveis a serem usados clinicamente, principalmente devido a suas melhores interações com vários tipos de células. Na literatura pode ser observada uma grande quantidade de polímeros naturais que podem ser usados na forma de hidrogéis e *scaffolds*, os quais podem citar: hidroxiapatita (HA), colágeno, gelatina, fibrina, alginato de sódio e agarose (SHELKE et al., 2016; JAISWAL et al., 2015), bem como a partir dos polímeros sintéticos, os quais também podem ser usados como hidrogéis incluindo: poli (ácido acrílico) (PAA), poli (óxido de etileno) (PEO), acetato de polivinila (PVA) (LEE e MOONEY, 2001).

Figura 1- Esquema mostrando diferentes tecnologias aplicadas a partir dos hidrogéis. **Fonte:** Adaptações segundo ULLAH et al. (2015).



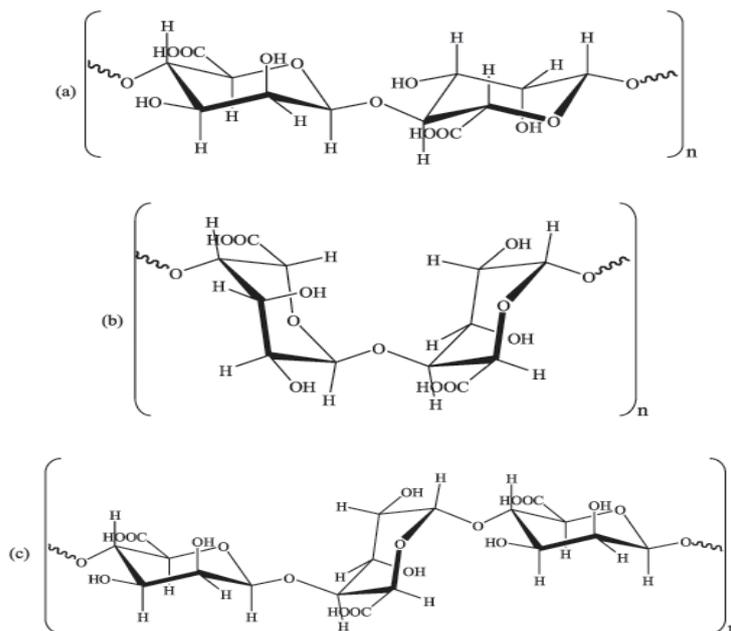
1.2.3 Alginato de sódio

Dentre os polímeros possíveis de serem utilizados como hidrogéis, destaca-se o alginato de sódio, o qual consiste em um polissacarídeo solúvel em água encontrado na matriz intercelular das algas marrons (GEORGE;ABRAHAM, 2006). É constituído por ligações tipo (1- 4) entre o β -D- ácido manurônico (M) e α -L- ácido glurônico (G) (BRESOLIN et al., 2003; DRAGET; SKJAK-BRAEK; SMIDSRD, 1997) (Figura 2).

O alginato de sódio possui propriedades importantes, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Ele também é considerado

de baixo custo e fácil combinação com cátions divalentes como, por exemplo, o cálcio (Ca^{+2}), estrôncio (Sr^{+2}) e bário (Ba^{+2}) que tornam adequados para muitas aplicações biomédicas (LI et al., 2005).

Figura 2- Composição do alginato: cadeia de resíduos de ácido manurônicos; (b) cadeia de resíduo de ácido gulurônicos (c) cadeia de resíduo de ácido manurônicos e ácido gulurônicos alternados (KAWAGUTI e SATO, 2008).



O alginato de sódio pode ser facilmente reticulado com glutaraldeído, 1,6-hexano-diamina e outros compostos orgânicos bi-funcionais (MO et al., 2011). Devido a sua compatibilidade, vem sendo amplamente utilizado no campo da engenharia de tecidos, incluindo regeneração da pele (KONG et al., 2009), cartilagem (LI e ZHANG, 2005), osso (DIVYARANI et al., 2011) e fígado (GINZBERG et al., 2003), no tratamento de feridas como curativos e no reforço do processo de cicatrização (PAUL e SHARMA, 2004).

O alginato de sódio tem capacidade de absorção da água muito elevada, absorvendo entre 200 e 300 vezes o seu próprio peso e pode ser fabricado com formas variadas, tais como, hidrogéis, filmes, fibras ou microesferas (SOWJANYA et al., 2013; SUN e TAN, 2013). Outra característica do gel de alginato é a moldabilidade, isto é, a

morfologia do gel pode ser controlada por método de preparação. O gel com uma morfologia regulada pode ser aplicado para sistemas de entrega de drogas, displays de cristal líquido e síntese de biomateriais (LEE e MOONEY, 2012). Sua estrutura de anel é de seis membros, portanto é difícil aumentar a rigidez ou compactar. Esta estrutura cria volumes vazios maiores e permite a absorção de moléculas de água (LISTIARINI et al., 2009).

É muito importante ter um equilíbrio entre a permeabilidade da membrana e a seletividade de água ou gás (LISTIARINI et al., 2009). Neste contexto, a absorção de água excessiva provoca inchaço da membrana e assim, diminui a seletividade do alginato de sódio. Li e colaboradores (2012), afirmaram que para suprir esta deficiência, o alginato precisa ser modificado utilizando diferentes métodos, os quais podem ser categorizados como reticulação covalente, iônica e interações não ligadas. Na reticulação covalente de polímeros com grupos polares, por exemplo, ocorre um aumento da estabilidade estrutural da membrana devido aos grupos polares do polímero reduzindo a natureza hidrofílica do mesmo. Já a reticulação iônica fornece ainda melhores resultados, porque o complexo eletrólito produzido é mais robusto e hidrofílico.

Tendo em vista que essa classe de géis normalmente apresenta comportamento viscoelástico. O termo viscoelasticidade é justamente atribuído a sistemas que apresentam elasticidade (propriedade dos sólidos) e viscosidade (propriedade dos líquidos) (RAO, 1999), torna-se de grande necessidade o estudo reológico desse grupo de materiais.

1.2.4 Fundamentos da reologia

A reologia é o estudo do escoamento da matéria. Neste contexto, a forma mais completa de defini-la seria como a ciência que estuda a deformação e o fluxo da matéria (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989). A reologia é uma área da física que analisa as deformações ou as tensões de um material provocadas pela aplicação de uma tensão ou deformação. O material pode estar no estado sólido, líquido ou gasoso. A deformação de um sólido pode ser caracterizada por leis que descrevem a alteração do volume, tamanho ou forma, enquanto que o escoamento de um fluido que pode estar no estado líquido ou gasoso é caracterizado por leis que descrevem a variação contínua da

taxa ou grau de deformação em função da tensão aplicada (VINOGRADOV e MALKIN, 1980).

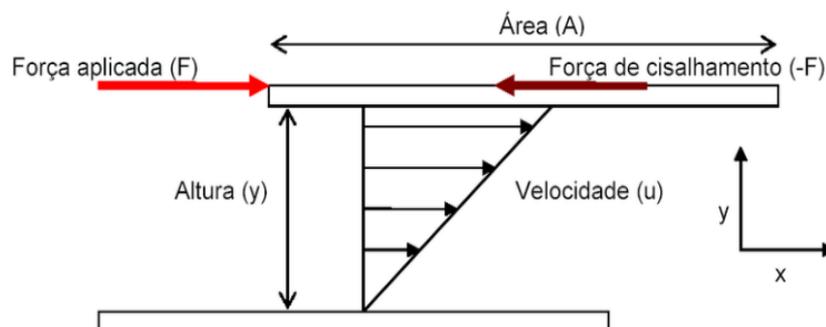
De acordo com o que é mostrado na Figura 3, em um fluido contido entre duas placas paralelas de área A , separadas por uma distância y , uma força F é aplicada de modo a movimentar a placa com uma velocidade (u) constante em relação à placa inferior que é mantida fixa (BENNET;MEYERS,1982). Esta força F dá origem a uma força de mesma intensidade, porém no sentido contrário denominada força de cisalhamento τ , ela existe devido às forças de coesão do fluido com as paredes da placa e entre as camadas de fluido.

A resistência ao escoamento (força por unidade de área cisalhante) pode ser expressa pela equação:

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (1)$$

onde: τ = Força /Área : tensão de cisalhamento.

Figura 3- Força de cisalhamento aplicada sobre um fluido para determinação da viscosidade de fluidos, segundo experimentos de Newton. Fonte: (Adaptado por NAVARRO, 1997).



A força de cisalhamento dá origem a um gradiente de velocidade $\partial u_x / \partial y$ entre as placas sendo chamada de taxa de deformação, descrita pela equação (2). Esse gradiente de velocidade também é chamado de taxa de deformação:

$$\dot{\gamma} = \frac{du}{dy} \quad (2)$$

onde: $\dot{\gamma}$: taxa de deformação, s^{-1}

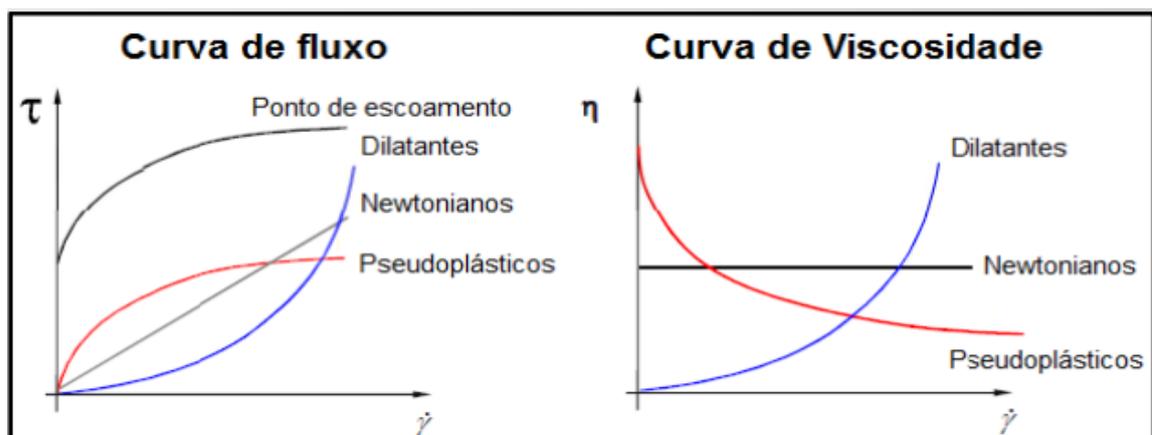
De acordo com esta equação e segundo descrito na literatura, por MA et al., (2014), ZLOPASA, et al., (2016), a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação contribuem diretamente no comportamento de um fluido, com a finalidade de ser newtoniano ou não newtoniano.

1.2.4.1 Parâmetros e Características reológicas

Um das principais propriedades reológicas de interesse, que se encontram vinculadas ao desempenho do fluido são: índice de fluxo (comportamento), índice de consistência, viscosidade aparente, viscosidade plástica, limite de escoamento e força gel, e a partir da análise da relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento, os fluidos podem ser classificados em newtonianos e não newtonianos. A relação entre a tensão de cisalhamento (τ) e a taxa de deformação, chamada também de taxa de escoamento ($\dot{\gamma}$) no caso de um fluido newtoniano, pode ser expressa pela equação (3), para a situação ilustrada na Figura 4. A constante de proporcionalidade η desta equação é denominada viscosidade (THOMAS et al., 2001).

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (3)$$

Figura 4- Comportamento da curva de fluxo e curva de viscosidade. Fonte: (SHELLAND, 1967).



Portanto os fluidos newtonianos estão relacionados com o comportamento de escoamento que independem da taxa de deformação a que o fluido está submetido e

mostram um único valor de viscosidade a uma dada temperatura, conforme a Lei de Newton da viscosidade. Os fluidos newtonianos podem abranger todos os gases, além de líquidos não poliméricos e homogêneos, tais como: água, leite, soluções de sacarose e óleos vegetais. Já nos fluidos chamados não newtonianos, a viscosidade do sistema, definido como viscosidade aparente, varia com a magnitude da taxa de deformação $\dot{\gamma}$. Neste caso, μ_a depende da taxa de deformação aplicada. Sendo assim, a relação entre a tensão de cisalhamento τ e taxa de deformação $\dot{\gamma}$ não é constante, mesmo em escoamento laminar a temperatura e pressão constantes. Geralmente, este tipo de fluido tem um comportamento que é verificado em sistemas coloidais. Sendo assim, a definição para qualquer fluido não newtoniano pode ser expresso pela relação:

$$\mu_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (4)$$

sendo μ_a chamada de viscosidade aparente, válida para uma determinada taxa de deformação.

Segundo relatos da literatura, estudo do comportamento reológico de géis a partir de desoxicolato de sódio a 50 mmol L⁻¹, brometo de sódio a 200 mmol L⁻¹ e o aminoácido L-Lys, nas concentrações 0, 10, 20 e 30 mmol L⁻¹, apresentou um comportamento não newtoniano dos géis devido à viscosidade aparente (μ_a) que diminui a medida que aumenta a taxa de cisalhamento. Este comportamento foi atribuído a destruição na estrutura de rede do gel (SUN, et al., 2014). Além disso, é possível analisar este comportamento e determinar cada tipo de fluido como é mostrado na curva de fluxo (Figura 4), apresentando uma relação entre a tensão de cisalhamento, a taxa de deformação e a curva de viscosidade em função da taxa de deformação. O fluido que possui um ponto de escoamento entra em fluxo apenas quando as forças externas do material superam as forças estruturais internas das amostras, o que ocorre transição entre as fases elástica e plástica (CALLISTER, 2013).

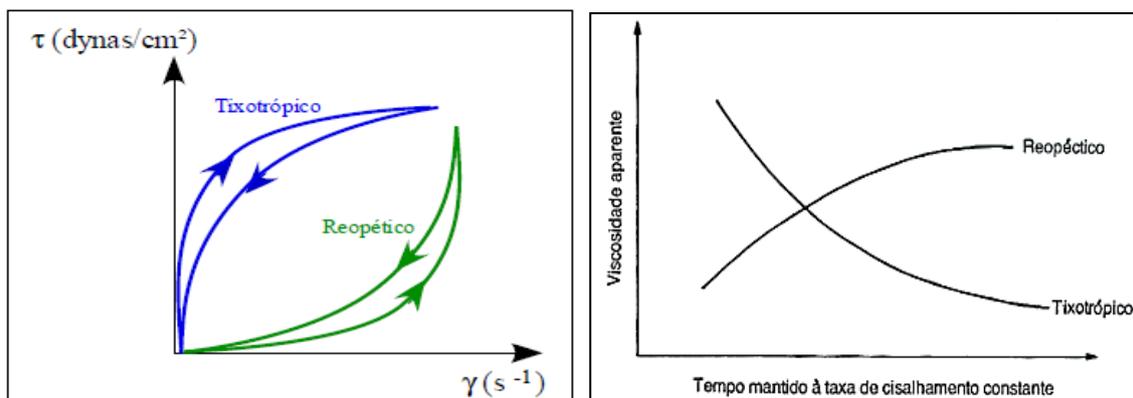
Existe também o fluido chamado de pseudoplástico ou “*shear-thinning*” (cisalhamento fino), no qual é um fenômeno independente do tempo e neste caso, ocorre quando há um decréscimo na viscosidade com aumento da taxa de cisalhamento (Figura 4). Conforme é descrito por Brydson (1988), a pseudoplasticidade ocorrerá com maior frequência em polímeros no estado fundido ou borrachoso, em petróleo, espalhamento

rápido de tintas e espumas em escoamento descontrolado de pastas. Este comportamento pseudoplástico pode ser explicado em partículas assimétricas, que repouso que estão orientadas de forma aleatória e bem próximas uma das outras. Quando se aplica uma força nestas partículas elas começam a fluir em uma direção, assumindo uma orientação preferencial na direção do escoamento, reduzindo assim, sua resistência ao escoamento. Em sistemas poliméricos no estado fundido passam de uma estrutura altamente emaranhada no repouso, para uma altamente orientada e desemaranhada na direção do escoamento e de uma forma linear (BRYDSON, 1988).

Outro comportamento que se observa em um fluido não newtoniano é chamado de dilatante ou “*Shear-Thickening*” (Cisalhamento Espesso). Neste caso, há um aumento na viscosidade com aumento da taxa de cisalhamento, conforme foi mostrado na Figura 4. De acordo com o trabalho descrito por Lessa (2008), as principais causas desse comportamento é a formação de uma estrutura organizada do sistema e através da orientação de partículas assimétricas na direção do escoamento provocadas pelo gradiente de velocidade.

Existem outras características que são bastante importantes no comportamento de um fluido não newtoniano, uma vez que a estabilidade do material e o quanto ele pode ser recuperado em relação às propriedades tixotrópicas, dependentes do tempo, conforme ilustrada na Figura 5.

Figura 5- Curva de escoamento de fluido não-newtonianos de propriedades dependentes do tempo de cisalhamento. Fonte: (SKELLAND,1967).



Um fluido é considerado tixotrópico, quando possui um comportamento temporário (Figura 5), ou seja, quando ocorre um decréscimo da viscosidade aparente com o tempo, sob a taxa de cisalhamento ou a tensão de cisalhamento constante,

seguido de uma gradual recuperação quando um deles é removido (BARNES,1989). Um fenômeno que ocorre em um fluido é a criação de uma estrutura em rede tridimensional, suportada por ligações iônicas e ligações de hidrogênio, denominada de gel, que é a responsável pela elevação da viscosidade do fluido tixotrópico, em repouso ou a baixas taxas de cisalhamento, ocorrendo devido a uma complexa interação entre as partículas/moléculas, pois esta estrutura pode ser facilmente rompida, quando a dispersão é cisalhada por um longo período de tempo, uma vez que essas ligações atrativas são fracas. Apesar disso, elas podem recuperar sua fluidez, retornando ao estado chamado sol, neste caso, a viscosidade cai assintoticamente, alcançando o mais baixo valor para uma taxa de cisalhamento constante, quando submetidas a condições dinâmicas, caracterizando a tixotropia como um fenômeno isotérmico e reversível (MACHADO, 2002).

Outro comportamento que o fluido pode apresentar é a reopexia, chamada também de anti-tixotrópico ou tixotropia negativa. Neste caso, há um acréscimo na viscosidade aparente com o tempo sobre a taxa de cisalhamento ou a tensão de cisalhamento constante, seguido de uma recuperação gradual quando a taxa ou a tensão é removida (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1989) (Figura 5).

Dando continuidade sobre a classificação reológica de um material, pode-se mencionar o comportamento de um sólido com características elásticas, neste caso, o material volta a sua forma original ao retirar uma força aplicada. Em 1678, Robert Hooke, a partir da teoria verdadeira da elasticidade, descreveu o comportamento mecânico ideal utilizando equação constitutiva na qual sua hipótese pode ser definida através da constante de proporcionalidade entre a tensão e a deformação expressa por:

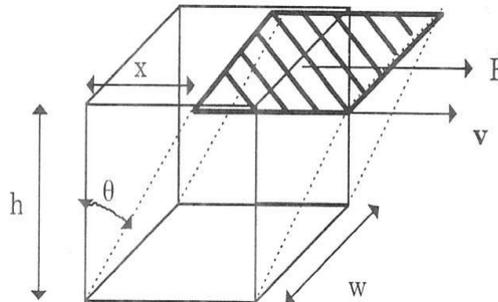
$$\mathbf{E} = \frac{\boldsymbol{\sigma}}{\boldsymbol{\varepsilon}} \quad (5)$$

Onde: \mathbf{E} = Módulo elástico; $\boldsymbol{\sigma}$ = tensão; $\boldsymbol{\varepsilon}$ = deformação.

Ainda neste contexto, de acordo com a equação que descreve a Lei de Hooke e considerando as forças suficientemente pequenas, quando se aplica um esforço de cisalhamento, pode-se relacionar a tensão de cisalhamento com uma força aplicada paralelamente a uma superfície, com o objetivo de causar o deslizamento de planos

paralelos uns em relação aos outros, podendo ser chamado de módulo de cisalhamento (Figura 6).

Figura 6- Deformação sob cisalhamento num sólido cúbico. Fonte: (NAVARRO, 1997).



Neste caso, a deformação de cisalhamento, γ , pode ser calculada pela tangente do ângulo θ , como é apresentado na Figura 6 e mostrado na equação 6 (NAVARRO, 1997).

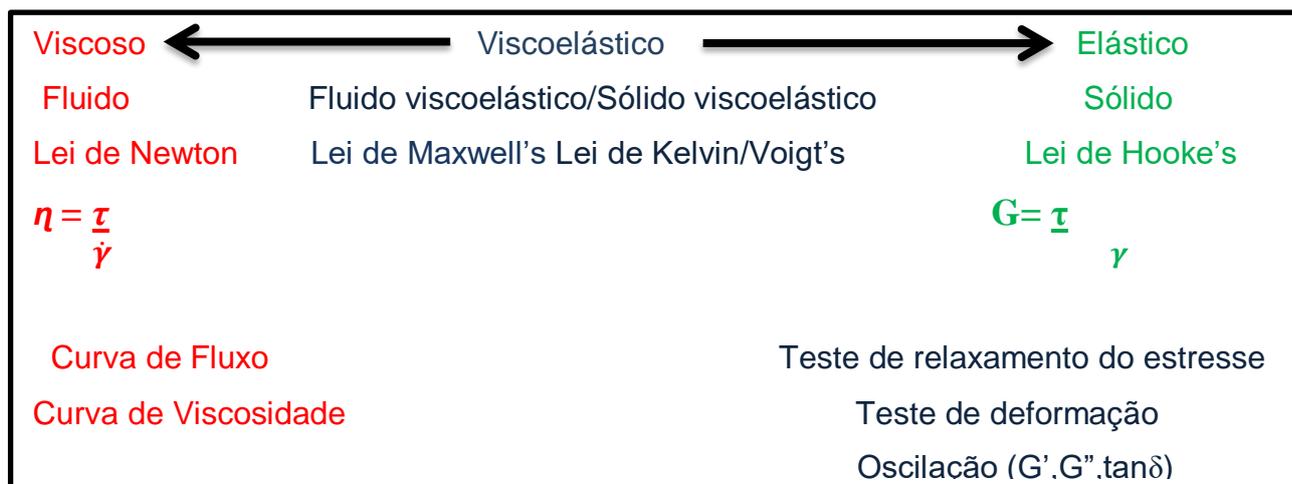
$$G = \frac{\tau}{\gamma} \quad (6)$$

Onde: G = Módulo de cisalhamento ou rigidez; τ : tensão de cisalhamento e γ : deformação elástica de cisalhamento do corpo de prova (adimensional) pode ser a $\text{tg } \theta = x/h$.

Os fluidos não newtonianos ainda podem ser classificados em viscoelásticos. A viscoelasticidade é um fenômeno dependente do tempo e só ocorre em sistemas poliméricos no estado sólido, fundidos ou em solução, estes materiais viscoelásticos (VE) apresentam comportamento viscoso e elástico simultaneamente. Considera-se a parte viscosa ou irreversível em sistema que se comporta de acordo com a Lei de Newton, a parte elástica ou reversível são sistemas que se aplica à Lei de Hooke.

Os fluidos que possuem características de líquidos viscosos com propriedades elásticas (Modelo de Maxwell) ou sólidos com propriedades viscosas (Modelo de Kelvin-Voigt) são materiais que possuem propriedades elásticas e viscosas ligadas como é apresentado no Esquema 1 abaixo.

Esquema 1- Comportamento de líquidos e sólidos viscoelásticos.

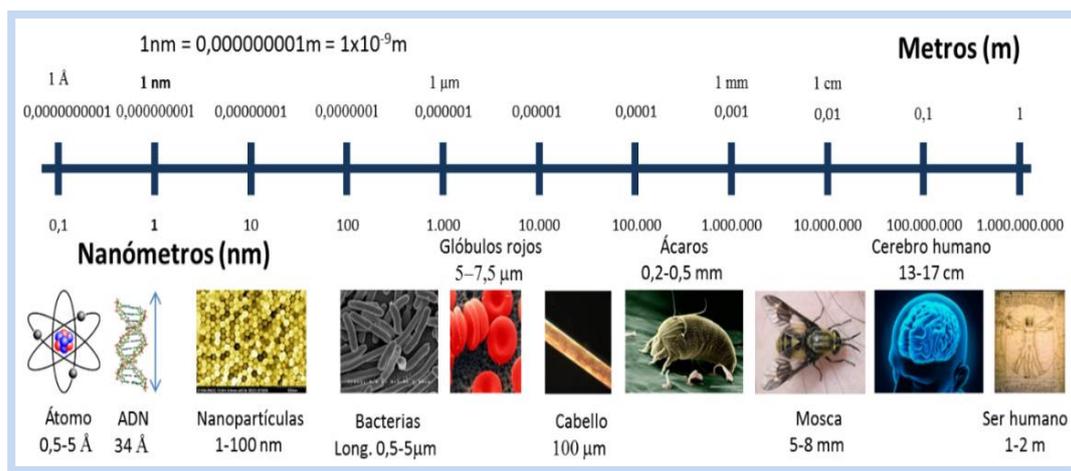


Algumas características dos materiais poliméricos podem ser encontradas através da sua massa, pois pode ser vista no seu estado não deformado, constituída de cadeias enoveladas ou emaranhadas, quando esta estrutura é sujeita a uma tensão constante, as moléculas exercem uma resposta retrativa a esta tensão para manter sua conformação mais estável emaranhada. Quando existe uma influência contínua da tensão aplicada com o tempo, as cadeias da estrutura deslizam umas em relação às outras. Portanto, a estrutura emaranhada é deformada, passando para uma conformação alongada e desemaranhada (CALLISTER, 2013; NAVARRO, 1997).

1.2.5 Nanotecnologia e nanomateriais

A nanotecnologia é a ciência que visa à aplicação do conhecimento científico para manipular e controlar os materiais, essencialmente em nanoescala e fazer uso de propriedades dependentes do tamanho, estrutura e fenômenos distintos associados a átomos, moléculas individuais e macromoléculas. De acordo com ISO/TR 10993-22, o termo nanoescala é definido como o comprimento das estruturas com medidas variando aproximadamente entre 1 e 100 nm, conforme apresentado na Figura 7 e 8.

Figura 7- Escala nanométrica de diversos tipos de materiais. Fonte: (LAURA, 2016). <http://elfaronanotec.blogspot.com.br/2016/10/que-es-la-nanotecnologia-el-tamano-si.html>



No entanto, de acordo com a definição para *European Union (EU)*, o nome nanomaterial, significa um material natural, incidental ou fabricado que contém partículas, em um estado não ligado, como agregado ou como aglomerado e para 50% ou mais das dimensões externas inserida no tamanho de medida entre 1 e 100 nm (ISO, 2016).

As nanopartículas são nanomaterias com toda a dimensão externa em escala nonometrica. É um material discreto com uma, duas ou três dimensões. Existem também as nanofibras, que são nanomateriais, com duas dimensões externas em nanoescala e a terceira dimensão significativamente maior e os nanobastões que são considerados nanofibras sólidas (ISO, 2016).

A funcionalidade é uma das características mais importantes dos nanomateriais, devido a sua capacidade de executar funções específicas como, por exemplo, funções químico-biológicas de forma controlada e pré-determinada (TOMA, 2004). Esses nanomaterias funcionalizados possuem grande importância na aplicação em síntese de colóides, processos fotoquímicos, desenvolvimento de sensores e dispositivos eletrônicos, aplicações médicas, obtenção de novos fármacos e no controle ambiental (TANSIL, 2006).

A partir das partículas únicas de tamanho nanométrico podem ser formados os clusters, que são definidos por uma coleção de partículas reativas. Neste caso, eles podem ser subdivididos em agregados e aglomerados. Os agregados são partículas nas quais as forças que as mantêm em conjunto são forças fortes, através das ligações covalentes ou resultantes de sinterização. Nos aglomerados, nas partículas, forças fracas são aplicadas, como as de van der Waals, ou simples emaranhados físicos e desta forma,

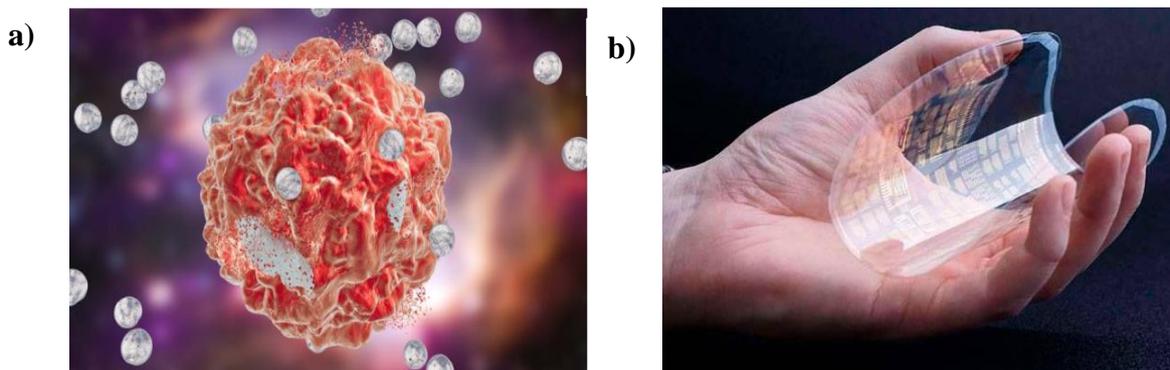
tanto para os agregados quanto para os aglomerados são chamados de “partículas secundárias” e as partículas originais são denominadas “partículas primárias” (ISO, 2016; RAUSCHER et al., 2015).

Para a obtenção de diversos nanomateriais a partir das nanopartículas são necessárias diferentes sínteses e podem ser obtidas a partir de duas abordagens. Uma abordagem chamada descendente que trata da redução do tamanho do material, forma, propriedades físico-químicas gerais das partículas e estrutura de superfície, através do processo físico e químico para produzir nanopartículas e técnica como a de deposição física de vapor (MEYERS, MISHRA, BENSON, 2006; IRAVANI, 2011). Como exemplo, para a abordagem descendente, temos o trabalho de Priyadarshana e colaboradores (2015), que revelou a síntese esférica de NP de magnetita a partir de minério natural de óxido de ferro (Fe_2O_3) por método destrutivo levando a um tamanho de partícula em torno de 20 e 50 nm na presença de ácido oleico.

Na abordagem ascendente as NPs são formadas a partir de substâncias relativamente mais simples, chamada também de abordagem de construção, pois temos a sedimentação, técnicas de redução, sol-gel, síntese verde, fiação e síntese bioquímica (IRAVANI, 2011).

Um exemplo bem recente é reportado por Needham et al., (2016), que apresenta uma técnica de troca de solventes usado para obtenção de NPs de lipoproteína de baixa densidade de tamanho reduzido (LDL). Neste método, inicialmente a nucleação é seguida pelo crescimento. Estas NPs LDL foram obtidas sem usar fosfolipídios e possuem alta hidrofobicidade, com a finalidade essencial nas aplicações de entrega de drogas, para o tratamento de câncer. Com isso, os nanomateriais, vem ganhando grande importância no desenvolvimento científico atual devido ao fato de encontrar e obter ótimas propriedades: químicas, biológicas, magnéticas, eletrônicas, ópticas, térmicas, mecânicas e catalíticas e diversas áreas de aplicações como: engenharia de tecido, dentística, nanomedicina, biomédica, cosmética, alimentícias, conversão de energia solar, engenharia civil e ciências ambientais (Figura 8).

Figura 8- a) Nanopartícula de ouro no tratamento contra o câncer; b) Folha plana de grafeno. **Fonte:** <http://pt.chinananomaterial.com/info/the-biological-mechanisms-of-gold-nanoparticle> Guangdong Nanhai ETEB Technology Co., Ltd. (2017). <https://megaarquivo.wordpress.com,/grafeno-o-material-do-futuro>.

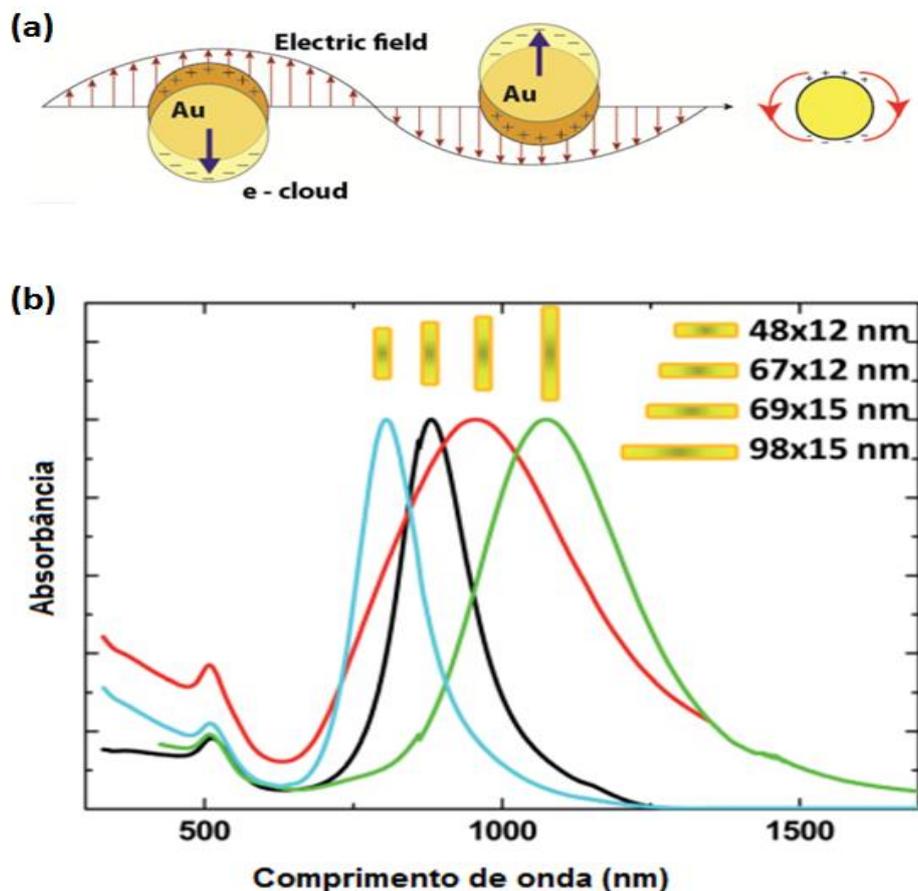


1.2.6 Nanobastões de ouro

As propriedades químicas e físicas das nanopartículas de ouro (NPsAu) estão diretamente relacionadas com fatores como o tamanho, composição e forma. Quanto às suas propriedades ópticas, as NPsAu apresentam o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (SPR) (Figura 9a), que é explicada pela oscilação de elétrons livres ao longo de uma superfície metálica. Quando a luz interage com a sua superfície, a oscilação do componente elétrico da radiação promove uma oscilação simultânea dos elétrons. Uma vez que a radiação eletromagnética é incidida na frequência do plasmon ressonante de forma continuada, as nanopartículas absorvem energia e geram calor. Entre as diferentes nanopartículas de ouro não esféricas, os nanobastões de ouro (NBsAu) têm atraído uma grande atenção em virtude do grande número disponível de métodos de síntese, da alta monodispersidade e o controle racional sobre a relação de aspecto, que é principalmente responsável pela mudança em suas propriedades ópticas (JAQUE et al., 2014).

Recentemente, alguns pesquisadores vêm demonstrando interesse por nanobastões de ouro (NBsAu), devido a sua forte banda SPR na região visível, IR e oscilações de elétrons em duas direções (dependente da polarização da luz incidente: eixos curto e longo), sendo uma banda em torno de 520 nm (± 10 nm) atribuída a ressonância de plasma de superfície transversal (TSPR) e a outra ressonância de plasma de superfície longitudinal (LSPR), na qual a banda em torno de (650-1300 nm) de absorção na superfície longitudinal é maior quando comparada com a transversal (Figura 9.b) (HUANG, NERETINA, EL-SAYED, 2009; KOZEK et al., 2013).

Figura 9- (a) Esquema ilustrativo do fenômeno de ressonância plasmônica de superfície. Fonte: (BAYAZITOGU et al., 2013) (b) Espectros de absorção óptica de nanobastões de ouro com diferentes dimensões (JAQUE et al., 2014).



Por causa das propriedades únicas, a capacidade de síntese em alta qualidade usando solução de forma de cristalização semeada, ajustabilidade de ressonância de plasma variando a razão de aspecto (AR, relação do comprimento a largura do nanobastão de ouro) e da sua excelente biocompatibilidade, os NBsAu são fortes candidatos para aplicações biológicas, biomédicas, terapias fototérmicas e fotodinâmicas (HUANG, NERETINA, EL-SAYED, 2009). Contudo, a escolha por agentes estabilizadores adequados é de extrema importância na obtenção de NBsAu, que sejam estáveis em diferentes condições ambientais (pH e força iônica) e que apresentem baixa toxicidade.

O método mediado por sementes na presença do surfactante brometo cetiltrimetilamônio (CTAB) (como mostra na Figura 10) é o procedimento mais utilizado para obter NBsAu (CHEN et al., 2013). Os rendimentos desta síntese

normalmente atingem 99%, quando utiliza o surfactante CTAB, além disso, a forma e o tamanho dos nanobastões de ouro podem ser adaptados de acordo com a quantidades dos reagentes e temperatura de crescimento. Devido ao processo de síntese, a razão de aspecto dos nanobastões de ouro pode variar de 2,4 a 8,5 (GOLE; MURPHY, 2004; NIKOOBAKHT; EL-SAYED, 2003; CARBO´-ARGIBAY, et al., 2007).

Figura 10- Ilustração esquemática do método mediado por sementes para o crescimento de nanobastão de ouro. **Fonte:** (CHEN et al., 2013).



1.2.7 Atividade antimicrobiana de nanobastões de ouro em matrizes poliméricas

Infecção bacteriana patogênica está se tornando um grande problema para os seres humanos por causar graves doenças infecciosas e devido à resistência dos micro-organismos aos medicamentos emergentes. Pesquisadores vêm buscando alternativas viáveis para encontrar novos agentes antimicrobianos mais eficientes. Um exemplo são as nanopartículas metálicas (NPs), especialmente, as nanopartículas de ouro (NPsAu), pois apresentam excelentes propriedades biológicas, exploradas nos organismos devido a sua biocompatibilidade (BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2008). Ultimamente pesquisadores centraram-se na sua funcionalização, atuando como agentes fototérmicos para matar patógenos hipertermicamente (NORMAN, 2008), desta forma a eficácia da atividade antibacteriana das NPsAu pode ser aprimorada pela adição de antibióticos (BURYGIN, 2009).

As nanopartículas de prata e ouro (tamanho médio de 20 e 27 nm) podem ser incorporadas em diversos polímeros sintéticos, como por exemplo: PU (poliuretano),

PCL (Policaprolactona), PC (Policarbonato), PMMA (Polimetilmetacrilato) e um dos métodos utilizado é o de “*casting*” (que consiste em espalhar a solução formadora do filme em uma superfície lisa e deixar secar). Aplicando-se as bactérias na superfície do filme pode ocorrer ou não a formação das mesmas. A inclusão das nanopartículas de prata e de ouro na matriz polimérica apresentou uma redução no crescimento de organismos, como as proteínas e carboidratos, indicando que os nanocompositos de prata estabeleceram boas propriedades de antibiofilme, em relação ao de ouro e surgem como forte candidato para as aplicações de implantes médicos (SAWANT et al., 2013).

Sabe-se que as NPsAu geram furos na parede celular, resultando na morte das bactérias, isto é possível quando NPsAu se ligam ao DNA das bactérias e inibem o desenrolamento e transcrição do DNA (RAI et al., 2010).

Os nanobastões de ouro (NBsAu) são 20 vezes mais eficientes na absorção óptica do que as NPsAu do mesmo volume (COPLAND et al., 2004) e possuem uma forte afinidade de ligação, permitindo que eles sejam conjugados com várias biomoléculas (LIAO e HAFNER, 2005). Lanh e pesquisadores (2015) reportaram que de acordo com diferentes condições de síntese dos nanobastões de ouro, assim como as morfologias podem mudar significativamente, os NBsAu apresentaram boa atividade antibacteriana frente as bactérias Gram positivas, sendo que os melhores resultados foram obtidos frente as bactérias: *L. monocytogenes* (MIC: 0,0002 µg / mL), *S. aureus* (MIC: 0,0008 µg/mL), *E. coli* (MIC: 0,05 µg/mL), *S. typhimurium* (MIC: 0,2 µg/mL), o efeito antibacteriano foi justificado devido atração eletrostática da carga positiva do ouro e a superfície celular do microorganismo ser carregada negativamente (BINDHU & UMADEVI, 2014).

Pissuwan e colaboradores (2009), sugeriram que os NBsAu conjugados com foto sensibilizadores podem matar o *Staphylococcus aureus* através da radiação fototérmica–NIR. Neste contexto, ainda mais recentemente, alguns dos estudos vêm sendo explorado para investigar as toxicidades de NBsAu usando diferentes células humanas, com a finalidade de observar a citotoxicidade *in vitro* induzida por NBsAu (HARIKIRAN; NARSIMHAREDDY, 2016; YING et al., 2015).

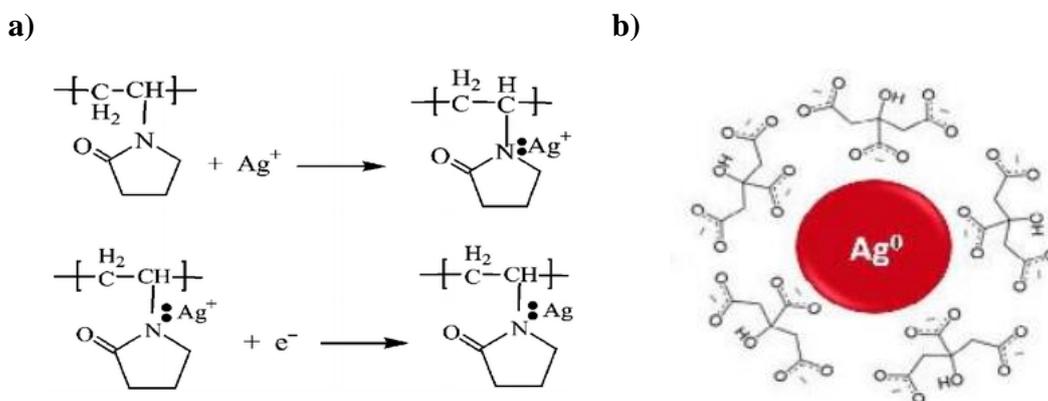
1.2.8 Nanopartículas de prata

Assim como as nanopartículas de ouro, as de prata (NPsAg) exibem propriedades ópticas e eletrônicas interessantes e têm um amplo escopo em ciências biológicas, médicas e biomédicas por suas cores brilhantes, propriedades fisico-químicas e atividade antimicrobiana (DAS; VELUSAMY, 2014; VELUSAMY et al., 2015; YANG; PAN, 2012; ESCOSURA-MUNIZ, et al., 2009).

Em princípio, a síntese de (NPsAg), envolve a redução de um sal de prata com um agente redutor na presença de um estabilizador que previne a agregação de NPs. Geralmente são usados redutores químicos, como por exemplo, citrato de sódio ou borohidreto de sódio (MULFINGER et al., 2007; e um dos agentes estabilizadores que podem inserir durante o processo de síntese de nanopartícula coloidal de prata é o polímero polivinilpirrolidona (PVP), considerado bom agente eletroestéricos, e também evita a aglomeração das NPsAg (ZHANG; ZHAO; HU, 1996; KOMARNENI et al., 2004) (Figura 11a-b).

Para controlar e estabilizar as estruturas de nanopartículas, recentemente vem utilizando muitos materiais, como os polímeros naturais, incluindo os polissacarídeos, surfactantes, dendrímeros, e modelos biológicos (VIMALA et al., 2009). Segundo levantamento feito da literatura, existe uma crescente em síntese de NPsAg, através do desenvolvimento de processos ecologicamente "verdes" usando biopolímeros como modelos para a síntese, bem como, visando uma boa estabilização ganhando impulso devido à sua excelente biocompatibilidade e (BOZANIC et al., 2011) biodegradabilidade (MADHUSUDANA, et al., 2014; SIRAJ et al., 2013).

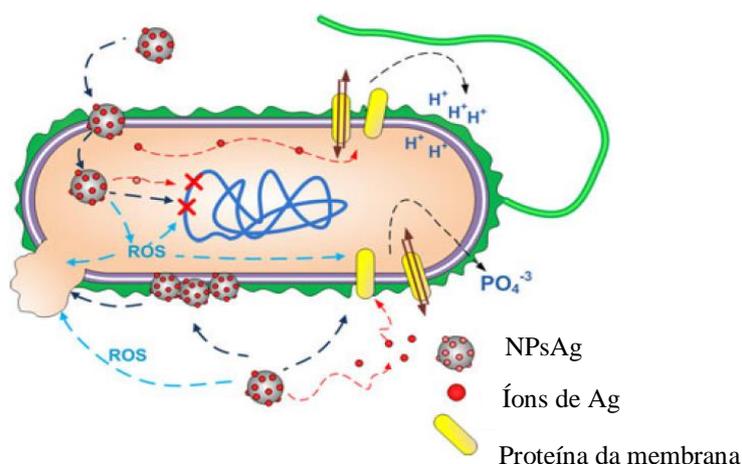
Figura 11- a) Reação entre Poli vinil pirrolidona (PVP) e Ag; b) Mecanismo de obtenção das NPsAg, através dos íons citrato. **Fonte adaptada de:** MIRZAEI et al.,2017; HO et al.,2016.



1.2.9 Atividade antimicrobiana das nanopartícula de prata com matrizes poliméricas

Das diversas nanopartículas metálicas, as nanopartículas de prata (NPsAg), mostram excelentes propriedades antimicrobianas contra uma ampla variedade de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*), Gram negativas (como exemplos, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e fungos como (*Candida albicans*). Os íons de prata realizam diminuições notáveis no crescimento microbiano em concentrações muito baixas e pelo fato de que o mecanismo que causa este impacto ainda não foi totalmente elucidado. Os três mecanismos mais comuns de toxicidade proposta até o momento são: (1) absorção de íons de prata livre, seguidas de perturbação da produção de ATP e replicação de DNA, (2) nanopartículas de prata e íons prata atuam na geração de ROS, e (3) nanopartículas de prata causam danos diretos às membranas celulares de bactérias, conforme ilustrada na (Figura 12) (MARANBIO-JONES; HOEK; 2010). Pesquisadores afirmam também que a citotoxicidade das nanopartículas de prata está relacionada aos mecanismos devido à produção de muitos radicais livres que afetam o alto estresse oxidativo, distúrbios da integridade da membrana celular, ligação de proteína ou DNA e danos ao material genético (SIRAJ et al., 2013).

Figura 12- Diagrama resumindo a interação das Nanopartículas de prata com células bacterianas. **Fonte:** (DAMM; MÜNSTEDT; RÖSCH, 2008; Neal, 2008).



Recentemente, as propriedades encontradas para as (NPsAg), são atualizadas através da tecnologia por diferentes métodos, permitindo que a extensão das

nanopartículas fosse reproduzida de forma modular e precisa, tendo em mente o objetivo final para melhorar a estabilidade das emulsões coloidais. Além disso, uma liberação controlada das NPsAg, adquirindo uma atividade antimicrobiana, com a capacidade de inibir o desenvolvimento de micro-organismos a longo prazo, reduzindo impactos não satisfatório (VELUSAMY et al., 2016).

Alguns polissacarídeos possuem atividade antimicrobiana, incluindo o biopolímero natural, a quitosana. A quitosana pode ser processada de formas e tamanhos diferentes, tais como em: filmes, microesferas, nanopartículas, membranas porosas e *scaffolds*, além disso a quitosana também tem sido usada em campos médicos, como cicatrização de feridas, engenharia de tecidos e entrega de drogas (KUMAR, 2000).

Estudos a respeito de um método 'verde' para sintetizar NPsAg utilizando a quitosana, como um agente redutor e estabilizador, obtiveram resultados satisfatórios na sua aplicação como agente antibacteriano (SANPUI et al., 2008;TRAVAN et al., 2009).

Stojkowska e colaboradores (2014) propuseram em seu estudo que a partir de microesferas de alginato de cálcio contendo com NPsAg podem atuar na aplicações biomédicas, com a finalidade de tratamentos de feridas.

Estudo recente, descrito por Su e colaboradores (2017), avaliaram a eficácia da atividade antibacteriana de tecidos de algodão tratados com nanopartículas de prata e alginato de sódio contra diferentes patógenos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), com a ideia de aplicação em diferentes campos como na área de têxteis e médicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de hidrogéis a partir de alginato de sódio associados às nanopartículas de prata e nanobastões de ouro com propriedades antimicrobianas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter hidrogéis de alginato de sódio puro, Alg nas concentrações de massa 4%,6% e 8%;

Obter hidrogéis de alginato de sódio contendo nanobastões de ouro (NBsAu@Alg), nanopartícula de prata (NPsAg@Alg) e nanobastões de ouro mais nanopartícula de prata (NBsAu+NPsAg)@Alg, nas concentrações de massa do alginato de: 4%,6% e 8%;

Análise Reológica dos hidrogéis;

Caracterizar os hidrogéis por: UV-Vis-NIR, DRX, FT-IR, TGA, DSC, MEV e TEM;

Avaliar a atividade antimicrobiana dos hidrogéis.

3 EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados nos laboratórios BSTR – Malta/Giba do Departamento de Química Fundamental, Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE e Laboratório de Pesquisa em Materiais Híbridos (LPMH), Departamento de Química da UFS. Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética UFPE.

3.1 REAGENTES

Todos os procedimentos foram realizados usando reagentes de grau analítico adquiridos comercialmente sem purificação prévia listados na Tabela 1.

Tabela 1- Reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais.

	Composição	Procedência	Pureza
Ácido ascórbico	$C_6H_8O_6$	Sigma-Aldrich	99%
Ácido cloroáurico	$HAuCl_4$	Sigma-Aldrich	99,999%
Alginato de sódio ^a	$C_6H_7O_6Na$	Sigma-Aldrich	-
Ácido sulfúrico	H_2SO_4	Micro-Química	98%
Boroidreto de sódio	$NaBH_4$	Sigma-Aldrich	98%
Citrato de sódio	$Na_3C_6H_5O_7$	Sigma-Aldrich	99%
CTAB	$((C_{16}H_{33})N(CH_3))_3Br$	Sigma-Aldrich	99%
Nitrato de prata	$AgNO_3$	Sigma-Aldrich	99%
Polivinilpirrolidona (PVP)	$(C_6H_9NO)_n$	Sigma-Aldrich	-

^a massa molar (MW) = 100.000 g/mol e aproximadamente 61% de ácido manurônico e 39% de ácido gulurônico, com uma relação M/G de 1,56).

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Preparação dos nanobastões de ouro

1^a etapa: Crescimento da semente

Inicialmente, com auxílio de um pipetador automático, 250 μ L de uma solução a 10 mM de $HAuCl_4$ foram adicionadas a 7,5 mL da solução 0,1M de CTAB em um

béquer de 100 mL, mantida sob agitação magnética por cinco minutos. Após este tempo, com auxílio de uma pipeta automática adicionou-se 600 μL de uma solução a 0,01M de NaBH_4 e deixou sob agitação contínua por um minuto (LANH et al., 2015).

2ª etapa: Crescimento dos nanobastões de ouro

Inicialmente, utilizando pipeta automática 5mL da solução do HAuCl_4 , 2mL da solução a 0,5M de H_2SO_4 , 1ml da solução de AgNO_3 a 10mM e 0,8mL da solução a 0,1M de ácido ascórbico, foram adicionadas em 100 mL de CTAB em um béquer de 200mL e mantidas sob agitação, até mudar a coloração para incolor. Em seguida, pipetou 240 μL da solução semente realizada na 1ª etapa e adicionou na 2ª etapa (crescimento dos nanobastões de ouro) deixando em repouso por 12 horas, onde a suspensão final foi lavada duas vezes com água destilada através de uma centrifuga (LANH et al., 2015).

3.2.2 Preparação das nanopartículas coloidais de prata

Inicialmente, foram aquecidos 125 mL da solução de nitrato de prata (AgNO_3) de 1mM (mol.L^{-1}) em um erlenmeyer até ocorrer a ebulição. Em seguida, utilizando pipeta de pasteur, adicionou-se 5 mL do agente redutor, citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), solução a 1% na velocidade de uma gota por segundo. A solução foi mantida em ebulição até ocorrer a transição de cor para amarelo pálido. Esta coloração é indicio da formação das nanopartículas. O erlenmeyer foi mantido sob a chapa de aquecimento após seu desligamento por cerca de um minuto até a solução atingir a coloração amarelo. Em seguida, a mesma foi arrefecida lentamente sob agitação em um banho a temperatura de 20°C até que a solução atinja temperatura ambiente igual a 25°C, (LEE & MEISEL, 1982; TURKEVICH et al.,1951).

3.2.3 Preparação para o fluido coloidal e os hidrogéis a base do alginato de sódio

Inicialmente o fluido de alginato foi produzido a partir da hidratação do pó de alginato de sódio, em um béquer, a uma proporção de 2% (m/v). Para facilitar a hidratação do pó, ele foi misturado ao equivalente, em massa, de álcool etílico absoluto. Em seguida, esta mistura foi adicionada à água ultrapura estéril, sob agitação vigorosa, com o auxílio de um agitador magnético (Fisatom 752A), com aquecimento a 40°C e com as seguintes modificações seguindo metodologia descrita por Rassa e colaboradores (2016).

Para preparar o hidrogéis de alginato de sódio nas concentrações de 4%, 6%, 8% na relação (massa/volume), seguiu a mesma metodologia citada anteriormente com adaptações. Inicialmente uma quantidade do pó (0,4g, 0,6g e 0,8g) em 10 mL de água deionizada, em seguida esta mistura ficou, sob agitação vigorosa, com o auxílio de um agitador magnético (Fisatom 752A) com aquecimento a temperatura a 40°C (RASSU et al., 2016)

3.2.4 Preparação para os hidrogéis de alginato de sódio com os nanobastão de ouro

Foram realizados experimentos com alginato com os nanobastões de ouro nas concentrações de 4%, 6%, 8% na relação (massa/volume) sendo 0,4, 0,6 e 0,8g de alginato em 10 mL de nanobastões de ouro.

3.2.5 Preparação para o fluido coloidal e hidrogéis de alginato de sódio com nanopartículas de prata

Inicialmente para obter um fluido coloidal formado do alginato com nanopartículas de prata na concentração a 2% (massa/volume), foi realizada a partir da hidratação de 2g do pó de alginato em 80 mL de água ultrapura estéril, com 20 mL da solução de nanopartículas.

Para os hidrogéis, foram realizados experimentos com alginato de sódio e com nanopartícula de prata na concentração de 4,6 e 8%, na relação (massa/volume) e 0,4, 0,6 e 0,8g de alginato em 10 mL de nanopartícula de prata.

3.2.6 Preparação para os hidrogéis de alginato de sódio com nanobastão de ouro e nanopartícula de prata

Foram realizados experimentos com alginato de sódio, nanobastão de ouro e nanopartícula de prata numa concentração de alginato de sódio em 4, 6 e 8%, para uma relação de 0,4, 0,6 e 0,8g de Alg e 10 mL sendo o volume total (5 mL de nanobastão de ouro + 5 mL de nanopartícula de prata).

3.3 CARACTERIZAÇÃO

3.3.1 Reologia

As medidas reológicas foram realizadas à temperatura de 25°C em um Reômetro de tensão controlada, modelo DHR da TA *Instruments*, com geometria placa-placa,

sendo a placa de aço inoxidável, com diâmetro de 40 mm e espaçamento de 100 μm entre as placas. As amostras foram cuidadosamente aplicadas na placa inferior do reômetro, assegurando o mínimo de perturbação do sistema e tempo de estabilização de 2 minutos antes da análise. Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada amostra. O ensaio de escoamento foi realizado variando a velocidade de cisalhamento de 0 a 200 s^{-1} . As medidas reológicas dinâmicas oscilatória foi realizado no modo de varredura de frequência, em que a tensão (τ) aplicada era constante 0,4 Pa no domínio da região viscoelástica linear e a frequência de oscilação (ω) variou de 0,1 a 100 Hz. Para ajuste das curvas e determinação dos modelos, o *software* gráfico *Origin* foi utilizado. As medidas foram realizadas na Universidade Federal de Sergipe (UFS) no Campus Professor Alberto Carvalho em Itabaiana-SE, no Laboratório de Pesquisa em Materiais Híbridos (LPMH).

3.3.2 Difração de raios-x (DRX)

Os géis foram congelados e liofilizados por 24 horas para obtenção do material seco. Os difratogramas foram obtidos em um difratômetro de raios X (Bruker, modelo D8 Advance), com passo de $0,02^\circ$ e tempo de aquisição de 1 segundo e janela angular de 0° - 90° .

3.3.3 Espectrofotometria uv-visível (UV-VIS)- (NIR)

O equipamento utilizado para obtenção dos espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e infravermelho próximo (NIR), foi o espectrofotômetro UV-Visível do modelo UV-2600 da empresa Shimadzu, operando na faixa de (1400-185 nm), com lâmpada de deutério (D_2) e halogênio tungstênio (WI). O software UV Probe 2.5 foi utilizado para fornecer os comandos operacionais do equipamento e projeção dos resultados. As medidas, para as amostras liofilizadas dos géis foram realizadas utilizando a esfera integradora ISR-2600 Plus, como acessório pelo qual foi possível fazer absorbância e reflectância das amostras utilizando dois detectores. Como as amostras foram sólidas foi utilizado o método de reflectância difusa e logo em seguida utilizou o método Kubelka-Munk para transformar a percentagem de reflectância em absorbância $[F(R)=(1-R)^2/2R]$.

3.3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de fourier (FT-IR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos hidrogéis secos foram obtidos através do método FT-IR com acessório de UATR (Acessório Universal de Amostragem com o braço de pressão). O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro com transformada de Fourier da Perkin Elmer (modelo: Spectrum 400, N° de série: 82287) na região entre 4000 e 400 cm^{-1} . A resolução espectral foi de 2 cm^{-1} e 64 acumulações. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Combustíveis (LAC) do Departamento de Engenharia Química da UFPE.

3.3.5 Análise termogravimétrica (TGA)

As medidas de avaliação da estabilidade térmica foi determinada via análise termogravimétrica em um analisador termogravimétrico da Shimadzu, modelo TGA 60/60H utilizando porta amostra de alumina, fluxo de 50 mL/min de N_2 com taxa de aquecimento de 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 500 $^{\circ}\text{C}$. As medidas foram realizadas no Laboratório de Terras Raras (BRTR-Giba) do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

3.3.6 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Curvas de fluxo de calor foram obtidas em um calorímetro diferencial de varredura, modelo 1 Star^{*system} (Mettler Toledo) sob atmosfera de nitrogênio. Com aquecimento de 0 $^{\circ}\text{C}$ a 300 $^{\circ}\text{C}$, com taxa de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e fluxo de gás 50 milímetros por minutos (50 mL/min).

3.3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das amostras de NPsAg coloidais foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente fixadas a um pedaço de fita adesiva dupla face de carbono apoiada sobre um suporte metálico. As imagens de MEV para as amostras de NPsAg foram obtidas no Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), usando um microscópio da Tescan, modelo Mira 3, com voltagem de 10 kV.

3.3.8 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A morfologia das amostras dos NBsAu foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A imagem de TEM para as amostras de NBsAu foram obtidas

no departamento de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG), usando um microscópio eletrônico da marca Jeol, modelo JEM-2100, com voltagem de 200 kV.

3.3.9 Atividade antimicrobiana

3.3.9.1 Preparo do inóculo

Foram utilizadas cepas bacterianas provenientes das bateriotecas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e cepas de referência como as ATCCs cedidas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Para tanto, procedeu-se a reativação das bactérias por cultivo em ágar sangue de carneiro a 8% e incubação a 37°C por 24 horas. Em seguida, procedeu-se o preparo dos inóculos, suspendendo uma colônia bacteriana de cada cepa em tubos de ensaio separados, contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion), padronizando as soluções para 0,5 na escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL).

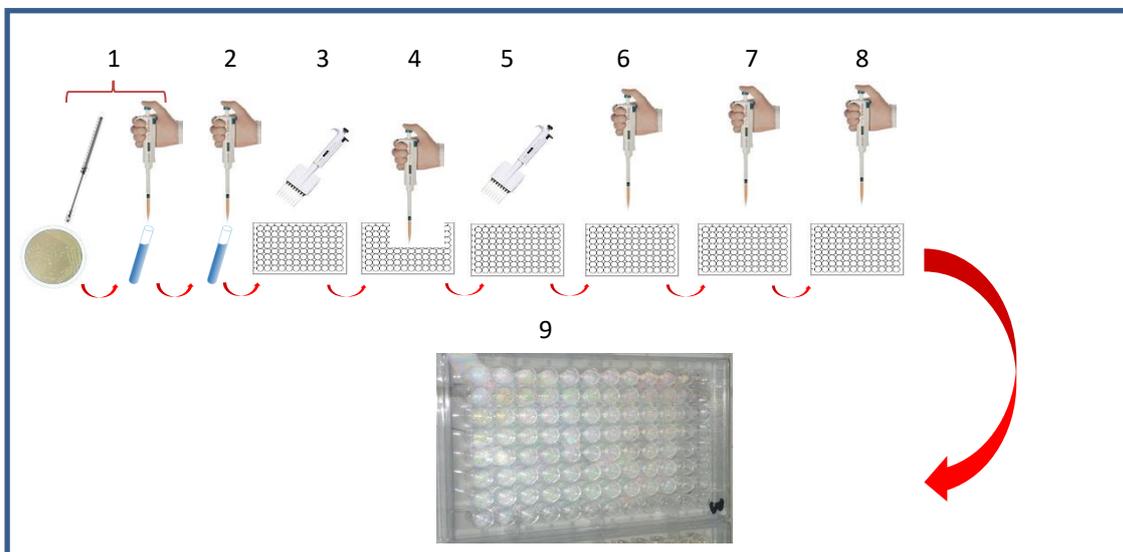
3.3.9.2 Protocolo para Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Inicialmente, foram preparadas soluções mãe dos hidrogéis (Alg, NBsAu@Alg; NPsAg@Alg, (NBsAu+NPsAg@Alg), de modo que todos estivessem na concentração de 2%. Para os NBsAu e NPsAg as concentrações foram (2,1 e 3,9%, respectivamente). Em seguida, procedeu-se a distribuição de 100 µl de caldo Mueller Hinton (MH) em todos os poços da placa de microdiluição. Posteriormente, aplicaram-se 100 µl das soluções mãe no primeiro poço da placa, realizando diluições seriadas, de modo a se obter 6 concentrações diferentes dos hidrogéis (1 a 0.0313%). 100 µl da solução equivalente à última diluição foram descartados para padronização dos volumes. Um dos poços foi mantido apenas com o caldo Muller Hinton para verificar esterilidade do meio e das placas e um outro poço sem a adição dos hidrogéis foi inoculado com a bactéria para verificar viabilidade do micro-organismo. Na sequência, os demais poços foram inoculados com 5 µl da solução de bactérias preparada previamente, conforme ilustrado na Figura 13.

Após esses procedimentos, as placas foram incubadas fechadas, a 37°C por 24 horas, realizando-se a leitura de densidade óptica com comprimento de onda de 620 nm, sendo considerada como concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração dos hidrogéis capaz de inibir o crescimento bacteriano quando comparados aos poços

controle, onde não foi adicionado hidrogéis. Todos estes testes foram realizados em triplicata.

Figura 13- Ilustração do procedimento da microdiluição seriada e placa Elisa, para realização do experimento para CIM (Concentração Inibitória Mínima). Fonte: Autor



- 1 – Preparação suspensão direta;
- 2 – Padronização da suspensão para a escala de McFarland 0,5;
- 3 – Adição do meio de cultura;
- 4 – Adição da substância teste aos poços;
- 5 – Realização da microdiluição seriada;
- 6 – Preparar controle positivo;
- 7 – Preparar controle do solvente;
- 8 – Adicionar a suspensão de microrganismos em todos os poços;
- 9 – Realização da leitura da placa.

3.3.9.3 Protocolo para Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a leitura óptica, 10 µl de cada poço foram repicados para placas contendo Agar Muller Hinton com a finalidade de observar o crescimento bacteriano, determinando como concentração bactericida mínima (CBM) a menor concentração dos géis onde não houve nenhum crescimento bacteriano visível.

3.3.9.4 Protocolo da técnica difusão em poço

Foi utilizada uma técnica de disco-difusão adaptado de Kirby-Bauer, 1966. Onde inicialmente, partindo das concentrações de (4 e 8%) para os hidrogéis (Alg, NBsAu@Alg; NPsAg@Alg, (NBsAu+NPsAg)@Alg. E para os NBsAu e NPsAg as concentrações foram (2,1 e 3,9%, respectivamente).

Inicialmente, meio de cultura Muller Hintor ágar são distribuídos em placas de petri, depois soluções bacterianas foram espalhadas uniformemente. Em seguida,

procedeu-se a distribuição de aproximadamente 30 μ l de todos os hidrogéis e soluções dos nanobastões de ouro e nanopartículas de prata, em todos os poços feitos na placa de petri, conforme apresentada na Figura 14. Após esses procedimentos, as placas foram incubadas, fechadas a 37°C por 24 horas. As zonas de inibição em torno das amostras foram medidas para comprovar a atividade antimicrobiana. Observação: Utilizou a gentamicina como padrão comparativo.

Figura 14- Ilustração do procedimento para o experimento da técnica difusão em poço. Fonte: Autor.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

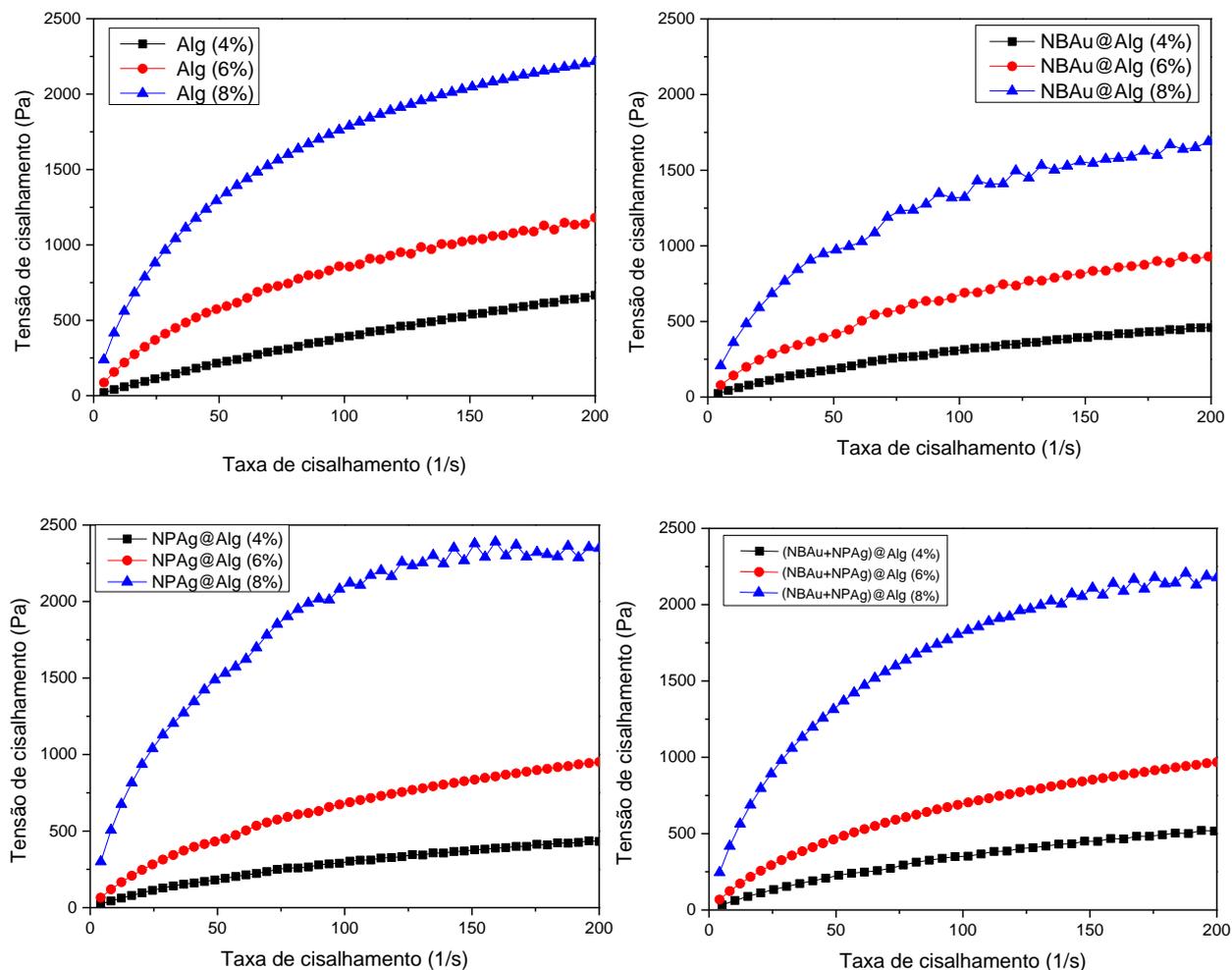
4.1 PROPRIEDADES REOLÓGICAS DOS HIDROGÉIS A BASE DE ALGINATO DE SÓDIO

4.1.1 Propriedades reológicas de acordo com teste rotacional

Os hidrogéis a base de alginato de sódio nas concentrações de 4%, 6% e 8%, mostraram diferentes comportamentos. Inicialmente, realizaram-se os experimentos através do método rotacional (método de escoamento), para as matrizes de alginato de sódio, com nanobastão de ouro, nanopartícula de prata e nanobastões de ouro mais nanopartícula de prata. Os resultados obtidos são expostos na Figura 15, para os hidrogéis de Alg, NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg, nas concentrações (4, 6 e 8% de alginato). Houve um aumento da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação, assim que aumentou a concentração em todas as análises, pelo fato do alginato de sódio ser considerado amorfo vai existir um maior aumento da rede polimérica.

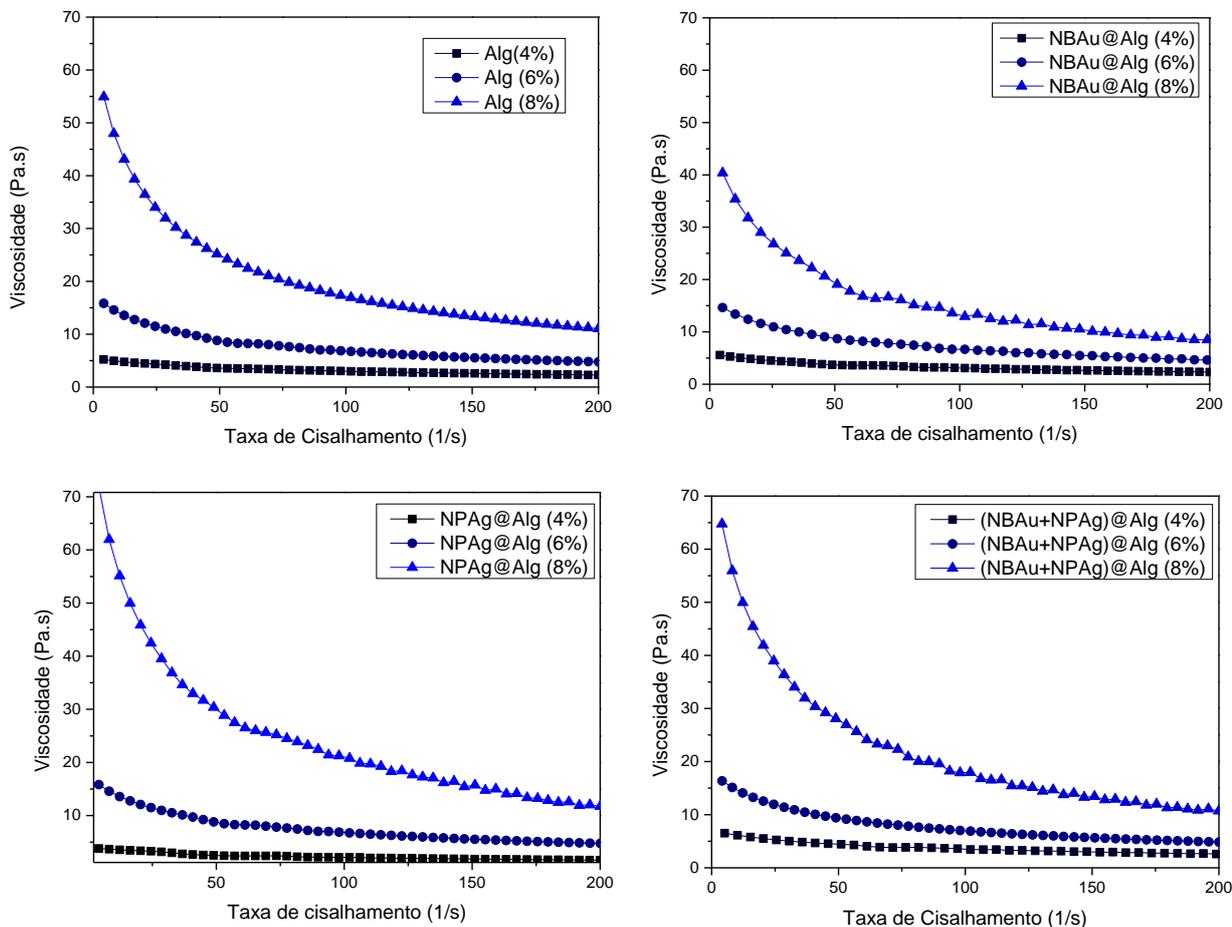
O comportamento de fluxo encontrado é classificado como não newtoniano pseudo-plástico, o que corrobora com estudos anteriores descrito por Ma et., al (2014), Fernández-Farrés e colaboradores (2013), para amostra de alginato de sódio puro e contendo íons de Ca^{+2} . As amostras apresentaram propriedades mais tixotrópicas conforme aumenta a concentração, sugerindo um maior desemaranhamento com o aumento da taxa de cisalhamento. A justificativa para este processo de desemaranhamento- emaranhamento é atribuída ao alinhamento da cadeia polimérica em função da direção do cisalhamento. (BENCHABANE & BEKKOUR (2008).

Figura 15- Curva da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, dos hidrogéis de Alg, NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg em diferentes concentrações de (4%, 6% e 8%).



Outros resultados importantes para as medidas de escoamento é a variação da viscosidade dos hidrogéis, em função da taxa de cisalhamento numa faixa de $(0-200s^{-1})$. Neste caso, observa-se que a viscosidade dos hidrogéis diminuiu, quando a taxa de deformação aumentou. Estes resultados confirmam que os hidrogéis a base de alginato possuem propriedades com comportamento reológico não-newtoniano pseudoplásticos, os hidrogéis a 8%, apresentaram uma maior viscosidade inicial, conforme mostra na Figura 16. Desta forma, pode-se justificar uma maior quantidade da massa do alginato, NBsAu quanto NPsAg utilizados no processo de obtenção dos mesmos, acarreta como consequência uma maior interação na rede polimérica.

Figura 16- Dependência da viscosidade em função da taxa de cisalhamento, dos hidrogéis de Alg, NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg em diferentes concentrações (4%, 6% e 8%).



4.1.2 Propriedades reológicas de acordo com o teste oscilatório

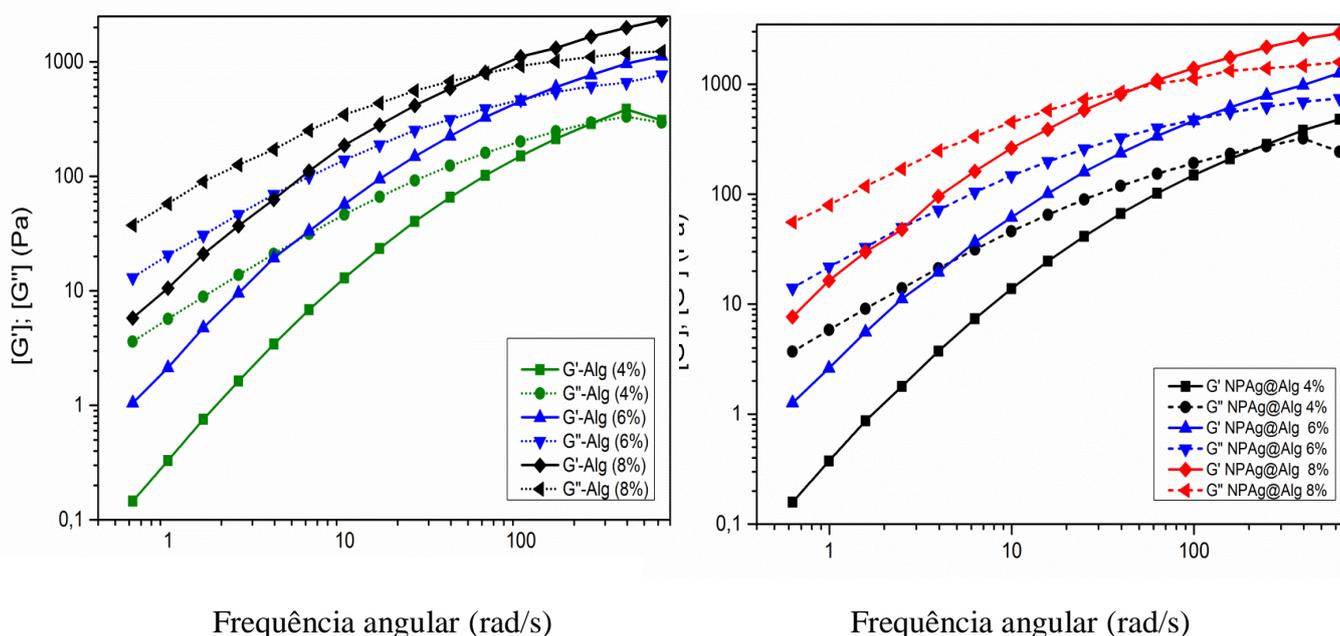
Quanto ao resultado referente ao método oscilatório, onde o módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') varia em função da frequência angular em uma faixa de (0,4-700) em escala logarítmica de base 10 a uma temperatura constante de 25°C, pode-se afirmar que no início do experimento, o módulo de perda (G'') foi predominante em todos os hidrogéis (Alginato sódico, NBsAu@Alg; NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg) em diferentes concentrações de massa do alginato (4%, 6% e 8%), conseqüentemente, $G'' > G'$ o que indica um líquido viscoelástico. À medida que a frequência angular aumentou a taxa de crescimento do módulo G' foi maior que G'' , passando pelo ponto dos módulos $G' = G''$, chamado de ponto de gel, indicando o ponto de gelificação dos materiais. Seguindo esta linha de raciocínio, ao longo da frequência, o módulo de G' ficou maior que G'' até o final das análises, no qual classificou os

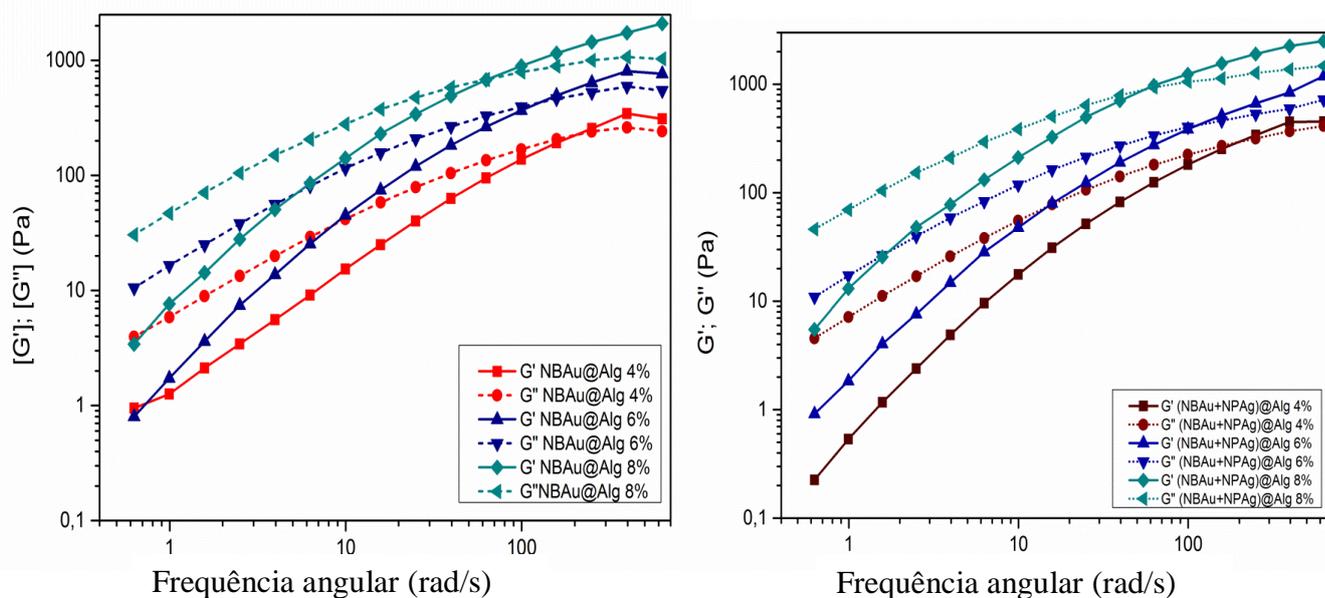
materiais dessa região como sólidos viscoelástico, conforme apresentado na Figura 17a. Analisando as amostras em função das concentrações dos hidrogéis, observou que a concentração de 8%, o ponto de gel ($G'=G''$) ocorre numa menor frequência angular, isto significa que a concentração maior, favorece uma maior interação da rede polimérica de alginato.

Analisando a Figura 17a, das amostras em função das concentrações dos hidrogéis, indicaram que as concentrações de 8%, o ponto de gel ($G'=G''$) ocorreram numa menor frequência angular e indica que, a concentração maior, favorece uma maior interação da rede polimérica de alginato. Este efeito pode ser explicado o melhor empacotamento molecular, aumentando o emaranhamento quando aumentamos a concentração dos constituintes do hidrogéis. Desda forma, o aumento da [] sólidos contribue positivamente para o aumento da característica elástica do sistema. Segundo descrito por Ma e pesquisadores (2014), que realizaram experimentos com soluções de alginato de sódio nas concentrações de 1 a 3% (m/v), os valores dos G' foi crescente com o aumento da frequência e da concentração de alginato, o que corrobora aos resultados da Figura 17a.

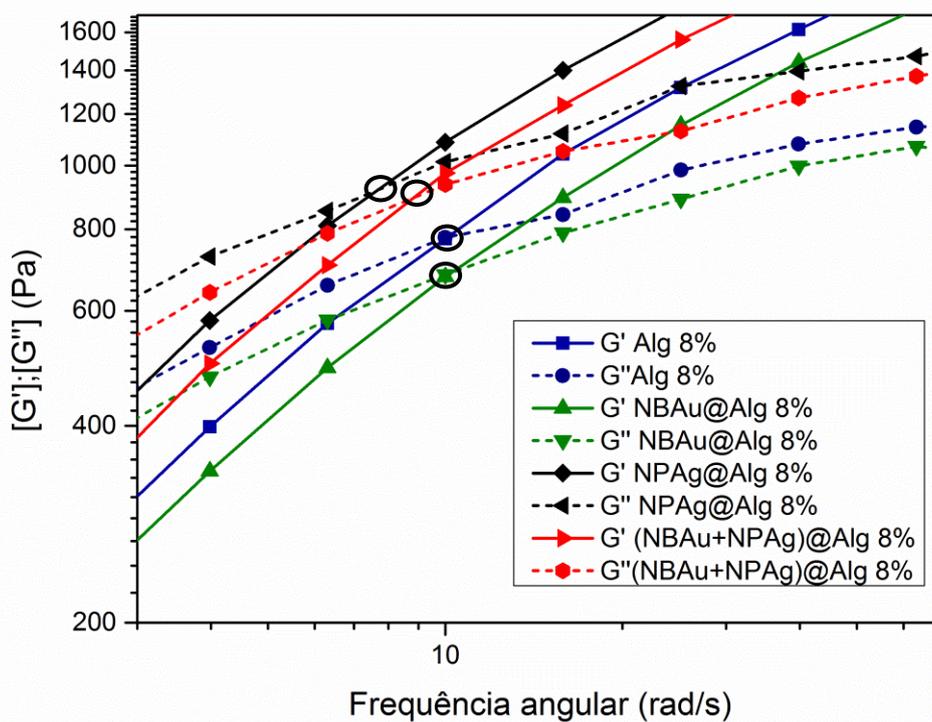
Figura 17. a) Curva do teste de varredura da frequência oscilatória dinâmica, para o módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G'') em função da frequência angular (ω) para os hidrogéis de: alginato de sódio puro, NBsAu@Alg; NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg em diferentes concentrações (4%, 6% e 8%). b) Curva do teste de varredura da frequência oscilatória dinâmica, para o módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G'') em função da frequência angular (ω) para os hidrogéis de: alginato de sódio puro, NBsAu@Alg; NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg na concentração de 8%.

a)





b)



De acordo com a Figura 17b, pode-se analisar que nos diferentes hidrogéis a 8% de massa do alginato, observou que o hidrogel de NPsAg@Alg apresentou um ponto de

gelificação ($G'=G''$) em uma menor frequência (48rad/s), quando comparado aos demais hidrogéis que indicaram gelificação acima de (56,7rad/s). Isso ocorre, devido à interação da rede de alginato com os estabilizantes da nanopartículas de prata, favorecendo um aumento no módulo de armazenamento (G'). Neste contexto, esta justificativa está de acordo com Zlopasa et al., (2016), uma vez que indicam grandes mudanças no comportamento reológico do gel de alginato, adicionado pequenas quantidades de montmorilonita, devido as interações entre a carga positiva do (Na-MMT) com a carga negativa do íons carboxila (HCOO^-) do alginato.

Seguindo esta linha de raciocínio, Gonzalez-Sanchez et al., (2015), propuseram em seu trabalho sobre comportamento reológicos de hidrogéis a base de metacrilatos encapsulado com nanopartículas de prata, que o módulo elástico não mudou com a frequência observada em todos os géis e independentemente das concentração das nanopartículas de prata. Por outro lado, o módulo viscoso mostrou um comportamento decrescente com o aumento da frequência, logo, quando comparou os hidrogéis com nanopartículas presente na solução de polimerização, ambos o G' e G'' foram menores que os correspondentes hidrogéis sem nanopartículas.

Narayanan e Han (2017), reportaram em seu trabalho as propriedades reológicas de nanocompósitos esféricos a base de PVA/SA/NPsAg, em cinco diferentes concentrações (90/10/5; 70/30/5; 50/50/5; 30/70/5 e 10/90/5), o comportamento do módulo de armazenamento e módulo de perda, não mudou seu perfil durante o fluxo da frequência, entretanto houve um aumento nos valores dos módulos de G' e G'' quando comparou apenas com as concentrações do alginato de sódio. Este efeito deve ser atribuído ao movimento de cadeias do polímero ser restringida pelas NPsAg e ocorrer uma interação da matriz polimérica com NPsAg atuando como reforços, estruturas de rede, poros e interações polímero/polímero. Além disso, as nanopartículas contribuíram para as propriedades reológicas dos polímeros/nanocompósito de prata.

4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (UV-VIS)-(NIR)

A medida de absorção na região do UV-vis-NIR foi utilizada para verificar as mudanças e alterações nas bandas SPR, que pode ser atribuída como consequência das interações dos nanobastões de ouro com o alginato, bem como verificar o efeito da interação do alginato com as nanopartículas de prata, conforme indicou a Figura 18. De acordo com os espectros de absorção dos hidrogéis de Alginato de Sódio (4%) de massa, observou-se que não apresentam absorbância nos espectros de UV-vis-NIR. Quando se analisou o hidrogel contendo nanobastões de ouro, na concentração de 4% do alginato de sódio, podemos encontrar absorção na região do UV-vis-NIR, duas bandas em 510 nm e 850 nm, conforme apresentada na Figura 18. Este espectro é característico dos nanobastões de ouro, sendo uma banda atribuída à ressonância de plasma de superfície transversal (TSPR) e a outra ressonância de plasma de superfície longitudinal (LSPR), na qual a banda de absorção na superfície longitudinal é maior quando comparada com a transversal. Os resultados obtidos dos hidrogéis de Alginato com os nanobastões de ouro corroboram os resultados de Shajari e colaboradores (2017), que também atribui uma banda em torno de 800-910 nm à absorção máxima da banda plasmônica do modo longitudinal (SPR).

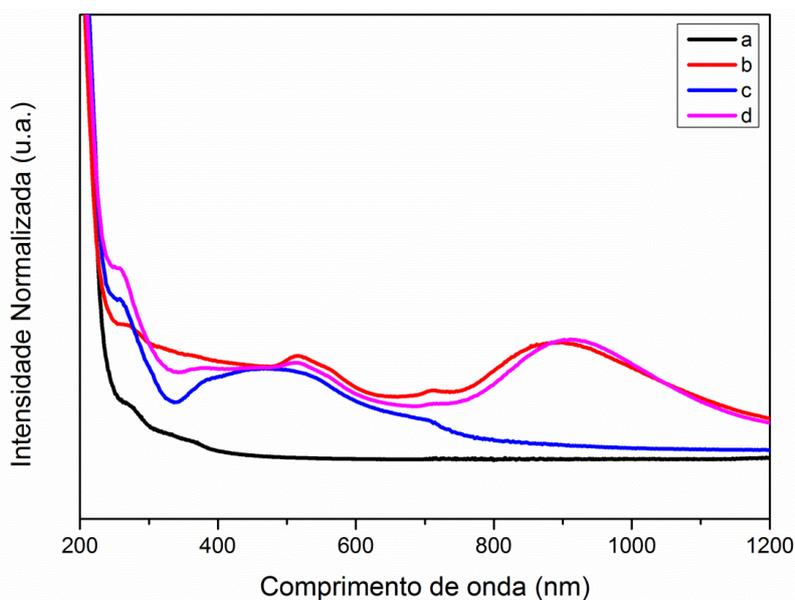
Navaei et al (2016), realizaram um estudo sobre hidrogéis condutores à base de gelatina metacrilada incorporados com nanobastões de ouro e observaram também que o espectro de absorção UV-vis uma maior banda de absorção é encontrada na superfície longitudinal (810 nm) e a ressonância de plasmônica de superfície transversal em torno de (530 nm) característicos dos NBsAu.

As nanopartículas de prata, NPAg, também foram investigadas no UV-vis-NIR e na mesma concentração de 4% do hidrogel. Observa-se uma única banda de absorção máxima, o que confirma a característica das nanopartículas esféricas por volta de 400-440 nm, como apresenta no UV-vis-NIR, da Figura 18. Fafal e colaboradores (2017), reportaram o espectro de UV-Vis e exibiu uma banda de absorção em torno de 440 nm, que é uma banda característica do íon Ag^+ , resultante da vibração das NP_sAg na solução.

Jovanovic et al. (2012) relataram em seu trabalho uma síntese eletroquímica de soluções coloidais de Ag/Alginato de sódio. Os autores sugeriram que independentemente dos parâmetros de síntese das AgNO_3 (concentração na solução do alginato e densidade de corrente), a análise no UV-Vis das soluções fluidas das nanopartículas de prata com alginato de sódio, indicaram a faixa de absorção plasmônica de superfície no intervalo de comprimento de onda entre (405-440nm), porém, o espectro de UV-vis de solução de alginato puro não exibiu banda de absorção na faixa examinada no mesmo comprimento de onda.

Mais recente, Rao e colaboradores (2016) relataram um trabalho sobre hidrogéis polieletrólitos (PEHs), que podem ser obtidos a partir de biopolímeros naturais, dos polissacarídeos goma de xantana (GX) e quitosana (QUI). Neste estudo os géis foram estabilizados com nanopartículas de prata. As NPsAg nas redes poliméricas, mostrara uma banda plasmônica de superfície, características na faixa entre (398-409 nm) (RAO et al., 2016). Portanto, o nosso resultado está de acordo resultados prévios da literatura. Tanto o hidrogel de alginato estabilizados por nanobastão de ouro e nanopartícula de prata, mostraram a absorbância máxima típica da nanopartícula de prata e do nanobastão de ouro e confirmou a presença de ambos no mesmo hidrogel.

Figura 18- Espectro de UV-VIS-NIR normalizado a partir dos hidrogéis: (a) Alginato puro; (b) NBsAu@Alg (4%); (c) NPsAg@Alg (4%) e (d) (NBsAu+NPsAg)@Alg (4%).

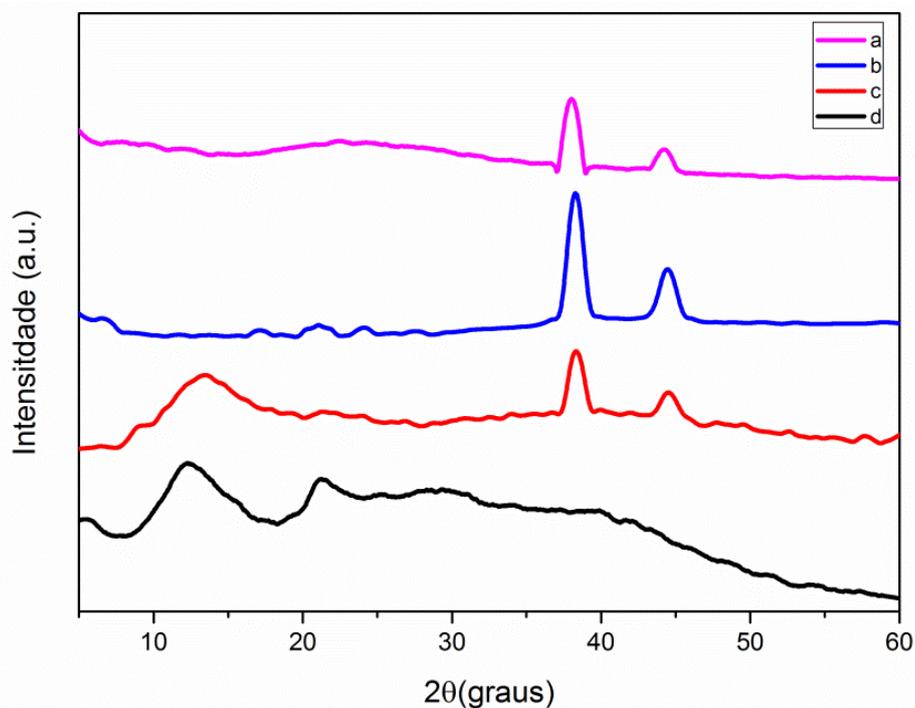


4.3 DIFRAÇÃO DE RAIO-X

Os resultados do difratograma para todos os hidrogéis liofilizados preparados na concentração a 4% de Alginato de sódio estão expostos conforme apresentados na Figura 19. O resultado do Alg puro apresenta a intensidade das bandas largas de difração em $2\theta = 13^\circ$ e $21,4^\circ$, atribuída de um material amorfo. Este resultado esta de acordo conforme descrito por (LI et al., 2012; LI et al., 2013; ISLAM; KARIM, 2010) que também encontra seus picos maiores em $2\theta = 13,5^\circ$ e $21,6^\circ$. O difratograma obtido para os nanobastões de ouro é semelhante quando comparado com os padrões de DRX reportados por Shajari et al., (2017). Devido aos quatro picos característicos, uma vez que planos cristalográficos são especificados por três índices de Miller na forma denominada (hkl). No presente trabalho, todas essas reflexões correspondem aos planos cristalográficos (111), (200), (220) e (311) e uma estrutura cristalina cúbica de face centrada (CFC), de acordo com a natureza e estrutura do ouro metálico. Estes dados obtidos foram confirmados para o hidrogel de NBsAu@Alg onde encontra-se os bandas largas referente ao alginato em $2\theta = 13,23^\circ$ e $21,45^\circ$ e picos correspondentes ao nanobastões de ouro em $2\theta = 38,25^\circ$ e $44,51^\circ$.

Os resultados para os hidrogéis de NPsAg@Alg apresenta um perfil semelhante ao hidrogel de NBsAu@Alg, pois obteve os maiores picos em $2\theta = 38,6^\circ$ e $44,2^\circ$ que são característicos de nanopartícula de prata e corrobora com Su e colaboradores (2017) onde afirma em seu trabalho os picos em $2\theta = 38,1^\circ$, $44,3^\circ$, $64,5^\circ$ e $77,4^\circ$, representando os planos cristalográficos (111), (200), (220) e (311), confirmando a estrutura cúbica de face centrada (CFC) encontrada para a NPsAg citada em outros trabalhos característicos de nanocristais de prata (XIHUI et al., 2014).

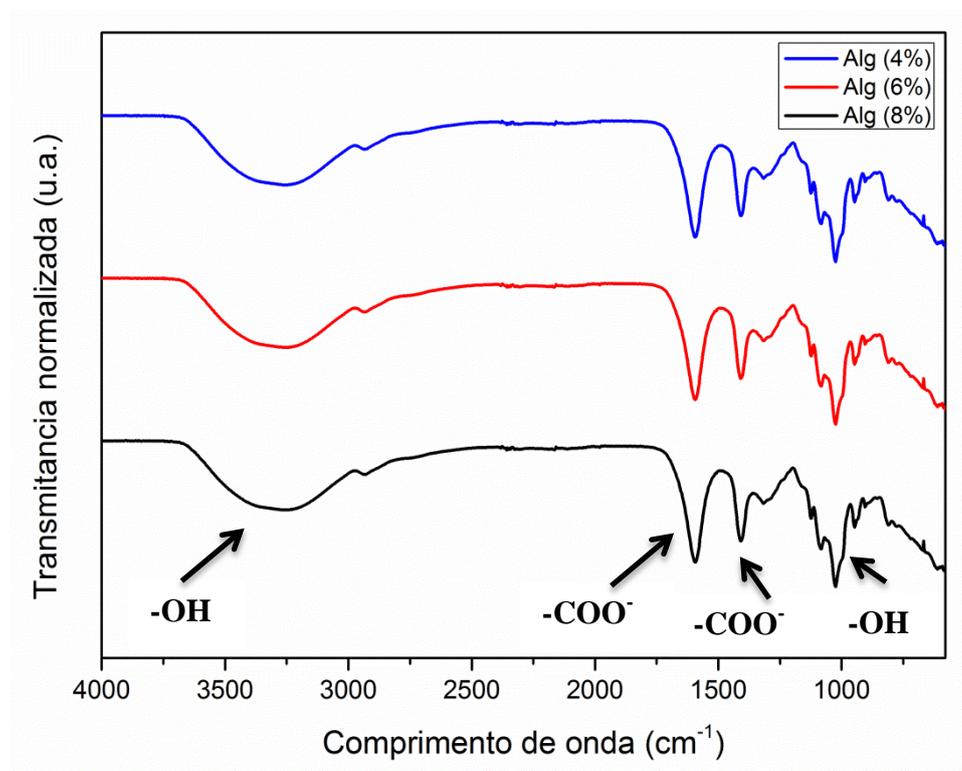
Figura 19- Difrátograma das seguintes amostras: **(a)** NBsAu@Alg (4%), **(b)** NBAu, **(c)** NPsAg@Alg (4%) e **(d)** Alginato de sódio puro.



4.4 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FT-IR)

A espectroscopia de FT-IR foi escolhida para avaliar a natureza das interações das nanopartículas metálicas e o alginato de sódio. Esta interação foi caracterizada pelo deslocamento, aparecimento ou desaparecimento de bandas conforme é apresentado na Figura 20. Os espectros de FT-IR mostram para o hidrogel de alginato puro nas concentrações de (4, 6 e 8%), foi utilizada para elucidar os grupos funcionais presentes na molécula do Alg. Foram observadas frequências específicas de vibração da banda em 3351 cm^{-1} , características de grupo -OH de ligação de hidrogênio, 1595 cm^{-1} e 1414 cm^{-1} pico de estiramento -COO- e de deformação angular de OH , 1029 cm^{-1} referente ao -COO- simétrico, mostrados na Figura 20. Estes resultados são semelhantes aos de Zhao e colaboradores (2015), pois o espectro de FT-IR, apresenta bandas características em 3466 cm^{-1} , em 1670 cm^{-1} e 1415 cm^{-1} , correspondendo a banda assimétrica e simétrica dos grupos -COO- , respectivamente. Este trabalho também corrobora com Sibaja e colaboradores (2015), pois apresentaram bandas distintas de um sal carboxílico do alginato com absorção m torno de 1591 cm^{-1} e 1405 cm^{-1} , referente as vibrações de estiramento assimétrico e simétrico.

Figura 20- Espectro de FT-IR para os hidrogéis de alginato de sódio puro para as concentrações: Alg.(4%); Alg. (6%) e Alg.(8%).

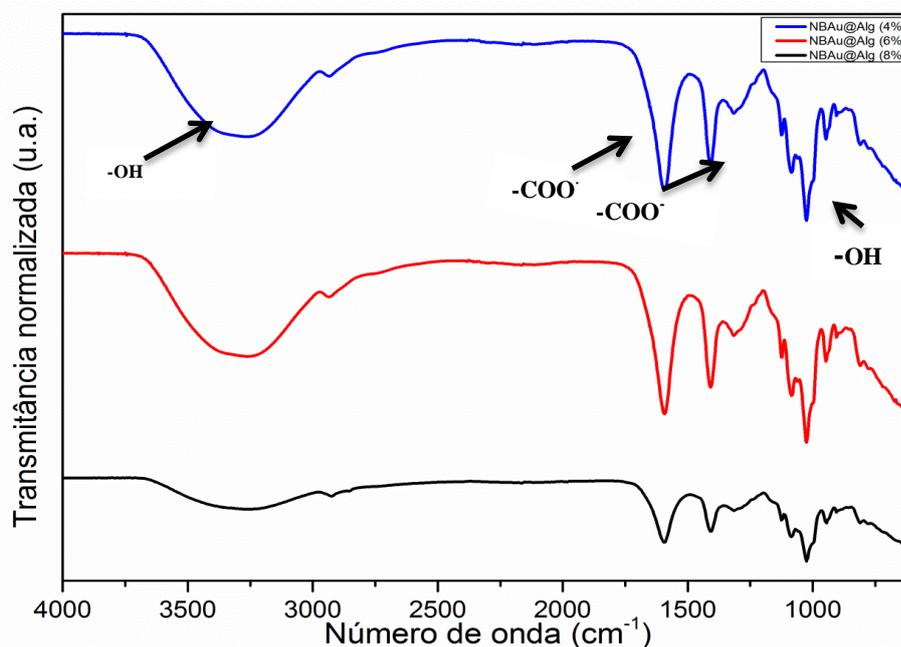


Outros trabalhos com FT-IR do alginato, reportados por Jovanović e colaboradores (2012), mostraram uma banda de absorção larga por volta de 3257 cm^{-1} , indicando a fraca ligação de hidrogênio dos grupos hidroxilas. O espectro de alginato também apresentou bandas de absorção em 1712 cm^{-1} , 1593 cm^{-1} e 1406 cm^{-1} correspondentes às vibrações de estiramento H-O-C=O assimétricos e simétricos e alongamento vibracionais do sal carboxilato, respectivamente. Outras bandas relevantes são apresentadas próximos de 887 cm^{-1} (vibração de deformação C1-H de resíduos do ácido β -D-manurônico) e 814 cm^{-1} (deformação C1-H) vibração dos resíduos de ácido α -L-gulurônico. Neste sentido, apresentam no nosso resultado, valores próximos que são encontrados no espectro, pois existem também bandas correspondentes às vibrações de deformações entre C1-H do ácido β -D-manurônico em 895 e $816,31\text{ cm}^{-1}$, o que representa a deformação C1-H e vibração dos resíduos de ácido α -L-gulurônico.

Quanto aos hidrogéis de NBsAu@Alg, os resultados de FT-IR apresentaram que a princípio houve uma pequena variação bandas características referentes aos NBsAu, encontrando bandas características em relação às vibrações de estiramento de $-\text{CH}_2-$ do

CTAB em torno de (2929 cm^{-1}) (TANG, HUANG, & MAN, 2013). Segundo reportado em outros relatos mais recentes, como o de Barros e colaboradores (2016), estudos com o biopolímero natural quitosana ligado ao grupo sulfato sugeriu uma interação com NBsAu, conforme apresentou no espectro de FT-IR da QuiS@NBsAu, bandas vibracionais (2918 e 2850 cm^{-1}) referente ao grupo ($-\text{CH}_2-$). Rayavarapu et al., 2010, propuseram que, devido ao grupo catiônico nas extremidades da estrutura do amônio quaternário de CTAB presente nos nanobastões de ouro, possuem também uma carga superficial positiva. Desta forma, sugeriram que o uso do polissacarídeo carregado negativamente auxilia as interações entre os NBsAu e o alginato de sódio, através da atração eletrostática. A espectroscopia FT-IR foi escolhida para avaliar a natureza das interações do NBsAu@Alg, justificando assim o deslocamento, aparecimento ou desaparecimento de bandas nos espectros FT-IR pode ser atribuído às interações que ocorrem entre eles conforme é apresentado na Figura 21.

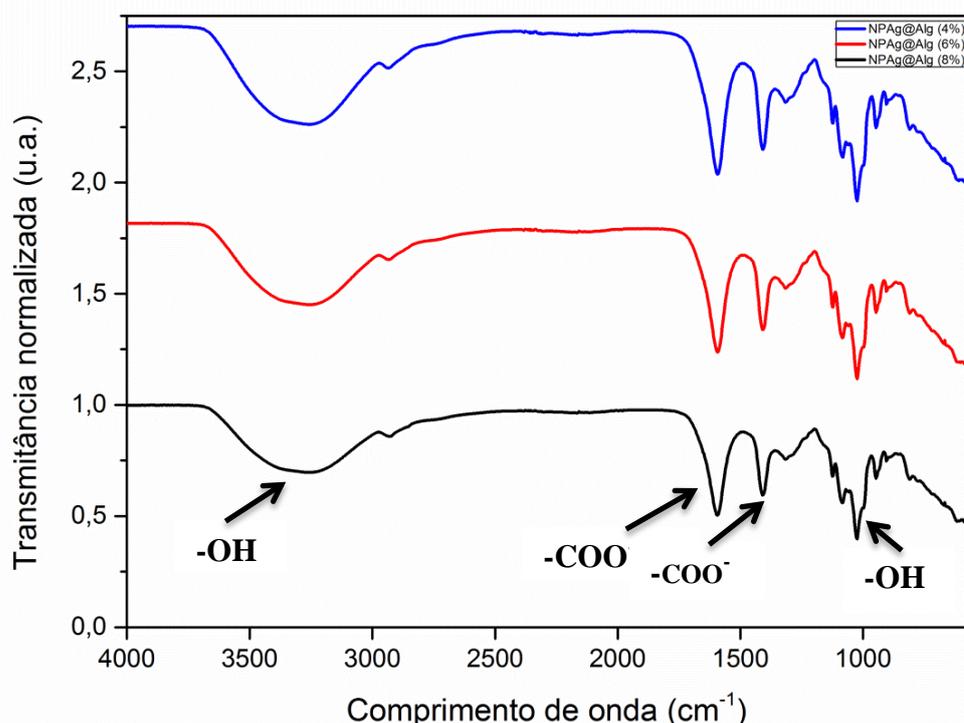
Figura 21- Espectro de FT-IR para os hidrogéis: NBsAu@Alg(4%); NBsAu@Alg (6%); NBsAu@Alg (8%).



Ao analisar o FT-IR do hidrogel de NPsAg@Alg, indicam que não houve diferenças nas posições das bandas, em comparação com o espectro apenas do hidrogel de alginato. Sendo assim, as moléculas de alginato e nanopartículas de prata interagiram a partir da atração entre a carga negativa do alginato ($-\text{COO}^-$) e positiva dos íons de

prata (Ag^+), no qual apresentado no espectro da Figura 22, predominando assim interação através das forças atrativas de van der Waals (NARAYANAN & HAN, 2017).

Figura 22- Espectro de FT-IR para os hidrogéis: NPsAg@Alg (4%); NPsAg@Alg (6%); NPsAg@Alg (8%).

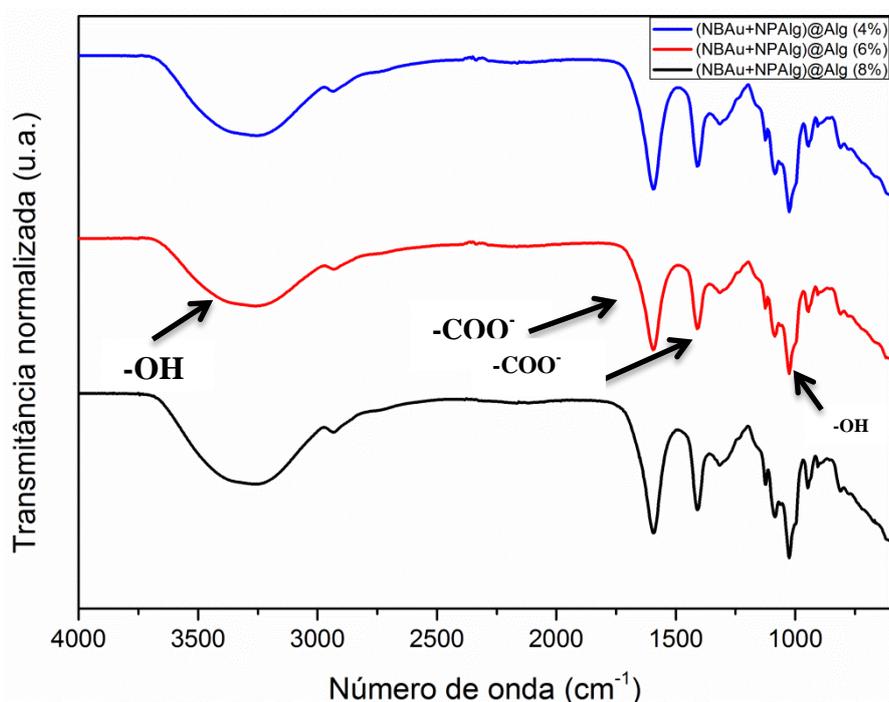


Su e colaboradores (2017), propuseram em seu trabalho uma mudança em 1400 cm^{-1} para 1386 cm^{-1} , o que confirma o envolvimento do grupo CO na formação do revestimento na superfície das NPsAg. A mudança da banda de 1113 cm^{-1} para 1090 cm^{-1} o confirma a contribuição do grupo CO na formação do biopolímero complexo (YANG, et al., 2015). Ainda neste contexto, quando comparou com outros trabalhos da literatura a banda característica do grupo C=C (em 1450 cm^{-1}), foi ausente para NPsAg, neste caso devido à redução do AgNO_3 para Ag, também foi encontrada outra banda intensa em 1384 cm^{-1} no espectro de FT-IR da NPsAg, atribuída devido a deformações de -OH (COATES, 2000).

Quanto aos resultados do (NBsAu+NPsAg)@Alg apresentados na Figura 23, as bandas características em relações às vibrações de estiramento de $-\text{CH}_2-$ do CTAB, foram encontradas em torno de (2936 cm^{-1}). O espectro de alginato, também apresentou

bandas de absorção em 1712 cm^{-1} , 1593 cm^{-1} e 1406 cm^{-1} correspondente às vibrações de estiramento H-O-C=O assimétricos e simétricos, alongamento vibracionais do sal carboxilato, corroborando com mesmo resultado encontrado para o alginato puro, justificado pelo mesmo raciocínio citado anteriormente, devido através das leves interações eletrostáticas predominarem quando as soluções dos (NBsAu+NPsAg) interagem com o biopolímero alginato.

Figura 23- Espectro de FT-IR para os hidrogéis de: (NBsAu+NPsAg)@Alg (4%); (NBsAu+NPsAg)@Alg (6%); (NBsAu+NPsAg)@Alg (8%).

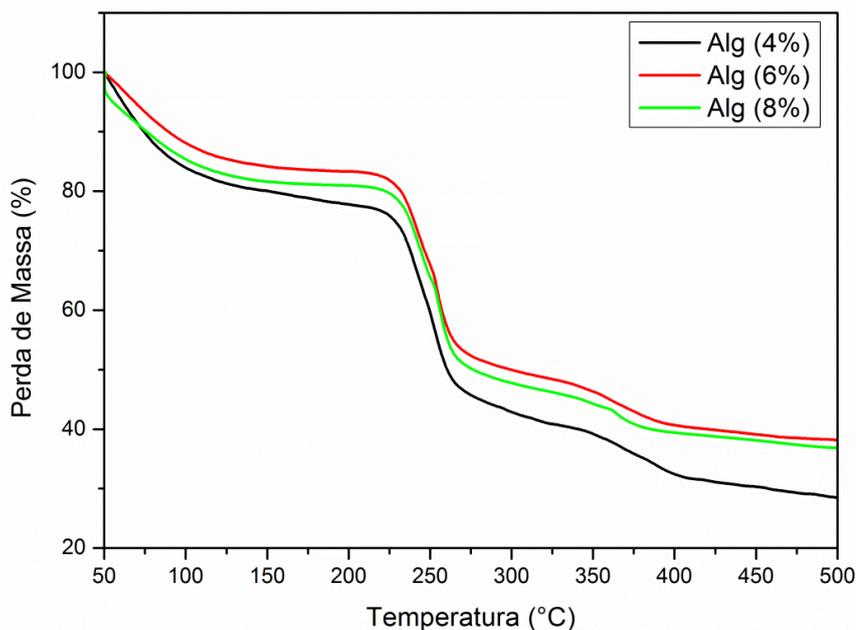


4.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

O perfil termogravimétrico dos hidrogéis de alginato de sódio nas concentrações de (4, 6 e 8%) foram analisadas por termogravimetria. A Figura 24 apresenta as curvas de perda de massa em função da temperatura. O primeiro evento identificado está relacionado com uma pequena perda de massa abaixo de 110°C , atribuída à perda de água devido à desidratação, já o segundo evento é referente à perda de massa atribuída à degradação do biopolímero. Um terceiro evento também foi obtido referente à decomposição do Na_2CO_3 , em torno de 470°C . Diante das curvas de TGA

dos hidrogéis de alginato, não houve variação significativa das temperaturas (LI et al.,2013; DE MORAES et al., 2014). A Tabela 2 mostra, com relação ao segundo evento de perda de massa, a temperatura inicial de degradação e a final dos hidrogéis.

Figura 24- Curvas de TGA para os hidrogéis de alginato puro nas concentrações: 4%; 6%; 8%.



Quando analisa-se o perfil termogravimétrico dos hidrogéis NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg e compara-se com o hidrogel de Alg nas mesmas concentração em massa, conforme são apresentadas nas Figuras 25, 26 e 27 bem como na Tabela 2, pode-se afirmar que na primeira curva de TGA, ocorreu uma pequena perda de massa abaixo de 110°C, devido a desidratação, atribuída a perda de água. A segunda curva é referente à perda de massa, atribuída à degradação térmica do biopolímero, visto que não houve diferença significativa quando comparamos os eventos de todos os hidrogéis, exceto para o NPsAg@Alg, que ocorreu uma maior estabilidade térmica, devido a uma temperatura de degradação final maior quando comparadas com as demais. Esta justificativa pode ser atribuída a uma maior interação das nanopartículas de prata na rede polimérica, pois interferiu na mobilidade dos mesmos, bem como na estabilidade térmica no segundo estágio referente à degradação térmica do hidrogel de alginato, um terceiro estágio foi observado referente à decomposição do Na_2CO_3 .

Estudos mais recentes citados por Narayanan e Han (2017), afirmaram que ao adicionar NPsAg como um reforço a blenda polimérica de PVA/Alg, ocorreu um aumento na estabilidade térmica do nanocompósito, analisada durante a degradação polimérica.

Figura 25. Curvas de TGA para hidrogéis de: Alg 8%; NBsAu@Alg 8%.

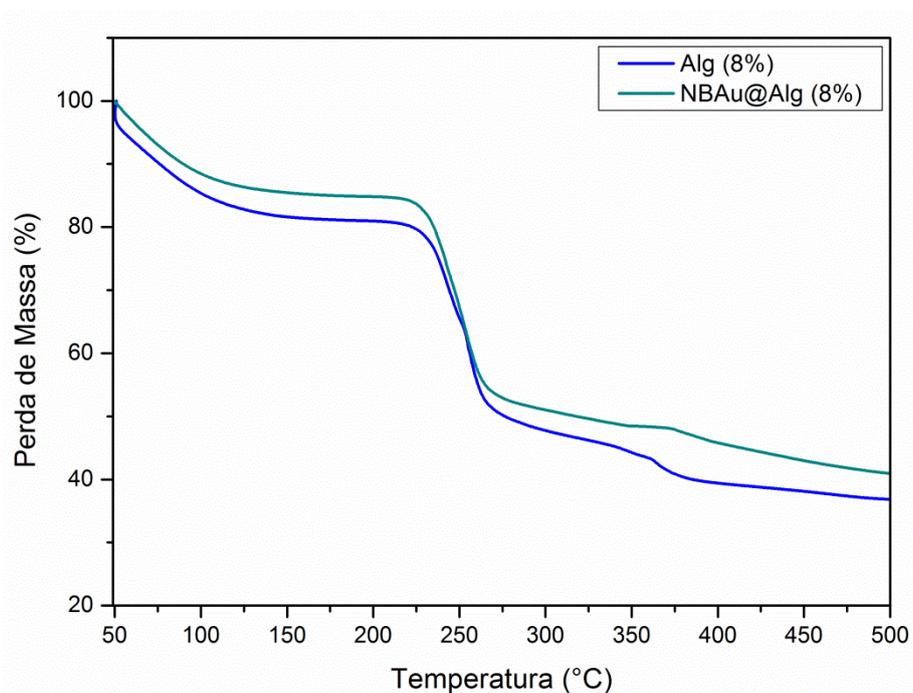


Figura 26- Curvas de TGA para hidrogéis de: Alg 4%; NPsAg@Alg 4%.

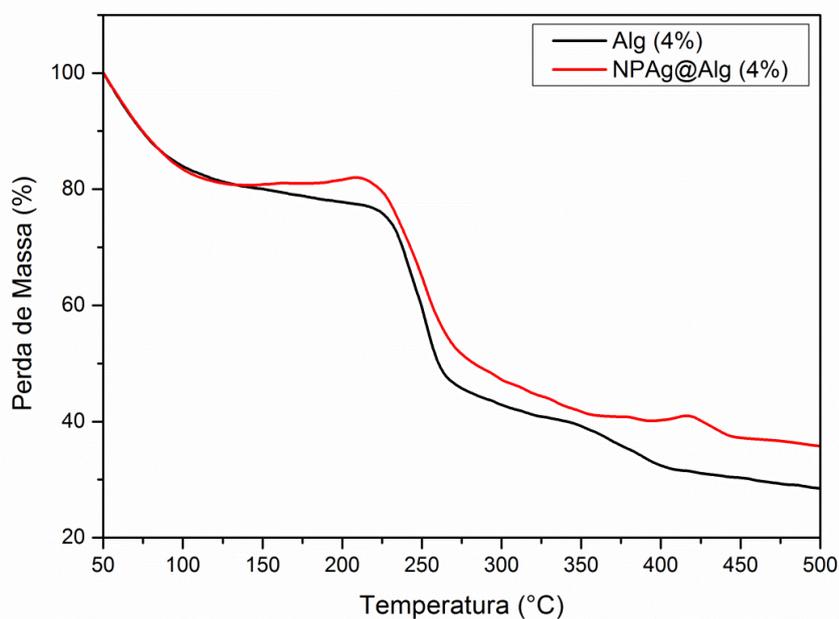


Figura 27- Curvas de TGA para hidrogéis de: Alg 4%; Alg 6%; Alg 8% (NBsAu+NPsAg)@Alg 4%; (NBsAu+NPsAg)@Alg 6% ; (NBsAu+NPsAg)@Alg 8%.

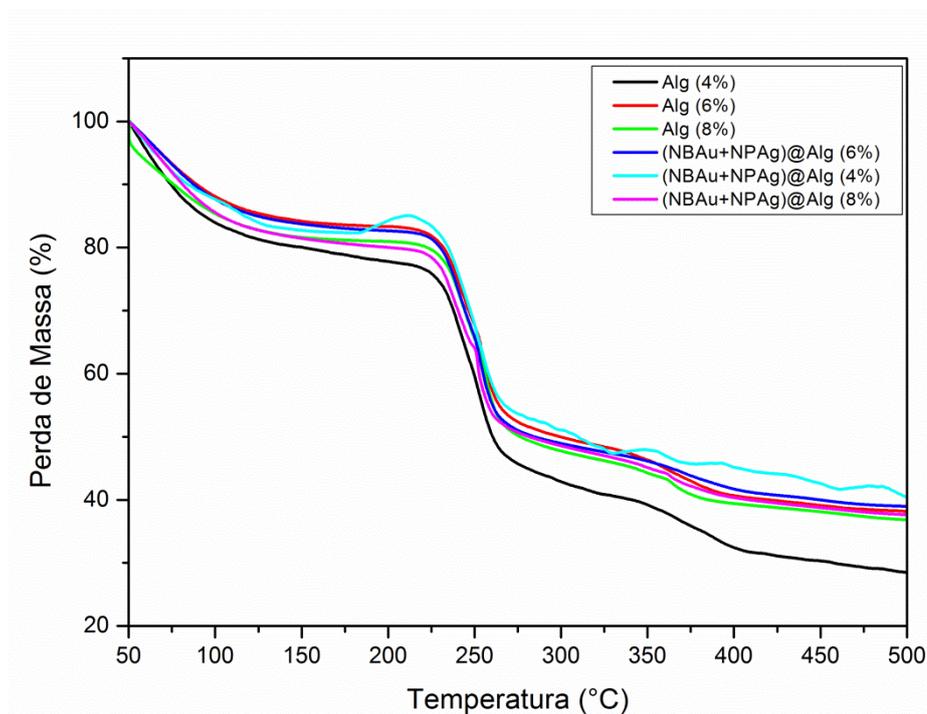


Tabela 2- Resultados do segundo estágio referente à temperatura inicial e final de degradação de todos os hidrogéis.

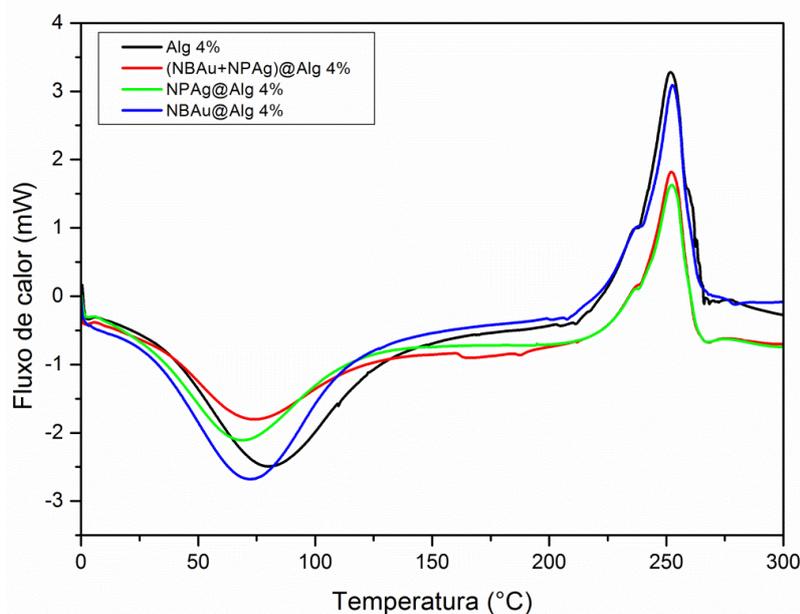
Hidrogéis	Temperatura inicial de degradação	Temperatura final de degradação
Alg 4%	229°C	265°C
Alg 6%	230°C	266°C
Alg 8%	229°C	265°C
NBsAu@Alg 8%	228°C	264°C
NPsAg@Alg 4%	224°C	282°C
(NBsAu+NPsAg)@Alg 4%	224°C	264°C
(NBsAu+NPsAg)@Alg 6%	229°C	264°C
(NBsAu+NPsAg)@Alg 8%	229°C	264°C

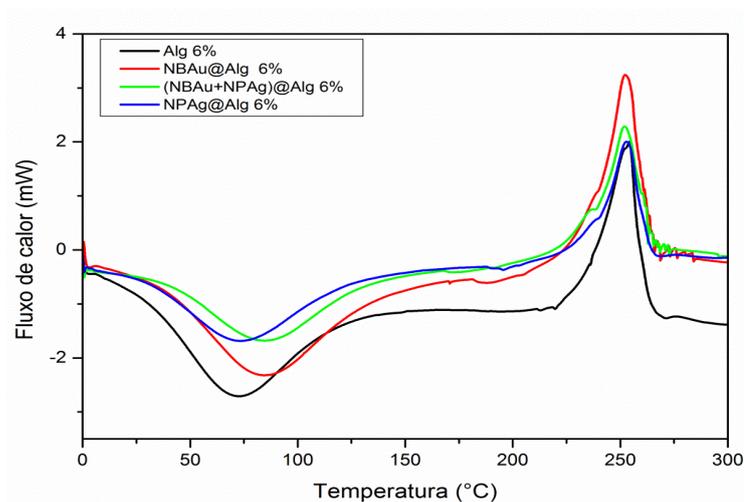
4.6 CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

A transição térmica dos hidrogéis de alginato de sódio puro nas concentrações de (4 e 6%) foram determinadas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Conforme apresentado na Figura 28, a curva de DSC dos hidrogéis de Alg apresentou inicialmente um pico endotérmico em torno de 73°C e 80°C, atribuído à desidratação à saída de água (MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2017). Um pico exotérmico atribuído por volta de 252°C também foi encontrado em todos os hidrogéis de alginato, indicando uma degradação do biopolímero e formação de carbonatos, que ao comparar com outra curva DSC, encontrou-se a temperatura de degradação do alginato de sódio em torno de 220°C (KARRI et al., 2016).

A mesma interpretação foi atribuída ao evento térmico para os hidrogéis de NPsAg@Alg, NBsAu@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg nas concentrações de (4 e 6%). Conforme apresentada na Figura 28, a característica observada inicialmente através um pico endotérmico, devido à remoção de água, correspondente a temperatura de desidratação para os hidrogéis a 4% $T_D = (66^\circ\text{C}, 72^\circ\text{C} \text{ e } 73^\circ\text{C})$ e para o hidrogel a 6% uma $T_D = (74^\circ\text{C}, 85^\circ\text{C} \text{ e } 85^\circ\text{C})$. O pico exotérmico foi atribuído à degradação máxima em 252°C, indicando a degradação biopolimérica, esta de acordo com o TGA e citados por outros colaboradores (SOARES et al.,2004).

Figura 28- Curvas de DSC para os hidrogéis de: Alg 4%; NBsAu@Alg 4%; (NBsAu+NPsAg)@Alg 4%; NPsAg@Alg 4%; Alg 6%; NBsAu@Alg 6% (NBsAu+NPsAg)@Alg 6%; NPsAg@Alg 6%.



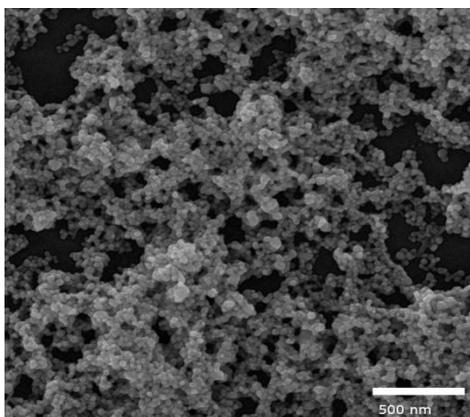


4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

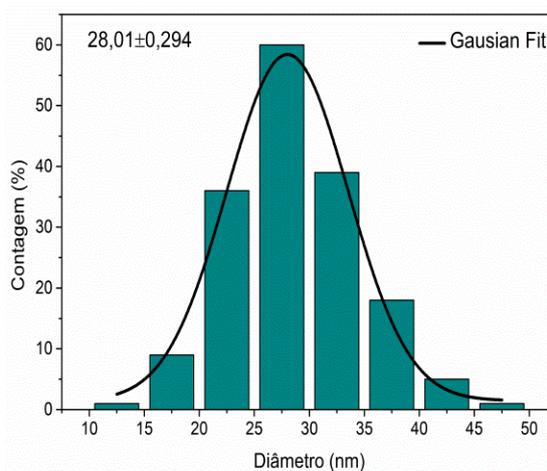
A morfologia das nanopartículas coloidais de prata foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens superficiais de MEV para as NPsAg (Figura 29), apresentaram as partículas foram obtidas de forma esféricas com tamanho característico predominante entre 20- 40 nm de diâmetro (Figura 29a), com tamanho médio de $28\pm 0,294$, encontrada através do histograma das NPsAg (Figura 29 b)(SOLOMON et al.,2007; JOVANOVIĆ et al. 2012). No entanto, alguns estudos relatam que as NPsAg podem obter tamanho diâmetro menores entre 8-20 nm, diâmetros maiores de 30-60 nm, e também formas diferentes como por exemplo, triangular e hexagonal (BALAKUMARAN et al.,2016; ELBESHEHY et al., 2015; BOCA et al., 2011; SU et al., 2017), este comportamento normalmente é atribuído ao método sintético de redução química para obtenção das nanopartículas de prata (SOLOMON et al.,2007).

Figura 29- a) Imagens do MEV das NPsAg; **b)** Histograma dos tamanhos de partículas obtidos a partir da imagem de MEV, das nanopartículas de prata (Barra de escala: 500 nm).

a)



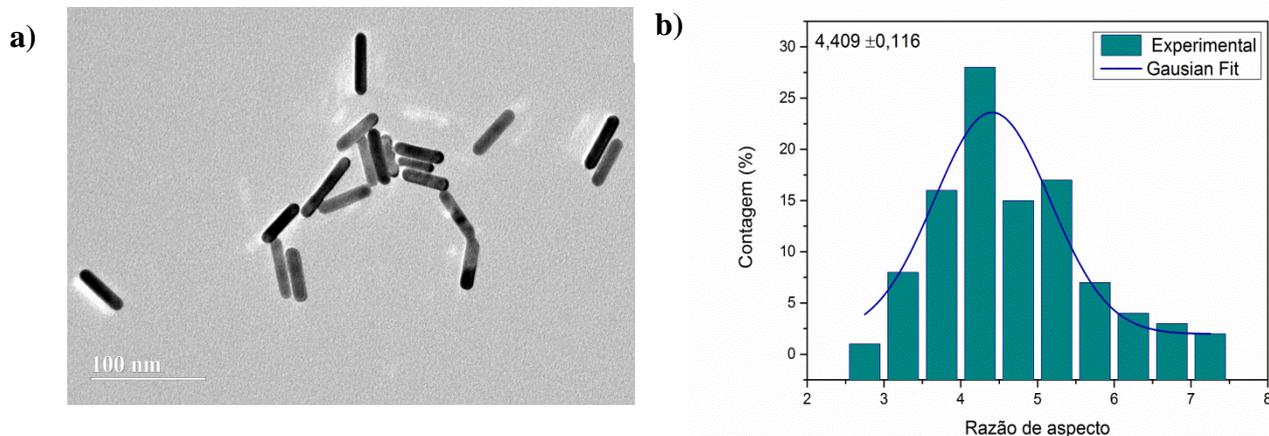
b)



4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)

As imagens dos nanobastões de ouro que possuem tamanho característico exibindo duas ressonâncias plasmáticas de superfície localizada (transversal em 510 nm e longitudinal em 850 nm) foram adquiridas pelo microscópio eletrônico de transmissão. A caracterização através do TEM foi utilizada para obter a forma e tamanho (ou RA) de nanoestruturas, determinando a média e ajustando o (RA). Em cada caso consideramos cerca de 100 nanoestruturas, onde medimos seus comprimentos e largura para estimar RAs em forma de bastões, conforme apresentada na Figura 30a. Neste contexto, ao analisar a distribuição do tamanho, a partir da LSPR ajustado através da relação do comprimento com a largura do nanobastão de ouro, no qual indicou o tamanho médio de $(4,4 \pm 0,116)$, conforme é apresentado na Figura 30b desta forma este resultado corrobora com estudo realizado por Shajari e colaboradores (2017).

Figura 30- a) Imagens do TEM do NBsAu; b) Histograma da razão de aspectos dos nanobastões de ouro.



4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Inicialmente, os valores de CIM para os hidrogéis de Alg, NBsAu@Alg, NPsAg@Alg, (NBsAu+NPsAg)@Alg, NBsAu e NPsAg foram testados, contra sete bactérias Gram positiva (*Staphylococcus epidermidis*-UFPE, *Staphylococcus aureus*-UFPE, *Staphylococcus epidermidis*-ATCC, MRSA, *Staphylococcus Aereus*- ATCC) e Gram negativas (*E.Coli*-UFPE, *Pseudomonas Aeruginosas*-UFPE). A princípio, ao iniciar as microdiluições, foram analisados os hidrogéis a partir de 2%, o hidrogel de alginato de sódio puro, não apresentou inibição em nenhuma cepa testada (LEE;

MOONEY, 2012) e o mesmo ocorreu com a solução dos NBsAu, pois não apresentou inibição quando testado individualmente. A Tabela 3 apresenta os resultados da CIM para os demais hidrogéis testados e neste contexto obtiveram melhores inibições contra as duas bactérias Gram negativas e para duas Gram positivas, desta forma, os melhores resultados foram atribuídos para os hidrogéis de: NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg.

Tabela 3- Concentração Inibitória Mímina (CIM) para NPsAg, NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg contra patógenos.

Bactérias	NPsAg	NBsAu@Alg	NPsAg@Alg	(NBsAu+NPsAg)@Alg
1- <i>E. Coli</i> - UFPE	0,27%	-	0,25%	1%
2- <i>Staphylococcus epidermidis</i>-UFPE	0,54%	1%	1%	1%
3- <i>Staphylococcus aureus</i> - UFPE	0,54%	1%	1%	0,25%
4- <i>Staphylococcus epidermidis</i>-ATCC	0,54%	1%	1%	0,25%
5- MRSA	1,08%	1%	1%	1%
6 <i>Staphylococcus Aereus</i>- ATCC	0,54%	1%	1%	1%
7- <i>Pseudomonas Aeruginosas</i>-UFPE	0,54%	1%	0,5%	0,25%

Os resultados para os hidrogéis de NPsAg@Alg, foram promissores devido a presença do íon prata contribuir positivamente para o aumento inibitório contra bactérias Gram negativas como, por exemplo: *E. coli* e *P.aeruginos*, esta justificativa é devido as paredes celulares destas bactérias serem compostas por uma fina camada de peptidoglicano quando comparamos com as bactérias Gram-positivas que consistem em cadeias de polissacarídeos lineares reticuladas por peptídeos curtos, formando assim uma estrutura mais rígida, consequentemente mais difícil para as nanopartículas de prata penetrar (SU et al., 2017; XIHUI et al., 2014; VENKATPURWAR; POKHARKAR, 2011). Quanto aos resultados apresentados para o hidrogel de NBsAu@Alg, indicaram

que apenas frente a bactéria Gram negativa *E. coli* não obteve resultado satisfatório. Porém, as demais bactérias testadas obtiveram a CIM em 1% do hidrogel, sugere um efeito sinérgico entre o alginato e os nanobastões frente às bactérias. Este resultado corrobora aos estudos da atividade antimicrobiana com apenas nanobastões de ouro frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas, as quais obtiveram boas propriedades antimicrobianas de acordo com os valores de MIC das bactérias *L. Monocytogenes* (MIC: 0,0002 µg/ mL), *S. aureus* (MIC: 0,0008 µg / mL), *E. coli* (MIC: 0,05 µg /mL) e *S. typhimurium* (MIC: 0,2 µg /mL) (LANH et al., 2015).

A sensibilidade das bactérias Gram positivas e Gram negativas com nanopartículas de ouro depende da interação quando carregadas e também da estrutura celular, fisiologia, e metabolismo de cada bactéria. O efeito antibacteriano das nanopartículas de ouro em micro-organismos pode ser realizado através da atração eletrostática pelo fato do ouro ser carregado positivamente e a superfície celular do microorganismo carregada negativamente, esta interação causou mudanças estruturais na superfície bacteriana e danos a membranas, levando a morte celular e (BINDHU; UMADEVI, 2014; MORONES et al., 2005).

Baker e Satish (2015) justificaram em seu estudo sobre a atividade antimicrobiana de nanopartículas de ouro, quando interagindo com diversos micro-organismos é bastante explorado devido à superfície-proporção de volume, tamanho ou forma das nanopartículas, pois muda a permeabilidade da membrana celular das bactérias criando lacunas ou poços, inibindo assim a atividade enzimática da respiração levando a apoptose das células.

Os resultados para (NBsAu+NPsAg)@Alg mostraram-se eficientes, devido a presença tanto dos nanobastões de ouro quanto de nanopartícula de prata no hidrogel, associado possivelmente a um efeito sinérgico dos (NBsAu+NPsAg), frente as bactérias testadas, conseqüentemente um efeito inibitório bastante satisfatório.

Além desses resultados, dos quatro hidrogéis testados, três sistemas obtiveram a CBM (Concentração Bactericida Mínima) e apresentaram este comportamento bactericida em concentrações diferentes, na qual resultaram as melhores CBM para os sistemas de: NBsAu@Alg, NPsAg@Alg, e (NBsAu+NPsAg)@Alg, nas concentrações mínimas de: 1%, 0,5% e 1%, respectivamente.

Os resultados através da técnica adaptada desenvolvida por difusão em poço mostraram inicialmente que os hidrogéis apenas com Alg não obteve atividade antimicrobiana frente a nenhuma bactéria. No entanto, os hidrogéis testados nas concentrações de 4 e 8% a partir dos sistemas e soluções testadas: NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg, NBsAu e NPsAg apresentaram uma crescente inibição contra as bactérias Gram negativa e Gram positiva, estes resultado indicam ser bastante promissores. Para a concentração dos hidrogéis a 4%, os melhores resultados foram frente às bactérias Gram positivas *Staphylococcus epidermidis* –ATCC e MRSA, pois apresentaram uma crescente nos halos de inibição. Destacando os hidrogéis de (NBsAu+NPsAg)@Alg e NPsAg@Alg, a fim de que, estes indicaram melhores propriedades antibacteriana, conforme apresenta Tabela 4. Quanto à concentração dos hidrogéis a 8%, conforme apresenta na Tabela 5, os melhores resultados foram frente às bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*-UFPE e *Staphylococcus epidermidis* – ATCC, pois indicaram uma crescente nos halos de inibição, conforme apresentada na Figura 31a-b.

Tabela 4- Valores dos halos de inibição em (mm) para os hidrogéis a (8%), NBsAu e NPsAg que apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos.

Bactérias	Genta micina	NBsAu@Alg	NPsAg@Alg	(NBsAu+NPs Ag)@Alg	NBsAu	NPsAg
Concentração		4%	4%	4%	3,9%	2,1%
1-E. Coli - UFPE	21 mm	6 mm	10 mm	10 mm	6 mm	12 mm
2- Staphylococcus epidermidis-UFPE	23 mm	7 mm	12 mm	10 mm	-	14 mm
3- Staphylococcus aureus – UFPE	23 mm	8 mm	11 mm	11 mm	9 mm	14 mm
4- Staphylococcus epidermidis-ATCC	24 mm	8 mm	11 mm	13 mm	9 mm	15 mm
5- MRSA	23 mm	8 mm	12 mm	12 mm	8 mm	14 mm
6- Staphylococcus Aereus- ATCC	23 mm	7 mm	8 mm	7 mm	6 mm	8 mm
7- Pseudomonas Aeruginosas-UFPE	20 mm	9 mm	12 mm	10 mm	6 mm	10 mm

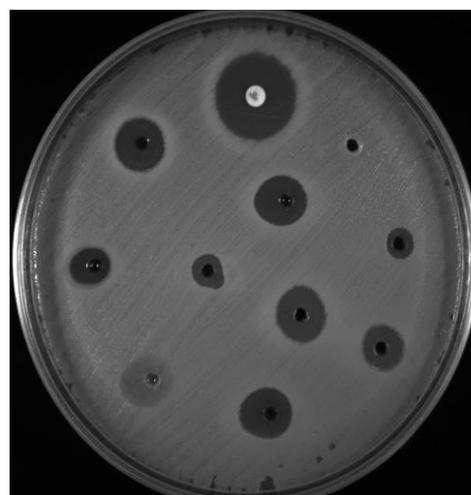
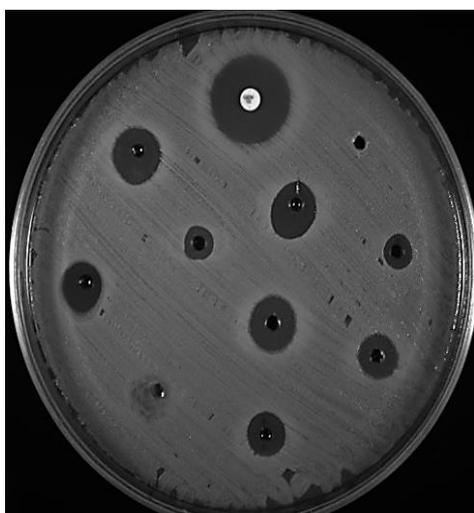
Tabela 5- Valores dos halos de inibição em (mm) para os hidrogéis a (8%), NBsAu e NPsAg que apresentaram atividade antimicrobiana contra os patógenos.

Bactérias	Gentamicina	NBsAu@Alg 8%	NPsAg@Alg 8%	(NBsAu+NPsAg)@Alg 8%	NBsAu 3,9%	NPsAg 2,1%
1- <i>E. Coli</i> - UFPE	21mm	-	11 mm	11 mm	6 mm	12 mm
2- <i>Staphylococcus epidermidis</i> -UFPE	23mm	-	12 mm	12 mm	-	14 mm
3- <i>Staphylococcus aureus</i> - UFPE	23 mm	11 mm	15 mm	13 mm	9 mm	14 mm
4- <i>Staphylococcus epidermidis</i> -ATCC	24 mm	16 mm	16 mm	15 mm	9 mm	15 mm
5- MRSA	23 mm	10 mm	11 mm	10 mm	8 mm	14 mm
6- <i>Staphylococcus Aereus</i> -ATCC	23 mm	8 mm	8 mm	11 mm	6 mm	8 mm
7- <i>Pseudomonas Aeruginosas</i> -UFPE	20 mm	10 mm	11 mm	12 mm	6 mm	10 mm

Figura 31- Atividade antimicrobiana obtida pela zona de inibição dos hidrogéis de: Alg, NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg na concentração de 8% do Alginato, e das soluções de NBsAu e NPsAg, frente as bactérias (a): *Staphylococcus Aereus*-UFPE e (b): *Staphylococcus Epidermidis*-ATCC, através do método de difusão em poço adaptado por Kirby-Bauer, 1966.

(a) *Staphylococcus Aereus*-UFPE

(b) *Staphylococcus Epidermidis*-ATCC



Os hidrogéis de: NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg, indicaram melhores propriedades antibacteriana, atribuído a uma boa interação entre o biopolímero alginato e as soluções de NBsAu e NPsAg, consequentemente um excelente efeito sinérgico no qual favoreceram as propriedades diante das bactérias

testadas. Pois, segundo relato descrito por Eghbalifam e colaboradores (2015), apresentaram em seu trabalho, filmes compósito de PVA/AS/Ag frente às duas bactérias Gram positiva e Gram negativa, *S. aureus* com halo de 2,1 mm e *E. coli* com halo de 3,2 mm, indicando menores halos quando comparado aos resultados deste trabalho, atribuída a uma maior zona de inibição dos hidrogéis nas concentrações testadas.

De acordo com Bindhu e Umadevi (2014), demonstraram em seu trabalho, um método de síntese verde para obtenção das nanopartículas de prata e realizaram teste antibacteriano, frente à bactéria Gram negativa, *E. coli* e uma Gram positiva, *Streptococcus aureus*. Os resultados apresentaram tamanhos diferentes no diâmetro de inibição, devido à sensibilidade diferencial de bactérias Gram negativas e Gram positivas com as nanopartículas de prata, pois possivelmente depende da sua estrutura celular, fisiologia, metabolismo e sua interação com as nanopartículas de prata carregadas positivamente (BINDHU;UMADEVI, 2014).

4.10 CONCLUSÕES PARCIAIS

Hidrogéis a partir de alginato de sódio nas diferentes concentrações (4%, 6% e 8%) foram obtidos através de um método fácil e de baixo custo. Assim como, a obtenção dos hidrogéis incorporando NBsAu, NPsAg e (NBsAu+NPsAg) também foram obtidos com sucesso.

De acordo com os testes reológicos, através do método rotacional, os resultados obtidos indicaram que houve um aumento da tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação, conforme aumentou a concentração do alginato em todos os hidrogéis.

A viscosidade de todos os hidrogéis diminuiu a medida que a taxa de deformação aumentou. Desta forma, os hidrogéis exibiram um comportamento de fluxo classificando como não newtoniano, com características de um material pseudo-plásticos. O hidrogel a 8% de massa do alginato de sódio foi o que obteve o melhor resultado, para todos os sistemas: NPsAg@Alg, NBsAu@Alg e (NBsAu+NPsAg)@Alg. De acordo com o método oscilatório, o módulo de armazenamento foi maior que o módulo de perda, a medida que a frequência angular aumentou, classificando os hidrogéis dessa região como sólidos viscoelástico. Os hidrogéis de NPsAg@Alg, apresentou melhor comportamento atribuído devido ao estabilizante PVP, assim como às interações de van der Waals. As caracterizações mecânicas e térmicas dos hidrogéis confirmaram também que estes tipos de interação foram predominantes.

A atividade antimicrobiana de todos os hidrogéis: NBsAu@Alg, NPsAg@Alg e NBsAu+NPsAg)@Alg em todas concentrações foram promissores frente as bactérias Gram positivas e Gram negativas, testadas por dois métodos diferentes, no método para CIM e CBM, os melhores resultados foram obtidos para os hidrogéis (NBsAu+NPsAg)@Alg e NBsAu@Alg, pois quando estabilizados com alginato de sódio, obtiveram efeito sinérgico. Para a técnica de difusão em poço o hidrogel de NPsAg@Alg obteve maior halo de inibição, o que resultou maior efeito antibacteriano frente as bactérias Gram positivas.

Diante dos resultados apresentados, os hidrogéis de alginato de sódio, com nanobastões de ouro e nanopartícula de prata são eficientes devido às propriedades apresentadas, com a proposta da utilização deste hidrogéis, um novo biomaterial como propriedades antimicrobianas com potencial aplicação na área biomédica.

4.11 PERSPECTIVAS

- ✚ Realizar atividade antimicrobiana para os hidrogéis frente à bactéria *Streptococcus mutans*;

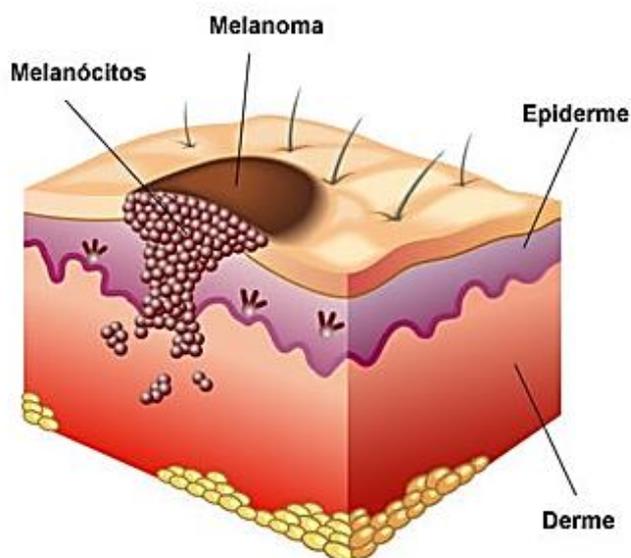
- ✚ Desenvolver biomateriais estruturados (*scaffolds*) a partir dos hidrogéis;

5 SÍNTESES DE GÉIS HÍBRIDOS A BASE DO ALGINATO DE SÓDIO RETICULADO COM EDC/NHS, ASSOCIADAS ÀS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (NPSAG E NBSAU) E CONJUGADO COM A PROTOPORFIRINA IX, VISANDO APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA EM CÂNCER DE PELE

5.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E OBJETIVOS

O câncer de pele é o mais comum em humanos, particularmente na população branca, com mais de um milhão de casos detectados a cada ano (D'ORAZIO et al., 2013; ROGERS et al., 2010). Ele é nomeado de acordo com a célula de origem e o comportamento clínico, ele possui três tipos comuns: os carcinomas basocelulares (CBCs) e os carcinomas epidermóides (CECs) (ambos também denominados câncer de pele não melanocítico - CPNM) e os melanomas malignos cutâneos (CMs) (também indicado como melanoma maligno da pele ou melanoma) (D'ORAZIO et al., 2013; NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010). O câncer de pele não melanoma é o mais frequente no Brasil e corresponde a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país e apresenta altos percentuais de cura, se for detectado e tratado precocemente. Entre os tumores de pele, é o mais frequente e de menor mortalidade, porém, se não tratado adequadamente pode deixar mutilações bastante expressivas. Mais comum em pessoas com mais de 40 anos, o câncer de pele é raro em crianças e negros, com exceção daqueles já portadores de doenças cutâneas. O câncer de pele não melanoma apresenta tumores de diferentes tipos. O câncer de pele melanoma tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele) e é mais frequente em adultos brancos. O melanoma pode aparecer em qualquer parte do corpo, na pele ou mucosas, na forma de manchas, pintas ou sinais. O melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão (Figura 32). É o tipo mais grave, devido à sua alta possibilidade de provocar metástase (disseminação do câncer para outros órgãos). O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom se detectado em sua fase inicial. Nos últimos anos, houve grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor e à introdução dos novos medicamentos imunoterápicos (INCA, 2018).

Figura 32- Estrutura do melanoma. Fonte adaptada por (DHINAGAR; CELENK; AKINLAR, 2011; WU et al., 2014).



5.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento alternativo para câncer e lesões não cancerígenas. Células malignas e anormais são destruídas pela presença de drogas fotossensíveis (fotossensibilizador) (FS), gerando espécies de oxigênio singlete e oxigênio reativo quando a luz no comprimento de onda apropriado é aplicada (KÜBLER, 2005). A PDT exibe várias vantagens sobre as modalidades padrão de tratamento tumoral como: cirurgia, quimioterapia e radioterapia devido a ser minimamente invasivo desprovido de efeitos colaterais graves, o que acarreta um bom resultado estético e muitas vezes melhora a qualidade de vida do paciente (KÜBLER, 2005).

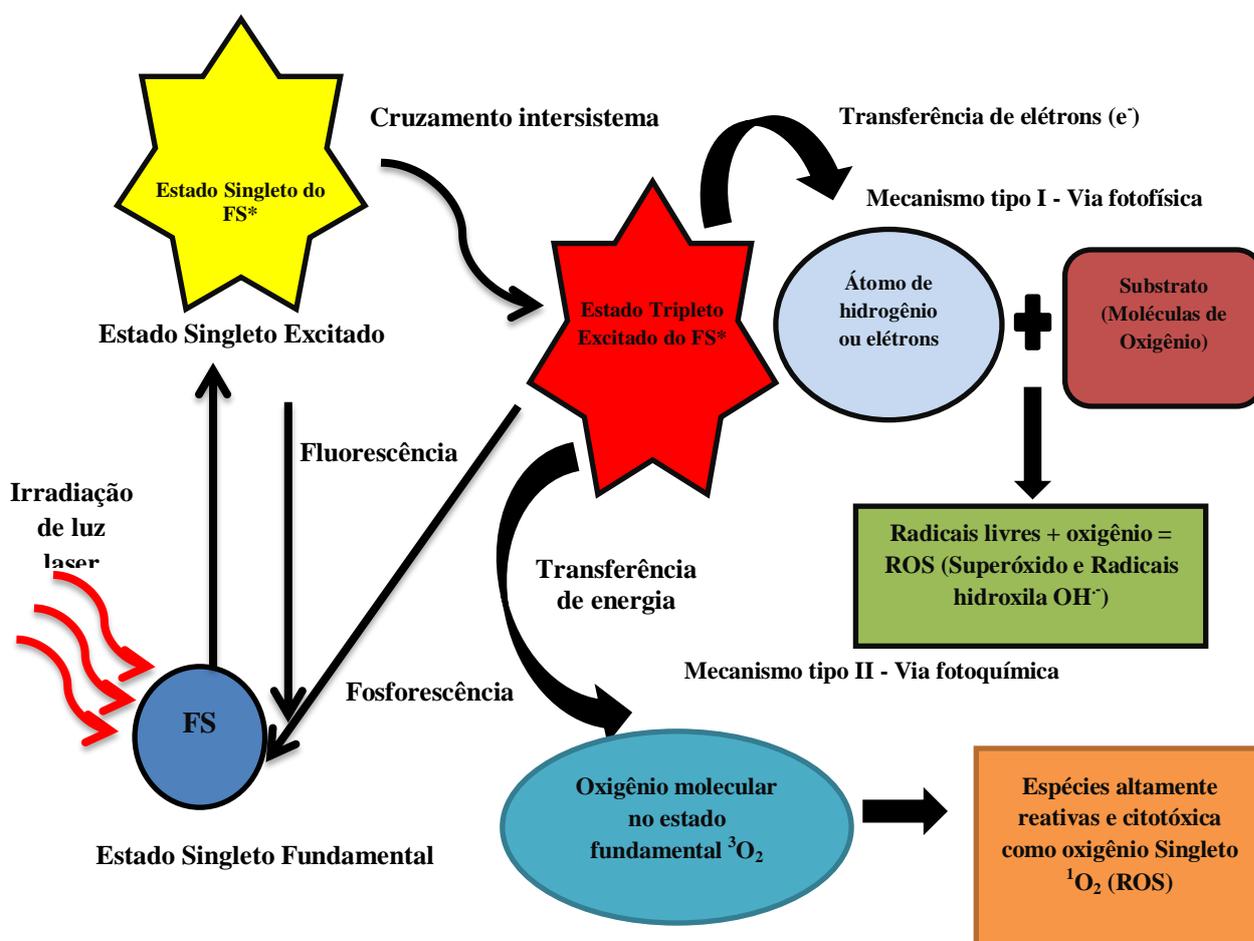
Alguns estudos relatam que a terapia fotodinâmica pode ser combinada a outras técnicas que surge como alternativa de apresentar grande potencial a enfrentar os desafios complexos inerentes ao tratamento de câncer (JIA et al., 2016; ZHANG et al., 2016). A fototeranóstica que se refere ao diagnóstico através da aplicação de luz, com o tratamento terapêutico simultâneo da doença é uma técnica promissora e interdisciplinar para tumor guiado a tratamento por imagem, devido à melhoria na geração de luz e não ser invasivo (GU et al., 2013; NG; ZHENG, 2015). Estes agentes multifuncionais fototeranósticos estão sendo cada vez mais usados no diagnóstico e tratamento de vários

tipos de câncer (FERNANDEZ-FERNANDEZ; MANCHANDA; MCGORON, 2011; BHAUMIK et al., 2015; LI et al., 2018; CHENG et al., 2019). Sabe-se que na terapia fotodinâmica, o fotossensibilizador (FS), atua como um componente-chave, ao transferir energia de luz para o oxigênio circundante (ETHIRAJAN, et al., 2011; LIANG et al., 2011; GUO et al., 2014), produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e induzir dano irreversível de células cancerígenas, e conseguindo uma eficaz ablação do tumor (GE et al., 2014).

A definição comum de FS é descrita como uma substância sensível à luz capaz de absorver um comprimento de onda específico e transformá-lo em uma forma útil de energia, a eficiência depende do comprimento de onda da luz, da profundidade de penetração da luz no tecido, da escala de absorção do FS e da produção de ROS (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). Algumas restrições dependem do tipo do (FS), na qual incluem fotossensibilidade prolongada da pele, limitada seletividade, eficiência muito baixa ou muito alta (BROWN; BROWN; WALKER, 2004; VAN DUIJNHOFEN, 2003). Existem quatro principais classes de fotossensibilizadores como: derivados porfirínicos, clorinas, ftalocianinas e porfíricos, uma vez que eles exibem propriedades fotoquímicas e fotofísicas diferentes em termos de mecanismos de ação e ativação da luz (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). Normalmente, a droga fotossensibilizante é administrada a um paciente, ela pode acumular-se ativa ou passivamente em um local específico do tumor, absorvida e excitada pela luz de irradiação a laser com comprimento de onda adequado (VAROL, 2015). A atividade fotodinâmica dos fotossensibilizadores (FSs) é baseada em mecanismos foto-oxidativos, pois causam vários efeitos bioquímicos e ocorrem reações morfológicas que induzem a citotoxicidade do tumor conforme ilustrado na (Figura 33) (BAPTISTA et al., 2017). Inicialmente, um FS no estado fundamental absorve fóton sendo ativado para um estado excitado singlete após irradiação de luz (HONG; CHOI; SHIMN, 2016). O estado singlete excitado do FS pode ser convertido um estado tripleto por uma mudança no spin de elétrons conhecido como cruzamento intersistema (BAPTISTA et al., 2017). O estado tripleto do FS, por sua vez, pode interagir com moléculas de oxigênio circundantes e assim produzir ROS através de duas vias diferentes. Na primeira via as reações englobam a transferência de qualquer átomo hidrogênio ou um elétron, entre o FS excitado e os substratos, levando à geração de radicais livres (HONG; CHOI; SHIMN, 2016; BAPTISTA et al., 2017). Estes radicais livres reagem com oxigênio,

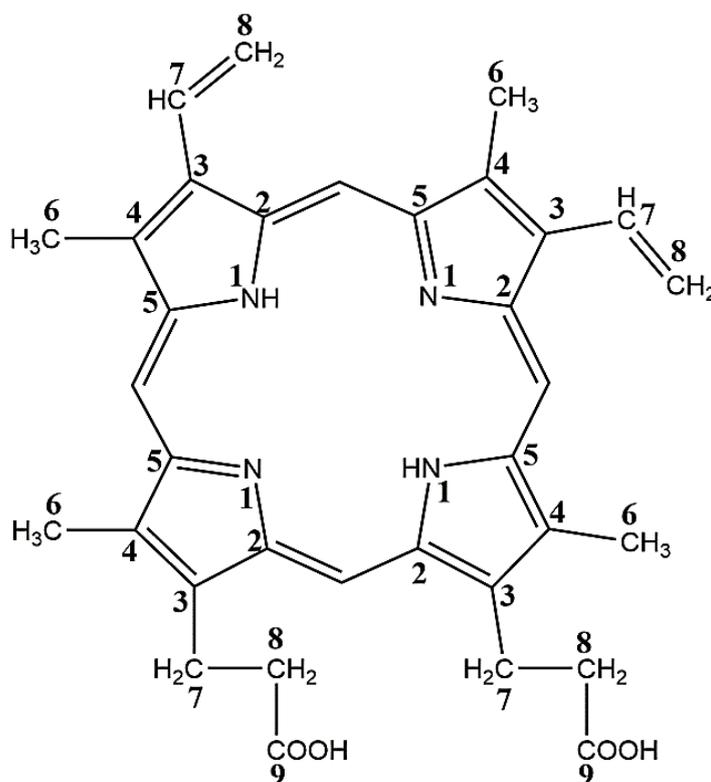
resultando na produção de ROS, como superóxido, reações redox e radicais hidroxilas (HONG;CHOI;SHIMN, 2016). Na segunda via, as reações envolvem a transferência de energia entre o FS excitado e o oxigênio molecular no estado fundamental ($^3\text{O}_2$), resultando na formação de um estado altamente reativo como o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (BAPTISTA et al., 2017). O ROS resultante, por sua vez causa danos irreversíveis aos tecidos/células tumorais (OLIVEIRA et al., 2011). As espécies de oxigênio singleto têm uma alta reatividade e meia-vida curta, e durante aplicações da PDT, somente aqueles substratos biológicos que estão perto da região do tumor são afetados, no entanto, os tecidos saudáveis circundantes geralmente permanecem ilesos (MROZ et al., 2011).

Figura 33- As vias seguem o mecanismo (**tipo I**) fotofísico e (**tipo II**) fotoquímico para a terapia fotodinâmica, através de irradiação de luz laser para excitação do fotossensibilizador obtendo a geração de espécies reativas de oxigênio e oxigênio singleto. Adaptado de MOKWENA et al., (2018).



As Protoporfirinas (PpIX) são conhecidas como, nanoagente fototeranóstico e também consideradas como bom agente fotossensibilizante, usado clinicamente na terapia fotodinâmica (TFD) e tratamento de tumores (KANTONIS; TRIKERIOTIS; GHANOTAKIS, 2007; DING et al., 2011), dentre eles o câncer de pele melanoma e não-melanoma (BRAATHEN et al., 2007; SIDOROFF & THALER, 2010) a PpIX foi considerada como o primeiro agente fotodinâmico tópico a receber aprovação regulatória através da administração de alimentos e medicamentos dos EUA (FDA), desde 1999, como também no tratamento dermatológico de queratose, carcinomas (por exemplo, doença de Bowen e Paget), assim como para psoríase (CASAS et al., 2001). Ela pertence às classes das porfirinas endógenas e são aceitáveis devido à citotoxicidade ser mediada pela formação de espécies de oxigênio altamente reativas, como o oxigênio singlete, $^1\text{O}_2$, (YANO et al., 2011). A estrutura da PpIX é substituída por grupos metila, vinila e $(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$, a nomenclatura oficial para a PpIX é ácido 1,3,5,8- tetrametil-2,4-divinilporfirina-6,7-divinilpropionico (KRAMMER & ÜBERRIEGLER, 1996) (Figura 34).

Figura 34- Estrutura Química da Protoporfirina IX. **Fonte:** O autor adaptada de (KRAMMER; ÜBERRIEGLER, 1996).



Há um grande interesse, no desenvolvimento de diferentes biomateriais aplicado na área da TFD, pois a incorporação do fotossensibilizador na estrutura de rede 3D do hidrogel acarreta estes materiais obter bons sistemas fotodinâmicos, devido à reticulação química, atribuído também ao alto potencial do fotossensibilizador que se acumula seletivamente em células cancerígenas (KARIMI, KHODADADI e HADIZADEH, 2016; KURUPPUARACHCHI et al., 2011; WANG et al., 2013; DAI et al., 2014). Assim, os hidrogéis oferecem boas características de como ser injetável, solúvel em água, bons portadores para os FSs não agregados, com intuito de uma alta produção de oxigênio singlete (BELALI et al., 2018). Estudo da literatura descrito por Belali e colaboradores (BELALI; KARIMI; HADIZADEH, 2017), reportaram que compostos porfirínicos podem ser modificadas através de funcionalização e reticulação covalentes, com o intuito de obter hidrogéis mais fortes e bem conjugados ao introduzir em diversos polímeros visando aplicações específicas, uma vez que, hidrogéis poliméricos são recomendados como sistemas de transportadores bastante promissores para a entrega controlada de fotossensibilizadores hidrofóbico (SWIERCZEWSKA et al., 2016, GAWARE et al., 2013). Há um grande interesse no desenvolvimento de sistemas híbridos e moléculas multifuncionais com a incorporação de fotossensibilizadores na estrutura de hidrogéis e de nanopartículas metálicas para obtenção de sistemas fotodinâmicos (KARIMI; KHODADADI; HADIZADEH, 2016; KURUPPUARACHCHI et al., 2011; WANG et al., 2013; DAI et al., 2014).

5.3 TERAPIA FOTOTÉRMICA

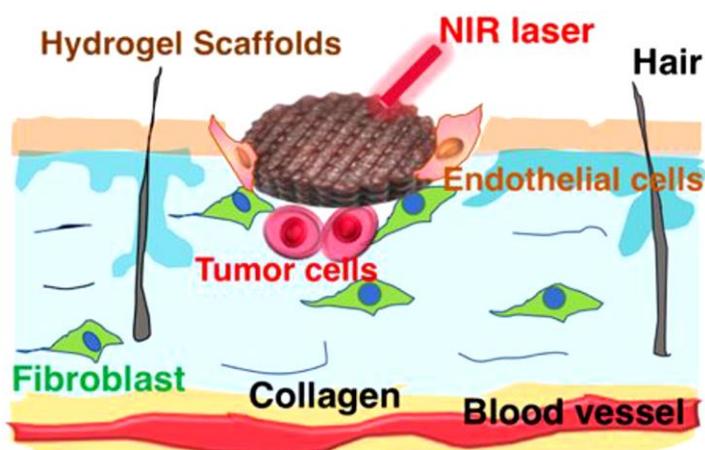
Outra terapia amplamente explorada como alternativa promissora para muitos tumores malignos é a terapia fototérmica (TFT), ela consiste em um tipo de tratamento por hipertermia que utiliza agentes fototérmicos para produzir calor local sob irradiação na região infravermelho próximo (NIR), levando posteriormente à termoablação de células tumorigênicas (CHEN et al., 2017^a). Uma das variedades de materiais nanoestruturados que pode ser utilizados como agentes fototérmicos são as nanopartículas de ouro (NpsAu) e nanobastões de ouro (NbsAu) (HUANG et al., 2008; ALKILANY et al., 2009). Estas nanopartículas plasmônicas podem atuar como excelentes eficientes transdutores fototérmicos convertendo a luz absorvida pela superfície de ressonância plasmônica em calor, causando hipertermia localizada (ZHAROV; GALITOVSKY; VIEGAS, 2003). Particularmente, os nanobastões de ouro (NBsAu) estão sendo bastante estudados em TFT, devido as suas ótimas propriedades do efeito de

ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR), que varia numa larga faixa espectral da região visível a infravermelho próximo (NIR) (ZHAO et al., 2017; LUO et al., 2016). Novas sínteses com excelentes funcionalização são encontradas nos NbsAu e várias aplicações tanto industriais quanto comerciais vem sendo eficientes, pois são materiais úteis em terapia fototérmica, entrega de drogas e imagem na área biomédica (MA et al., 2013).

5.4 OBTENÇÃO DE BIOMATERIAIS ESTRUTURADOS A PARTIR DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS, REALIZANDO TESTES *IN VITRO* E *IN VIVO* EM LINHAGENS CELULARES

Varios relatos demonstram o interesse de obter novas plataformas incluindo os hidrogéis, géis, nanocarreadores, nanohíbridos e nanocompósito com intuito de adquirir potencial através de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, Ma e colaboradores (2019), apresentaram em seu trabalho biomateriais com intuito de obter *scaffolds* a partir de hidrogéis, com extrato de semente de uva, rico em flavanóides, nanofios de silicatos de cálcio e alginato de sódio utilizados como promissores agentes fototérmicos, visando à aplicação dos testes *in vitro* e *in vivo* com a linhagem celular B16-F10, na qual apresentaram excelentes biocompatibilidade, bioatividade, proporcionando uma possibilidade terapia de melanoma assim como em cicratização de feridas (Figura 35) (MA et al., 2019).

Figura 35- *Scaffolds* a partir de hidrogel envolvendo agente fototérmico natural a partir do extrato da semente de uva, aplicada em terapia melanona e cicratização de feridas (MA et al., 2019).



Ainda neste contexto, novos nanocompositos foram fabricados a partir de uma resina híbrida biopoliméricas, incorporando diferentes concentrações de nanopartículas de ouro estabilizadas com PVP, que resultou um efeito considerável sobre o comportamento dos *scaffolds* híbridos, pois melhoraram suas propriedades, como aumento da rigidez, boa estabilidade térmica, atividade catalítica e propriedades ópticas. Os *scaffolds* foram obtidos para a entrega localizada durante regeneração de tecidos, bem como tratamento de câncer através de testes *in vitro* e *in vivo*, sua aplicação visa testar o efeito fototérmico após incorporar as NpsAu, com a finalidade de obter novos *scaffolds* biopoliméricos (ABDELRASOUL et al., 2015).

Ziv e colaboradores (2014) apresentaram em seu trabalho novo *scaffolds* obtidos a partir de um hidrogel híbrido a base de seda e alginato, suas características promissoras foram atribuídas a uma gelificação rápida, hidrogel fisicamente estável, bem como a finalidade de encontrar boas propriedades mecânicas dos *scaffolds* (ZIV et al., 2014). Este estudo indicou através dos testes *in vivo*, grande potencial para ser utilizado na aplicação em regeneração de tecido com células-tronco e órgãos impressos a partir de redes poliméricas em 3D (LEONG et al., 2013).

Outra abordagem sobre redes 3D de hidrogel reticulado covalentemente com macromoléculas oferece a capacidade de encapsular esta classe através de ligações cruzadas na estrutura do hidrogel. A reticulação do biopolímero natural da quitosana ocorre via ligação à base de Schiff, esta é considerada uma abordagem interessante para a síntese de um novo hidrogel atribuídas às características importantes (KARIMI; KHODADADI, 2016),(SHI et al., 2014). Uma vez que, devido ao maior efeito de permeabilidade e retenção dos polímeros naturais, os hidrogéis podem ser acumulados preferencialmente no tecido tumoral, particularmente nas invasões tumorais (QIN; ZONG; KOPELMAN, 2014). Algumas vantagens de sistemas entre hidrogel reticulado com porfirinas consiste na distribuição homogênea dos PSs e a capacidade de reformar um hidrogel integral após a injeção no local de destino. (DING et al., 2010),(YANG et al., 2012),(KARIMI; KHODADADI, 2016)

Sabe-se que os hidrogéis são polímeros 3-D hidrofílicos que surgiram como ferramentas úteis e podem ser aplicados em sistemas de entrega de drogas (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). A reticulação covalente de alginatos produz matrizes com boas propriedades mecânicas, este tipo de reticulação é uma estratégia atraente, criando redes mais estáveis e robustas na estrutura de géis reticulados covalentemente, alguns agentes

químicos de acoplamento como o EDC/NHS podem ser utilizados em síntese de alginatos, através da ativação do grupo ácido carboxílico presente no biopolímero, o que favorece a obtenção de ligação cruzada dos géis (YANG et al., 2012; PAWAR; EDGAR 2013; CHOLEWINSKI et al., 2017). Desta forma, géis reticulados covalentemente obtidos a partir de polissacarídeos naturais como o alginato e quitosana, surgem como fortes candidatos em diversas aplicações biológicas, biomédicas, engenharia de tecido, sistema de entrega de drogas e terapias fotodinâmicas (CHEN et al., 2017; BELALI; KARIMI; HADIZADEH, 2017; BELALI et al., 2018).

Matrizes poliméricas a partir do alginato de sódio (SA) e álcool polivinílico (PVA), podem reticular ionicamente com as nanopartículas de prata (NpsAg), que devido a uma reticulação física influenciar a estabilização das NpsAg no nanocompósito polimérico (NARAYANAN; HAN, 2017). Os polissacarídeos naturais também podem interagir com as nanopartículas de ouro e nanobastões de ouro, pois a presença de uma variedade de grupos funcionais em sua estrutura auxilia as interações favoráveis entre eles, na qual é responsável pela estabilização das NbsAu e NpsAu, bem como locais para futuras modificações químicas (ERATHODIYIL; YING, 2011; LIU et al., 2013). As NPs metálicas são exploradas nos organismos devido a sua biocompatibilidade (BHATTACHARYA; MUKHERJEE, 2008). Os nanobastões de ouro (NbsAu) estão tendo 20 vezes mais eficiência na absorção óptica do que as NpsAu do mesmo volume (COPLAND et al., 2004) e possuem uma forte afinidade de ligação, permitindo que eles sejam conjugados com várias biomoléculas (LIAO; HAFNER, 2005). As nanopartículas de ouro (NpsAu), nanobastões de ouro (NbsAu) e nanopartículas de prata (NpsAg) devido a apresentarem excelentes propriedades podem ser conjugadas a vários polímeros com intuito de obter novas plataformas multifuncionais visando alternativas para aplicações biológicas, biomédicas, terapias fototérmicas e fotodinâmicas (HUANG; NERETINA; EL-SAYED, 2009).

Recentemente, diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* são sobre hidrogéis a base de alginato, quitosana e outros polímeros, são bastante explorados devidos às boas propriedades, conforme apresentaram Liu e colaboradores (2017) em seu trabalho, hidrogéis termorresistentes a base de alginato e copolímero poli (N- isopropilacrilamida) com intuito de produzir micelas encapsuladas e carreando a droga anticâncer DOX, este hidrogel, foi atribuído como grande potencial para liberação e entrega eficaz e surge como grande potencial no tratamento contra o câncer (LIU et al., 2017). Testes *in vitro* e

in vivo a partir do hidrogel de alginato de sódio oxidado, reticulado com dopamina e poliacrilamida, surge como candidato para curativos devido à abundância de grupos catecol nas cadeias do biopolímero e possuir boas propriedades, como flexibilidade, elasticidade, biocompatibilidade, foi desenvolvido para obter uma boa adesividade tecidual, beneficiando a aplicação em curativos, promover a regeneração tecidual e acelerar o processo de cicatrização em feridas, indicando o hidrogel como um biomaterial muito adequado e promissor para curativo em feridas. (CHEN et al., 2018).

As nanopartículas metálicas incluindo os nanobastões de ouro, são bastante discutido devido a sua aplicabilidade biológica, biomédica e por apresentar uma certa toxicidade aparente em linhagens celulares cultivadas através dos testes *in vitro* e *in vivo*, uma vez que estudo celulares *in vitro* fornece uma compreensão inicial e interação biológica dos nanomateriais (LEWINSKI; COLVIN; DREZEK, 2008). Estudo descrito por Freitas e colaboradores (2017) sobre obtenção de um complexo com nanobastões de ouro coberto a ftalocianinas, para testes *in vitro* frente à linhagem celular de melanomas (linhagem celular B16-F10), obtiveram bons resultados e efeito eficazes da terapia fotodinâmica e fototérmica, este trabalho indica que os plasmons de superfície dos nanobastões de ouro, contribuíram de alguma forma através da transferência da energia térmica e/ou dos elétrons para o fotossensibilizador o que pode ter levado a eficiência da geração das espécies reativas, especialmente geração de oxigênio singleto (FREITAS et al., 2017; KAH et al., 2008). Alguns relatos afirmam que a hipertemia após a terapia fotodinâmica aumenta a eficácia de ambos os tratamentos, devido a um efeito sinérgico uma vez que a TFD induz danos mitocôndrias, enquanto a hipertemia induz danos em outra organela, como núcleo e membrana plasmática que não são oxidados pelo oxigênio singleto produzidos na mitocôndrias (YANASE et al., 2009). Recentemente, Hao e colaboradores (2019), afirmaram que as nanopartículas de prata e de ouro surgiram como uma nova modalidade terapêutica devido a sua alta estabilidade, alta eficiência de conversão fototérmica. Nanopartículas ramificadas de Au-Ag revestida com polidopamina (Au-Ag@PDA), apresentaram efeito fototérmicos *in vitro* e *in vivo* nas linhagens celulares de câncer colorretal HCT-116 e os resultados sugeriram que o conjugado inibiu a proliferação celular e induziu a apoptose em células cancerígenas (HAO et al., 2019).

Vários estudos sobre testes *in vitro* envolvendo fotossensibilizadores também foram explorados e relatados com alguns tipos de macrociclos, como a porfirina e protoporfirina IX, estes fármacos apresentam boa citotoxicidade apenas na presença de luz. Estudo sobre nanohíbridos biocompatíveis entre ácido linoléico (PLLA) conjugado com a protoporfirina-IX e PpIX-POSS, apresentaram boa fototoxicidade após a irradiação com laser, os resultados sugeriram que ao incorporar a PpIX nas moléculas do nanohíbrido conjugado, melhoram a eficácia da terapia fotodinâmica em células cancerígenas. Esses materiais nanoestruturados aumentaram a absorção intracelular de fotossensibilizador devido à melhor solubilidade em água, indicando que os nanohíbridos podem contribuir para o desenvolvimento de uma nova geração de portadores de fotossensibilizadores, para o tratamento do câncer via TFD e contra câncer gástrico (LEE & KIM, 2016).

Belali e colaboradores (2017) propuseram em seu trabalho, hidrogéis nanoestruturados de poli (N-isopropilacrilamida) conjugado com a porfirina, um sistema promissor aplicado para terapia fotodinâmica e testes *in vitro*, na qual sugere atividade celular frente às células A453. Os hidrogéis exibiram viabilidade celular acima de 97%, e não apresentaram citotóxicidade na ausência de luz, sugerindo boa biocompatibilidade nas células testada. Ainda neste trabalho, os resultados sobre a porfirina pura exibiu uma atividade citotóxica relativamente pequena, entretanto os hidrogéis quando irradiados a 660 nm por 25 min, melhoraram muito a fotocitotoxicidade e induziram 40% de morte celular. A toxicidade do hidrogel foi significativamente maior quando comparado com a porfirina livre e sugere que as células cancerosas foram mortas pelas espécies reativas de oxigênio produzidas no núcleo da porfirina na estrutura de hidrogel sob irradiação de luz (BELALI; KARIMI; HADIZADEH, 2017).

Outro trabalho com mesmo grupo de pesquisa foi realizado com a ideia de obter um hidrogel à base de quitosana conjugado com duas classes de porfirina via ligação base Schiff e funcionalizado com folato, este novo conjugado foi testado como um sistema para entrega de fotossensibilizante em alta eficiência aplicada na terapia fotodinâmica, com intuito de realizar testes *in vitro* em dois tipos de linhagem de células cancerígenas, de fígado (HepG 2) e mama (MCF-7). Células HepG 2 tratadas com o hidrogéis de quitosana reticulada com Tetrakis (4-aminofenil) porfirina, e também um outro hidrogel com grupo folato presente, QUI/NH₂-TPP e QUI/NH₂-TPP/FA mostraram viabilidade celular de 94%, indicando a natureza biocompatível e não-tóxica

dos hidrogéis na ausência de luz, no entanto, quando irradiado no laser de 660 nm por 20 min, induziram 55% de morte celular, o que demonstra capacidade de matar seletivamente as células cancerígenas. Uma observação interessante ainda nesse estudo foi em relação à viabilidade celular cair acentuadamente para o hidrogel QUI/NH₂-TPP/FA em comparação com o QUI/NH₂-TPP após a irradiação, atribuída a receptores superexpressos de folato em células MCF-7, na qual leva uma maior captação celular desses hidrogéis em MCF-7 e resulta em maior citotoxicidade ((BELALI; KARIMI; HADIZADEH, 2018).

Desta forma, o objetivo geral deste capítulo, propõe explorar a obtenção de géis como novo sistema multifuncional a partir do alginato de sódio reticulado com agentes químicos (EDC/NHS), associados com nanopartículas de prata (NpsAg), nanobastões de ouro (NbsAu) conjugado com o fotossensibilizador protoporfirina (PpIX), através do efeito fotodinâmico e fototérmico, aplicada na terapia câncer de pele.

Com isso pretendeu-se:

- ✚ Obter géis híbridos a base de alginato de sódio reticulado com o EDC/NHS, através de uma síntese em duas etapas com preparação simples, associados a nanopartículas de prata e nanobastões de ouro conjugado com a Protoporfirina IX;
- ✚ Realizar Análise Reológica dos géis;
- ✚ Caracterizar os géis através das técnicas de: FT-IR, RMN-H¹, TGA, DSC, UV-Vis-NIR, MEV e TEM;
- ✚ Verificar as propriedades fotodinâmica e fototérmica dos géis híbridos conjugados;
- ✚ Avaliar efeitos da terapia fotodinâmica e quimiofototérmal *in vitro* de géis híbridos conjugados;
- ✚ Realizar testes *in vitro* com a linhagem celular de macrófago murinho, RAW 264,7 e melanoma (B16-F10) para o tratamento de câncer de pele.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 MATERIAIS

Todos os reagentes usados são analiticamente puros. Os reagentes Alginato de sódio ($C_6H_7O_6Na$) MW = 100.000 g/mol, ácido manurônico (61%), ácido gulurônico (39%) (relação M/G = 1,56), Ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), Ácido cloroáurico ($HauCl_4$), boro hidreto de sódio ($NaBH_4$), citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$), CTAB ($C_{16}H_{33}N$), Polivinilpirrolidona [$(C_6H_9NO)_n$], N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimide hidrócloride ($C_8H_{17}N_3.HCl$), N-hidroxisuccinimida ($C_4H_5NO_3$), foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ácido sulfúrico (H_2SO_4) que foi adquirido da Micro-Chemistry. Todos os reagentes foram utilizados sem mais purificação.

6.2 PREPARAÇÃO DE SÍNTESE DOS NANOBASTÕES DE OURO

1ª etapa: Crescimento da semente

Inicialmente, com auxílio de um pipetador automático, 250 μ L de uma solução a 10 mM de $HauCl_4$ foram adicionadas a 7,5 mL da solução 0,1M de CTAB em um béquer de 100 mL, mantida sob agitação magnética por cinco minutos. Após este tempo, com auxílio de uma pipeta automática adicionou 600 μ L de uma solução a 0,01 M de $NaBH_4$ e deixou sob agitação contínua por um minuto (LANH et al., 2015).

2ª etapa: Crescimento dos nanobastões de ouro

Inicialmente, através da pipeta automática 5 mL da solução do $HauCl_4$ a 10 mM, 2 mL da solução a 0,5 M de H_2SO_4 , 1 mL da solução de $AgNO_3$ a 10 mM e 0,8 mL da solução a 0,1 M de ácido ascórbico, foram adicionadas em 100 mL da solução de CTAB em um béquer de 200 mL e mantidas sob agitação, até mudar a coloração para incolor. Em seguida, pipetou-se 240 μ L da solução semente realizada na 1ª etapa e adicionou na 2ª etapa (crescimento dos nanobastões de ouro) deixando em repouso por 12 horas, onde a suspensão final foi lavada duas vezes com água destilada através de uma centrifuga (LANH et al., 2015).

6.3 PREPARAÇÃO DE SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS COLOIDAIS DE PRATA

Inicialmente, foi aquecido 125 mL da solução de nitrato de prata (AgNO_3) com concentração de 1mM em um erlenmeyer até que ocorra ebulição em seguida, utilizando pipeta de pasteur, adicionou 5 mL do citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), solução a 1% na proporção de uma gota por segundo, a solução foi mantida em ebulição até que ocorra a transição de cor para (amarelo pálido), esta coloração é indicio da formação das nanopartículas, o erlenmeyer foi mantido sobre a chapa de aquecimento, depois foi feito o desligamento e a solução chega coloração amarelo, a mesma foi arrefecida lentamente sob agitação em um banho em baixas temperatura (LEE & MEISEL, 1982; TURKEVICH et al.,1951).

6.4 PREPARAÇÃO DA SÍNTESE DO GEL HÍBRIDO CONJUGADO PpIX@Alg

Inicialmente, 12 mg de PpIX foram adicionadas em 4,2 mL de DMSO. Em seguida introduziu 6 mg de N-(3-Dimetil amino propil) –N' etil carbodiimida (EDC) e 3 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) para ativação dos grupos carboxílicos da PpIX (LEE; KIM, 2016). Logo após, 4 mL de EDTA foram adicionados para funcionalização e deixou-se por 24 h sob agitação constante a $T = 60^\circ\text{C}$ (FAN et al., 2016). O produto foi lavado com água ultra pura e centrifugado (6000 rpm/30 min) por três vezes. O precipitado obtido foi liofilizado durante 24 h. Para obtenção do gel PpIX@Alg, 200 mg de SA, 100 mg de EDC e 30 mg de NHS foram misturadas em 4 mL de água ultra pura por 3 h em agitação constante e $T = 40^\circ\text{C}$ (FAN et al.,2016). Para obtenção do gel de Alg conjugado com EDC/NHS, adicionou 1 mL da PpIX ativada e funcionalizada, a reação foi mantida por 4-6 h para produzir o gel de SA conjugado com EDC/NHS incorporando solução da PpIX ativado.

6.5 SÍNTESE DA PpIX@(NPsAg@Alg) E PpIX@(NBsAu+ NpsAg)@Alg

Para obtenção do gel de Alg conjugado as NpsAg (sol. 1) e NbsAu+NpsAg (sol. 2), partiu inicialmente de 200 mg de AS, 100 mg de EDC e 30 mg de NHS e adicionou-se 4 mL da (solução 1) sob agitação constante (3h) e TA FAN et al., (2016), e adaptações. Para o gel de Alg@(NBsAu+NPsAg), utilizou-se 4 mL da (sol. 2) e seguiu a mesma metodologia citada acima. Em seguida, adicionou 1 mL da PpIX ativada, a reação foi mantida por 4-6 h para obtenção dos géis híbridos conjugados.

7 CARACTERIZAÇÕES

7.1 ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL (UV-VIS)- (NIR).

O equipamento utilizado para obtenção dos espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e infravermelho próximo (NIR), foi o espectrofotômetro UV-Visível do modelo UV-2600 da empresa Shimadzu, operando na faixa de (1400-185nm), com lâmpada de deutério (D₂) e halogênio tungstênio (WI). O software UV Probe 2.5 foi utilizado para fornecer os comandos operacionais do equipamento e projeção dos resultados. As medidas, para as amostras liofilizadas dos géis foram realizadas utilizando a esfera integradora ISR-2600Plus, como acessório pelo qual foi possível fazer absorvância e reflectância das amostras utilizando dois detectores. Como as amostras foram sólidas foi utilizado o método de reflectância difusa e logo em seguida utilizou o método Kubelka-Munk para transformar a percentagem de reflectância em absorvância [$F_{\infty} = (1-R)^2/2R$]. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Polímeros Não-Convencionais do Departamento de Física da UFPE.

7.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho dos géis secos foram obtidos através do método FT-IR com acessório de UATR (Acessório Universal de Amostragem com o braço de pressão). O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro com transformada de Fourier da Perkin Elmer (modelo: Spectrum 400, N° de série: 82287) na região entre 4000 e 400 cm⁻¹. A resolução espectral foi de 2 cm⁻¹ e 64 acumulações. Estas análises foram realizadas no Laboratório de Combustíveis (LAC) do Departamento de Engenharia Química da UFPE.

7.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Todos os espectros de RMN dos géis foram obtidos utilizando um espectrômetro de ressonância magnética nuclear, modelo VARIAN Unity Plus, operando a 300 MHz, os núcleos de ¹H e ¹³C, as amostras foram solubizada em água deuterada (H₂D) e DMSO-d₆. Estas análises foram realizadas na Central Analítica do departamento de Química Fundamental da UFPE.

7.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

As medidas de avaliação da estabilidade térmica foi determinada via análise termogravimétrica em um analisador termogravimétrico da Shimadzu, modelo TGA 60/60H utilizando porta amostra de alumina, fluxo de 50 mL/min de N₂ com taxa de aquecimento de 50 °C/min até 500°C. As medidas foram realizadas no Laboratório de Terras Raras (BRTR-Giba) do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

7.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL POR VARREDURA (DSC)

Curvas de fluxo de calor foram obtidas em um calorímetro diferencial de varredura, modelo 1 Star^{*system} (Mettler Toledo) sob atmosfera de nitrogênio. Com aquecimento de 0°C a 300°C, com taxa de 10°C/min e fluxo de gás 50 milímetros por minutos. As medidas foram realizadas no Laboratório de cromatografia Instrumental no Departamento de Engenharia Química da da UFPE.

7.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia das amostras dos géis híbridos foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram previamente fixadas a um pedaço de fita adesiva dupla face de carbono apoiada sobre um suporte metálico. As imagens de MEV foram obtidas no Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), usando um microscópio da Tescan, modelo Mira 3, com voltagem de 10 kV.

7.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)

A morfologia das amostras das NpsAg e dos géis híbridos conjugados, foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A imagem de TEM para as amostras foram obtidas no Departamento de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG), usando um microscópio eletrônico da marca Jeol, modelo JEM-2100, com voltagem de 200 kV.

7.8 COMPORTAMENTO REOLÓGICO

As medidas reológicas foram realizadas em um Reômetro de tensão controlada (model DHR da TA *Instruments*, T = 25 °C e *software* no Reômetro MCR 301 da Anton Paar Physica), com geometria placa-placa, (50 mm diâmetro) em um gap de 100 µm, as

amostras foram realizadas em triplicata. O ensaio de escoamento foi realizado variando a velocidade de cisalhamento de 0 a 200 s⁻¹. As medidas reológicas dinâmicas oscilatórias foram realizado no modo de varredura de frequência, em que a tensão (τ) aplicada era constante 0,4 Pa e 5 Pa no domínio da região viscoelástica linear e a frequência de oscilação (ω) variou de 0,1 a 100 Hz. As medidas foram realizadas no CETENE-PE e na Universidade Federal de Sergipe- UFS.

7.9 DETECÇÃO E PRODUÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO (¹o₂) (ROS)

Durante o experimento típico, PpIX@(NBsAu + NpsAg)@Alg (12 mg, 800 μ L) foi misturado com 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) em DMSO (0,7 mM, 2 mL), respectivamente. Irradiou-se com laser NIR, CW de 660 nm laser (30 mW) em intervalos de 5 min de irradiação até 35 min com uma dose total de luz de 9,2 J/cm². Os rendimentos quânticos para geração de oxigênio singleto (η), foram determinados monitorando a foto-oxidação sensibilizada utilizando como sonda o DPBF com UV-Vis. O mesmo experimento foi repetido para os demais géis híbridos (TADA, 2007).

7.10 EFEITO FOTOTERMAL DE PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg E EFICIÊNCIA DE CONVERSÃO FOTOTÉRMICA (η)

As propriedades fototérmicas foram investigadas através da variação de temperatura dos géis sob irradiação com um laser NIR CW ($\lambda = 785$ nm). Aproximadamente 150 miligramas de cada gel, foram irradiados (0,5 a 1W) por 5 min contínuos e 3 min de resfriamento. Os registros foram feitos com um termovisor (FLIR E4) a cada 10 s para aquecimento e 5 s nos primeiros 30 s de resfriamento e demais a cada 10 s. As caracterizações fototérmicas do gel PpIX@(NBsAu + NpsAg)@Alg foram avaliadas a partir do valor da eficiência de conversão fototérmica (η), utilizando a equação 3: (ROPER; AHN; HOEPFNER, 2007;CHEN et al., 2017b):

$$\eta = \frac{hS(T_{max} - T_{vis}) - Q_0}{I(1 - 1.10^{-A_{785}})} \quad \text{equação 3}$$

onde h é o coeficiente de transferência de calor, S é a área de superfície do recipiente, T_{max} é a temperatura de equilíbrio do gel PpIX@(NBsAu + NpsAg)@Alg, T_{vis} é a temperatura ambiente, Q₀ está associado ao calor gerado apenas pela cubeta de quartzo e o solvente (água) sob irradiação do laser (1W), A₇₈₅ é a intensidade de absorção de

PpIX@(NBsAu + NpsAg)@Alg ($A_{785}=0.2$), e I é a potência do laser incidente 1W. O valor do hS foi calculado a partir da equação 4 (CHEN et al., 2017b),

$$\tau_s = \frac{\sum i \cdot m_i C_{p,i}}{hS} \quad \text{equação 4}$$

onde τ_s é a constante de tempo do sistema representada por slope da linha de resfriamento da amostra.

7.11 LINHAS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA PARA ENSAIOS *IN VITRO*

Neste estudo foram utilizadas duas linhas celulares, uma linhagem imortalizada de macrófagos de murinos (RAW 264.7) e linhagens de células tumorais de melanoma de murinos (B16-F10), para verificar se os géis híbridos de: PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg apresentavam seletividade para células cancerosas. Células RAW 264.7 foram cultivadas em células DMEM e B16-F10 em meio RPMI 1640, ambos continham 10% de FBS e as células incubadas sob uma atmosfera humidificada durante 24 h (37,5% de CO₂).

7.12 TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA DOS GEÍIS HÍBRIDOS *IN VITRO*

Para estudar o efeito dos Lasers na viabilidade celular, as células foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^4 células por poço) e irradiadas por 5 min com Laser 1 NIR (660 nm, 30 mW.cm⁻²) apenas, Laser 2 NIR (785 nm, 800 mW, 900 mW e 1000 mW. Cm⁻²), nas diferentes densidades de potência, e Laser 1 mais Laser 2 simultaneamente (fixando em única potencia para o Laser 1 e variando o Laser 2). Após 24 h, todos os sobrenadantes foram removidos e as células na placa acima de 96 poços foram posteriormente tratadas com 20 mL MTT (0,5 mg. mL⁻¹) e 180 mL de meio de cultura por 3 h. Subsequentemente, o meio MTT foi cuidadosamente removido e 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço, medido a 578 nm num leitor de microplacas de detecção múltipla. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis comparadas com aquelas de células controle não tratadas (100%) Silva et al. (2018).

7.13 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

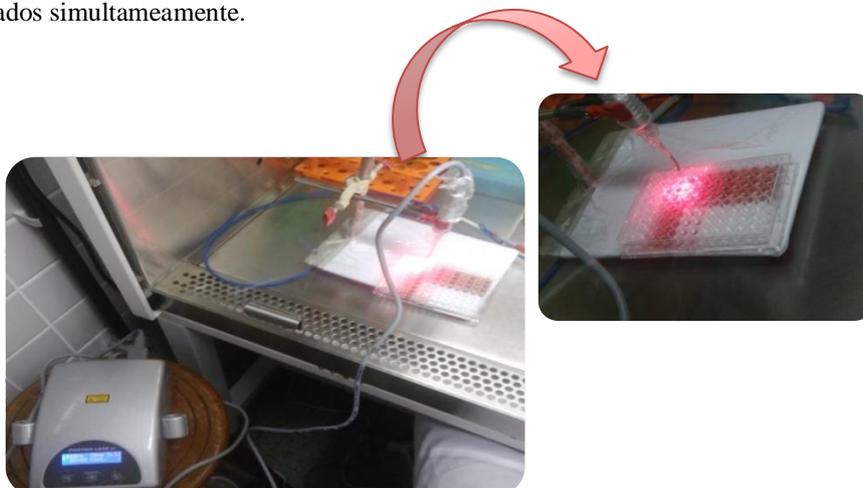
A citotoxicidade da PpIX livre e dos géis híbridos conjugados PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+ NpsAg)@Alg, foram avaliadas em células RAW 264.7 e B16-F10 usando um ensaio MTT. As células foram cultivadas sob condições já mencionadas. As células foram tratadas com PpIX, PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, nas concentrações de 2.0625, 4.125, 8.25, 16.5 e 33 mg/mL por 48 h. Depois, o ensaio de MTT foi realizado como descrito na terapia fotodinâmica e fototermal *in vitro*.

7.14 EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA E QUIMIOFOTOTÉRMAL *IN VITRO* DE GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADOS

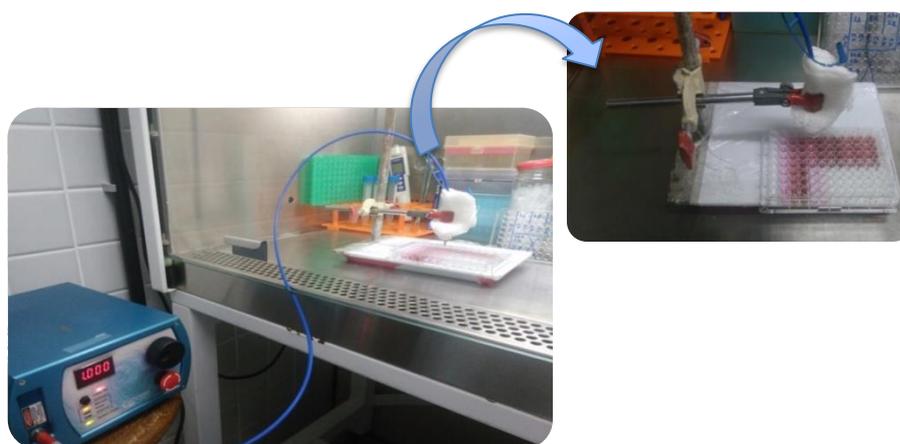
Para avaliar a propriedade fotodinâmica e efeito quimiofototermal dos géis híbridos conjugados, foram selecionados dois materiais: PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu + NpsAg)@Alg nas concentrações de 8.25 e 16.5 mg.mL⁻¹. Células B16-F10 foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 2x10⁴ células/poço, em seguida, foram tratadas com as amostras mencionadas por 24 h. Posteriormente, as amostras foram divididas em três grupos: PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu + NpsAg)@Alg irradiadas com o Laser 1(L1); PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu + NpsAg)@Alg irradiadas com o Laser 2, na densidade de 1000 mW cm⁻² (L2); e PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu + NpsAg)@Alg irradiadas simultaneamente com o Laser 1 e Laser 2 (L1+L2), todas as irradiações foram de 5 minutos cada, conforme ilustra na (Figura 36^{a-c}). As células foram incubadas novamente por mais 24 h, então foram adicionados 20 µL de MTT (0.5 mg mL⁻¹) em cada poço, e as células incubadas por 3 h para mensurar a viabilidade celular.

Figura 36- **a)** Esquema de irradiação laser 1: NIR 660 nm, potência 30 mW, 5 minutos cada poço. **B)** Laser 2: NIR 785 nm, potência de 1000mW, 5 minutos cada poço. **C)** Esquema ilustrativo dos lasers (1+2) irradiados simultaneamente.

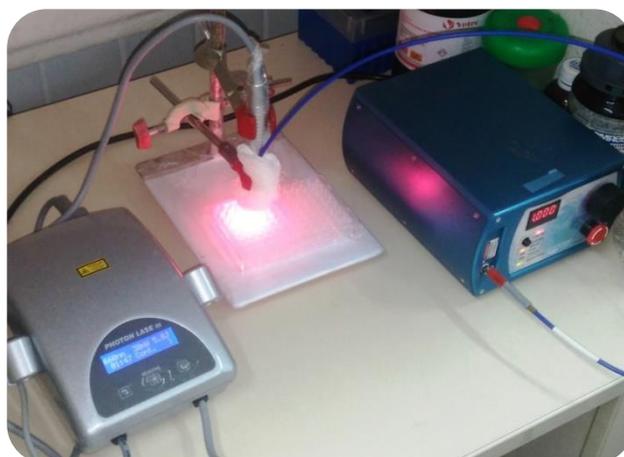
a)



b)



c)



7.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A citotoxicidade foi expressa como a percentagem de células viáveis contra as das células de controle não tratadas. Os dados foram expressos como média \pm DP (desvio padrão). A análise estatística foi realizada utilizando STATISTICA 8 pelo teste t de Student, onde * $p < 0,05$ foi considerado significativo.

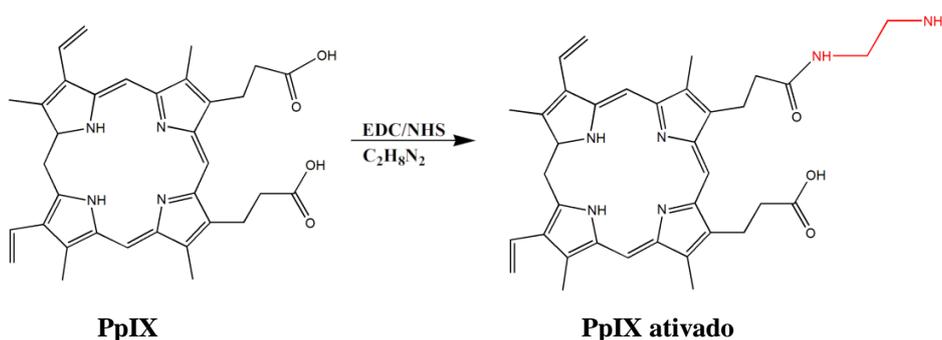
8 RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.1 SÍNTESES DOS GÉIS HÍBRIDOS A PARTIR DO ALGINATO DE SÓDIO RETICULADO EDC/NHS CONJUGADO COM A PROTOPORFIRINA IX FUNCIONALIZADA

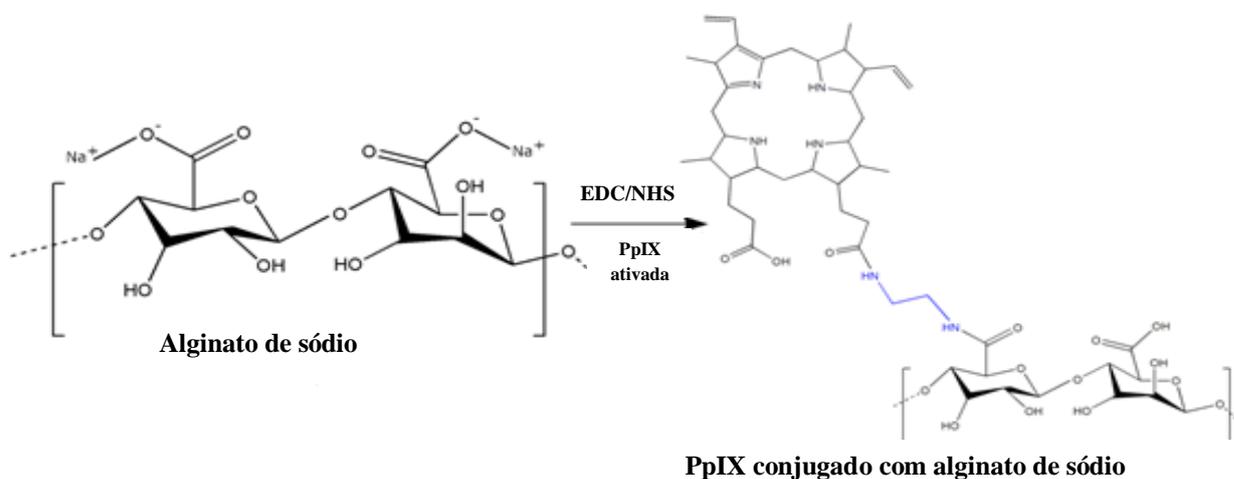
A ativação dos grupos carboxílicos da PpIX e do alginato de sódio foram obtidas em duas etapas através da reação com o agente de acoplamento (EDC/NHS). Os grupos aminos foram introduzidos por meio da funcionalização com etilenodiamina na etapa I. A conjugação covalente do gel híbrido foi obtida conforme sugerimos o mecanismo de reação proposto abaixo (Figura 37) e com base nos dados de FT-IR (Figura 40).

Figura 37- Mecanismo de reação e funcionalização da PpIX e a reticulação do gel a partir do alginato de sódio.

1º) Etapa:



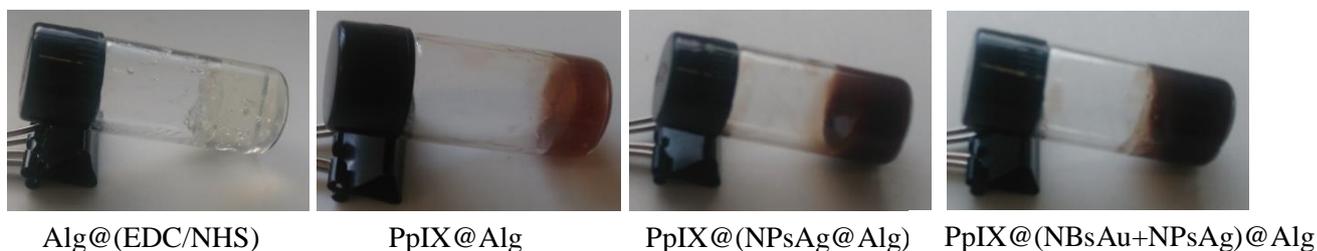
2º) Etapa:



8.2 COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE ACORDO COM MÉTODO ROTACIONAL E OSCILATÓRIO

Os géis a base de AS na concentração de 4% de massa e EDC/NHS (0,1g e 0,03g) apresentaram comportamento semelhante quando comparados entre si, em virtude dos métodos rotacional e oscilatório e conforme mostrado na Figura 38, a formação do gel híbrido a partir da reticulação química a partir do alginato de sódio gel incolor com agentes químicos, conjugado com a PpIX, bem como os géis híbridos resultantes indicando cor vermelho escuro devido a presença do fotossensibilizador e as soluções das nanopartículas de prata e o nanobastões de ouro.

Figura 38- Fotografias dos géis de Alg@(EDC/NHS), PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg.



As análises reológicas das matrizes de Alg conjugado com EDC/NHS, associadas com NPsAg, NBsAu e PpIX estão dispostas na Figura 39 a-c. A variação da viscosidade aparente (η_a) dos géis híbridos em função da taxa de cisalhamento numa faixa de (0-100 s^{-1}) foi de alta viscosidade para todos os conjugados, em baixas taxas de cisalhamento até aproximadamente 20 s^{-1} , fato relacionado a reticulação química durante o processo de síntese (Figura 39 a) (MA et al., 2014; LI et al., 2017).

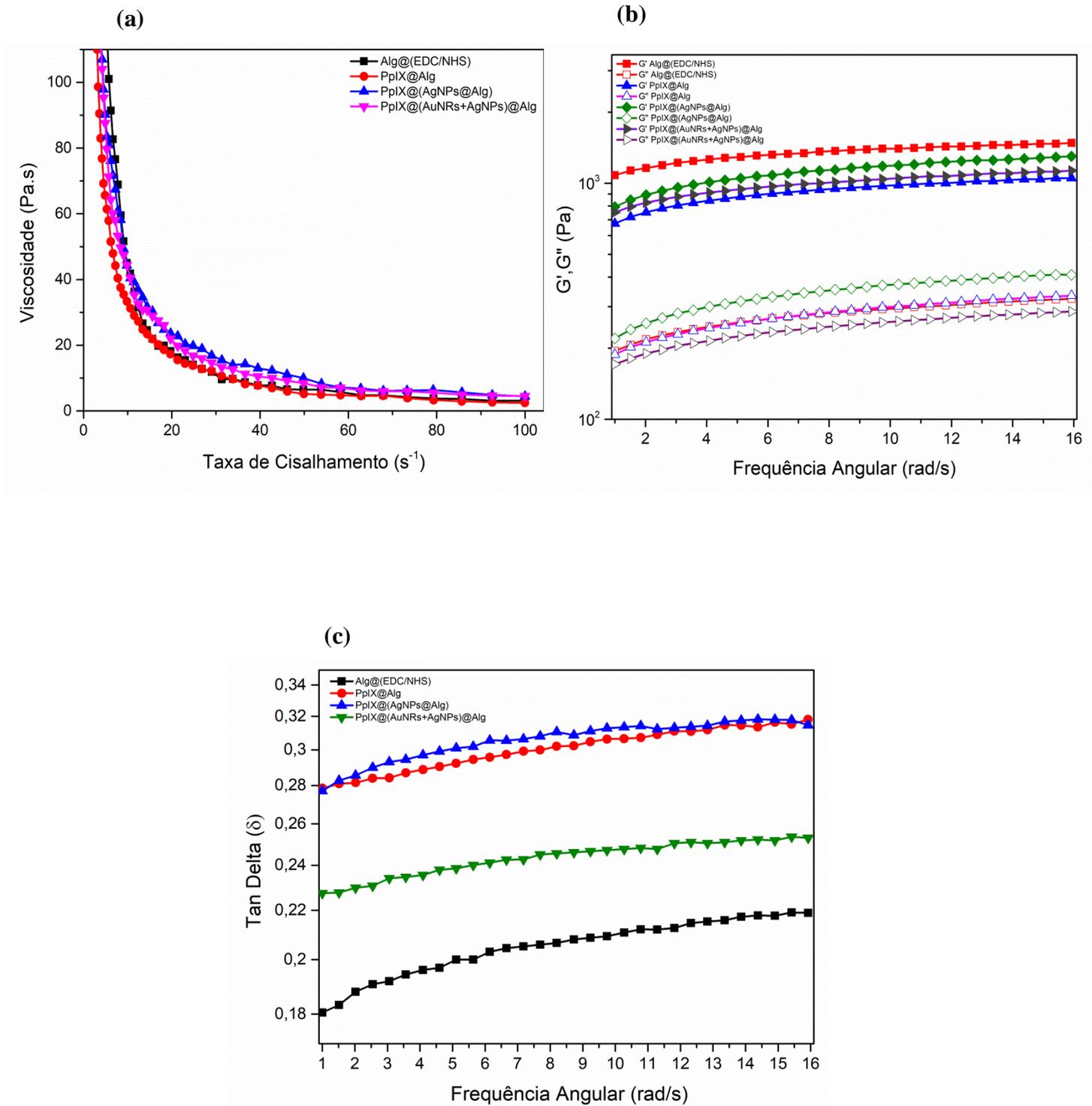
A alta viscosidade é devido às fortes interações entre polímeros-polímeros, polímeros-nanopartículas metálicas, conjugações e interações intermoleculares, incluindo tamanho, estrutura de rede, forma e flexibilidade do polímero (PERES et al., 2015; NARAYANAN et al., 2017). Bem como, ao processo de desemaranhamento- emaranhamento no que diz respeito ao alinhamento da cadeia polimérica em função da direção do cisalhamento (BENCHABANE; BEKKOUR, 2008).

A formação do gel foi confirmada através de teste reológico utilizando o método oscilatório de varredura de frequência dinâmica na região viscoelástica linear (LVE) (Figura 39 b e 39 c). Na Figura 39 b, os valores do módulo (G') para todos os

géis híbridos são superiores ao módulo (G''), indicando uma reticulação covalente, característica de um gel verdadeiro com a rede polimérica bem reticulada 3D. Não há dependência do módulo de armazenamento em relação à faixa de frequência empregada, indicando a formação bem sucedida da rede polimérica e comportamento viscoelástico semelhante a um gel (LIU et al., 2017).

As propriedades viscoelásticas também foram analisadas com base na $\tan(\delta)$ em função de ω (1-16 rads/s a 25°C) (Figura 39 c), onde $\tan(\delta) = (G''/G')$ de todos os resultados indicaram $\tan(\delta) < 1$ para os géis, características de um material sólido elástico, para frequência proposta. Os resultados indicaram menores $\tan(\delta)$ em torno de 0,22 para o Alg@(EDC/NHS) e um aumento para os géis híbridos de PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@Alg com valores no intervalo de (0,23-0,31), confirmando um comportamento mais de gel-like que líquido, devidos $\tan \delta < 1$ (MARKSTEDT et al., 2015). Uma vez a proximidade da $\tan(\delta) \sim 1$, há melhor eficiência para as blendas poliméricas com nanopartículas metálicas, devido a melhor absorção e dispersão de energia (NARAYANAN & HAN; 2017; SHIN et al., 2014).

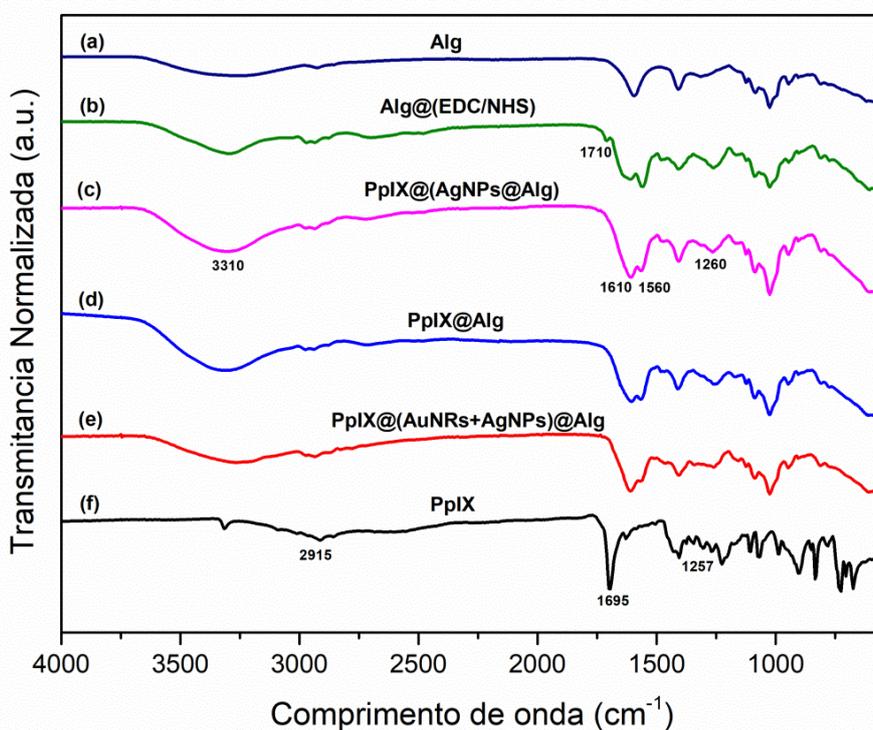
Figura 39- Análise reológica dos géis híbridos de Alg@(EDC/NHS), PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg medindo (a) viscosidade em função da taxa de cisalhamento, (b) gráfico do módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') versus frequência angular, (c) $\tan(\delta)$ (G''/G') versus frequência angular, em temperatura da placa de 25°C.



8.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (FT-IR) E RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN H^1) DOS GÉIS HÍBRIDOS A PARTIR DO CONJUGADO DA PpIX-ALGINATO

O espectro dos géis híbrido a base de SA conjugado a NPsAg, NBsAu e PpIX é mostrado na Figura 40. Alterações dos picos característicos do hidrogel de Alg puro são observadas, quando comparado com os géis híbrido para frequências específicas de vibração da banda em 3310 cm^{-1} (grupo $-OH$), pico de estiramento $-COO^-$ (1595 cm^{-1} e 1414 cm^{-1}) e de deformação angular de OH em 1029 cm^{-1} , referente ao $-COO^-$ simétrico Figura 40 a (ZHAO et al., 2015; SIBAJA et al.;2015). Um novo pico de absorção foi observado em torno de 1710 cm^{-1} referente à deformação axial da carbonila ($C=O$), relacionado à ativação dos grupos carboxílico por meio da introdução do grupo funcional éster na obtenção da reticulação Figura 40 b para o Alg em (EDC/NHS) (LIU et al., 2016; Fan et al., 2016).

Figura 40- Espectro de infravermelho por Transformada- Fourier (FTIR) de: (a) Alg, (b) Alg@(EDC/NHS), (c) gel híbrido de PpIX@(NPsAg@Alg), (d) gel híbrido de PpIX@Alg, (e) gel híbrido de PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg) e (f) PpIX.



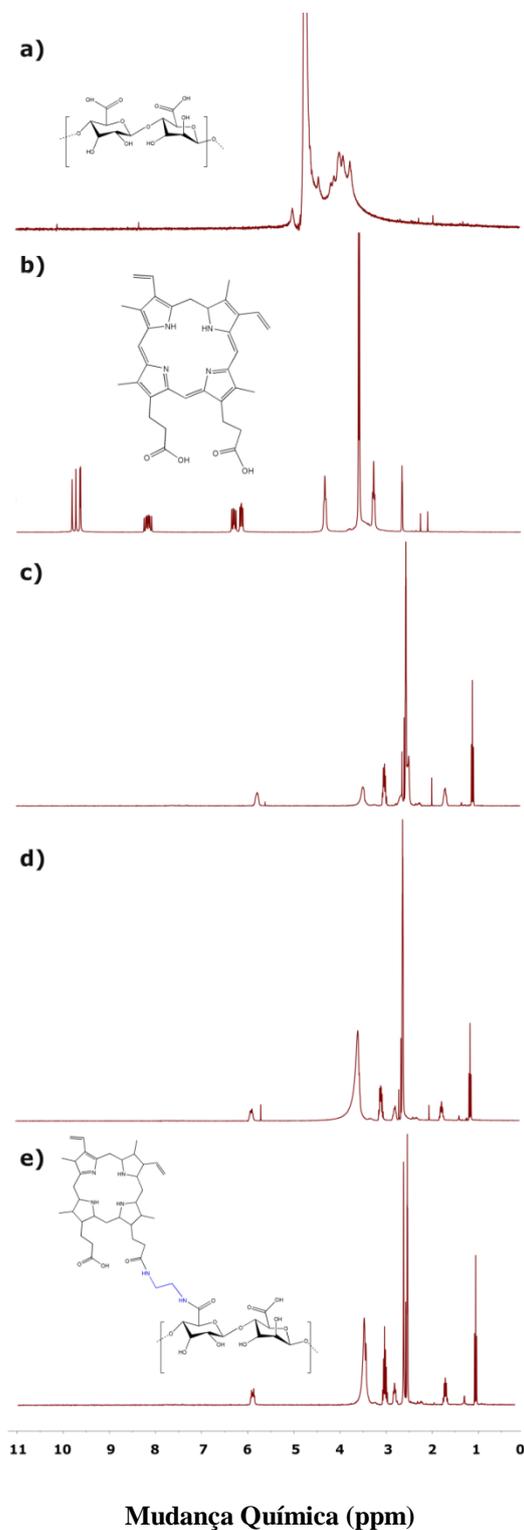
Ao introduzir a PpIX ativada nos géis híbridos (Figura 40 c-e), o pico vibracional da carbonila em 1710 cm^{-1} não foi mais observado (FAN et al., 2016), entretanto, um alongamento vibracional da ligação da (C-O), em 1610 cm^{-1} aumentou sua intensidade atribuída a reticulação, assim como um novo pico de absorção em $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$ referente à amida II, correspondendo a formação da reticulação covalente entre o géis de Alg com a PpIX (KIM et al., 2012; PAWAR ; EDGAR, 2013; CHEN et al., 2017). Nos géis híbrido $\sim 1260\text{ cm}^{-1}$ observou-se pico atribuído a amida II e vibração de alongamento do C-O/C-N presente na PpIX (LV; MAO; LIU, 2014). O espectro de FT-IR da PpIX (Figura 40 f), exhibe bandas características de tetrafenilporfirina (POP et al., 2013), em $\sim 3313\text{ cm}^{-1}$ (deformação axial N-H de amina ou O-H); em 2915 cm^{-1} , 2858 cm^{-1} , 1695 cm^{-1} e 1625 cm^{-1} (vibrações de alongamento assimétrico da C=O) e em 1405 cm^{-1} estiramento simétrico do grupo carboxílico (C=O) (ELIM et al., 2006; SARDAR et al., 2015).

O espectro de $^1\text{HNMR}$ das amostras dos são apresentadas na Figura 41. A (Figura 41 a) apresenta o sinal a 5,08 ppm para o hidrogênio anomérico das unidades glicurônicas. Outros picos do biopolímero foram observados na região em 4,95 ppm, 4,59 ppm, 4,50 ppm o que corrobora com Ahn e colaboradores, (2014). Ainda foi observado quatro prótons do anel de Alg na região entre 3.8~4.1 ppm (LIU et al., 2017). O sinal em torno de 4,6–4,9 ppm é atribuído ao D_2O . Para PpIX (Figura 41 b), picos em 9,73 ppm, 9,74 ppm, 9,83 ppm e 9,92 ppm atribuído aos prótons na posição meso da PpIX e picos em 8.1~8.3 e 6,08~6,32 ppm são atribuídos aos prótons dos anéis do grupo pirrol da PpIX foram identificados (XU et al., 2017). Picos distintos dos géis híbridos obtido a partir da conjugação entre Alg com NPsAg, NBsAu e PpIX foram identificados nos espectros (Figura 41 c-e), a reticulação dos géis foram confirmadas por picos adicionais em torno de 0,9-1,2 ppm atribuídos aos prótons do grupo CH_3 , devido a ativação dos grupo carboxílico do alginato na presença de (EDC/NHS) (WAN et al., 2015; NAGHIZADEH et al., 2018). Estes picos não foram observados no espectro do Alg puro. Foi encontrado ainda, um novo pico $\sim 2,7$ ppm (grupo metileno da etilenodiamina), utilizado como ligante na conjugação covalente (AN et al., 2018; PEI et al., 2018).

Alguns sinais do Alg (Figura 41 a) foram sobrepostos e novos picos surgiram entre 3,2- 4,1 ppm. Os sinais que aparecem nos géis híbridos em torno de 5,8-6,1 ppm são atribuídos a PpIX uma vez que se inclui a classe das porfirinas (BELALI; KARIMI;

HADIZADEH, 2017). Desta forma estes resultados indicaram que a conjugação covalente dos géis híbridos foi realizada com sucesso

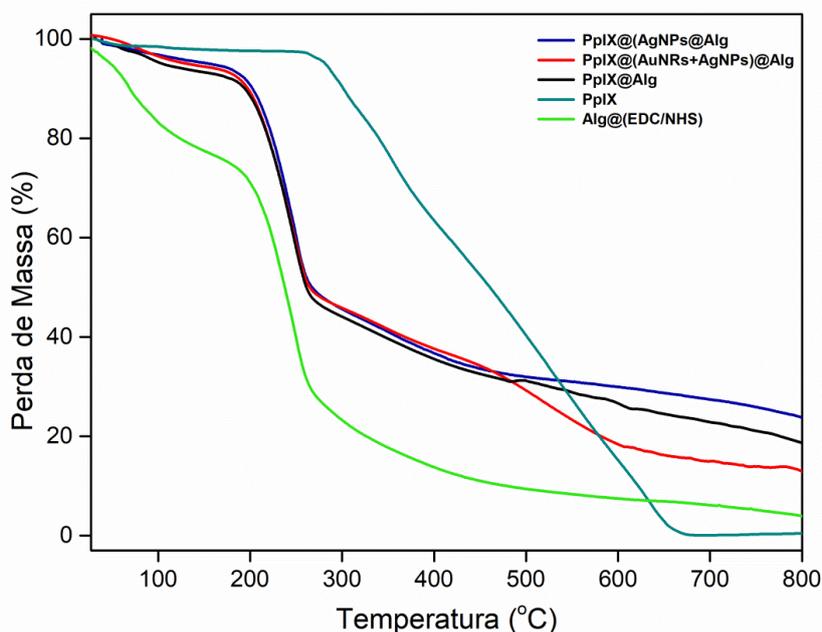
Figura 41- Espectro de RMN ^1H 300 MHz do (a) Alginato em D_2O , (b) PpIX, (c) gel híbrido conjugado de PpIX@Alg, (d) PpIX@(NPsAg@Alg) e (e) PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg em DMSO-d_6 .



8.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) dos géis estão inseridas na Figura 42. A curva para Alg@(EDC/NHS) apresenta três eventos: o primeiro (43°C a 100°C) para perda de água; um segundo (204 a 270 °C) devido à degradação do biopolímero em Na₂CO₃ e um terceiro a partir de 495°C devido à decomposição do Na₂CO₃ e formação de resíduos e material carbonizado (SOARES et al., 2004; NARAYANAM et al., 2017). A PpIX apresentou dois eventos de perda de massa foram verificados: o primeiro evento devido a perda de peso ocorreu até 272°C, atribuído a quebra e decomposição de alguns grupos reativos e ligações duplas fora do macrocíclico (C=C) e (C=O) (TOSTADO-PLASCENCIA et al., 2016). A segunda curva do TGA entre (279°C a 663°C) é atribuída à decomposição térmica do anel macrocíclico (POP et al.,2013).

Figura 42- TGA do Alginato em EDC/NHS, PpIX@(NPsAg@Alg), PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg), PpIX@Alg e PpIX.



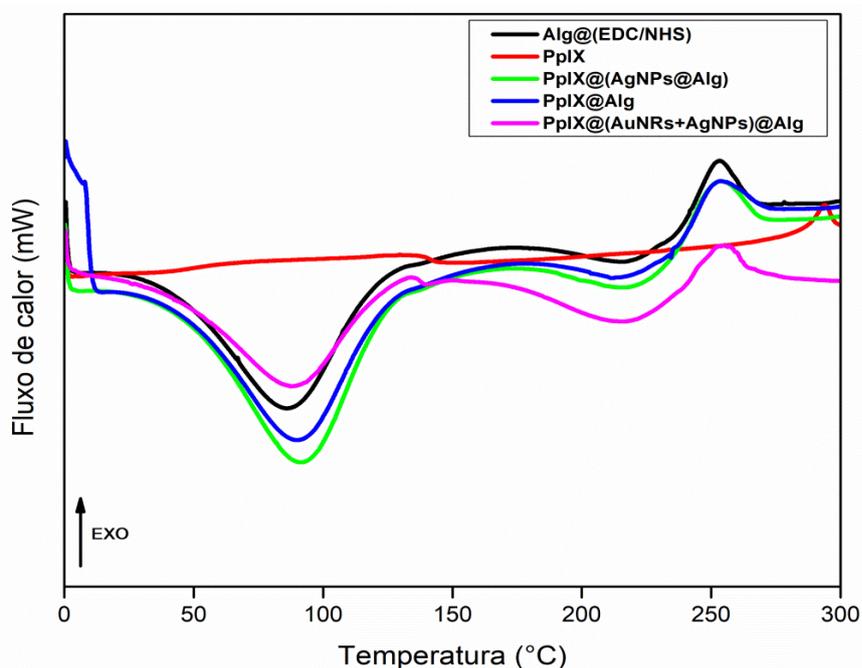
Os valores para T_{50} do Alg@EDC/NHS, PpIX e géis híbridos de PpIX@(NPsAg@Alg), PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg) e PpIX@Alg foram 252.50, 460.61, 267.19, 264.77 e 260.99°C respectivamente. O Alg@EDC/NHS apresentou uma menor T_{50} , quando comparada com os géis híbridos e a PpIX, que obtiveram um aumento da temperatura quando a perda de peso da massa foi de 50%. Estes resultados indicaram uma melhor estabilidade térmica dos géis híbridos, atribuído a reticulação

química com a PpIX, assim como relacionada a estrutura do macrocíclico e das nanopartículas na rede polimérica. Esses conjugados podem atuar como uma barreira térmica o que leva o aumento da estabilidade térmica do gel, devido às propriedades dos polímeros, como crosslinking, tamanho do anel e forma do enchimento (nanopartículas de metais) (VODNIK et al. 2013; NARAYANAN & HAN 2017).

8.5 CALORIMETRIA DIFERENCIAL POR VARREDURA (DSC)

Amostras de géis híbridos também foram testadas pelo DSC. Os resultados mostraram que (Figura 43) a curva de DSC do Alginato de sódio em EDC/NHS apresentou inicialmente um pico endotérmico em torno de 85°C, atribuído tanto à desidratação associado à perda de água referente aos grupos de natureza hidrofílica (O-H; -COO⁻), bem como a estabilização devido a reticulação com EDC/NHS (KARRI et al., 2016; NARAYANAN & HAN 2017; SOARES et al., 2004). Em conjunto os resultados de TGA e DSC, indicaram que o gel de Alg reticulado quimicamente apresentou boa influência na estabilidade térmica. A curva de DSC para os géis híbridos de PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, apresentaram picos endotérmicos em 90°C, 92°C e 89°C respectivamente. Um aumento na estabilidade do gel híbrido que contém NPsAg é atribuído também por ocorrer mudança no arranjo estrutural na matriz do biopolímero durante a reticulação (GHASEMZADEH & GHANAAT, 2014). Além disso, foi observado também uma menor estabilidade para o gel que contém (NBsAu+NPsAg), devido possivelmente a um efeito sinérgicos entre as NPs e os nanobastões, relacionada a um aumento de carga negativa na matriz do gel, no qual provocou uma leve mudanças no arranjo das cadeias (MARTINS et al., 2015). Um segundo pico exotérmico por volta de 252°C foi encontrado em todos os géis híbridos, atribuído à degradação do biopolímero e formação de carbonatos (KARRI et al., 2016). A PpIX apresenta um único evento indicado por pico exotérmico por volta de 290°C, atribuído a decomposição do anel. Esta molécula mostrou boa estabilidade térmica devido aos grupos metilas e carboxílicos serem ligados ao anel macrocíclico (TOSTADO-PLASCENCIA et al., 2016).

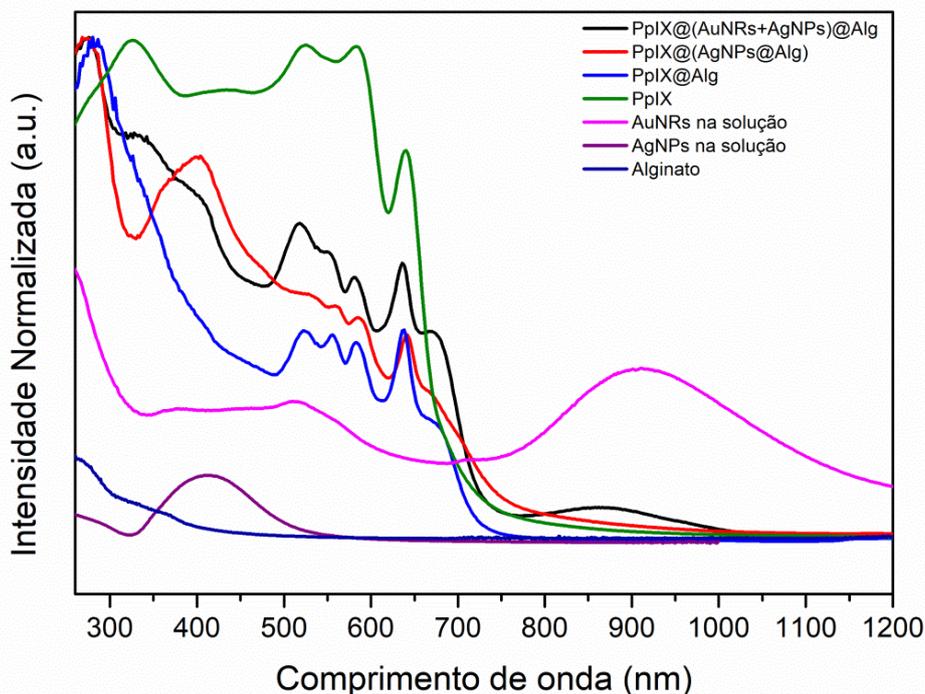
Figura 43- Curva dos géis de: Alg@EDC/NHS, PpIX@(NPsAg@Alg), PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg), PpIX@Alg and PpIX.



8.6 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (UV-VIS-NIR) DA PpIX E DOS GÉIS HÍBRIDOS

O espectro de UV-vis-NIR (Figura 44) apresentou bandas características desta família de compostos, em boa concordância com outros derivados de compostos da porfirina previamente reportados, assim como série de bandas características dos grupos inseridos como (Alg, NBsAu e NPsAg). As bandas SPR (518 nm e 870 nm) são atribuídas para os NBsAu, elas correspondem à ressonância de plasma de superfície transversal (TSPR) e a ressonância de plasma de superfície longitudinal (LSPR) respectivamente. O pequeno deslocamento hipsocrômico e batocrômico para os géis, ocorre devido a interação entre NBsAu e Alg (SHAJAR et al., 2017; NAVAEI et al 2016). Para NPsAg esféricas uma única banda (400-440 nm) (FAFAL et al., 2017). Para o PpIX conjugado com os géis, bandas Q adicionais em torno de (530-700 nm) estão presentes, e são características dos macrocíclos nas classes das porfirinas (KANTONIS; TRIKERIOTIS; GHANOTAKIS, 2007; LEE & KIM 2016).

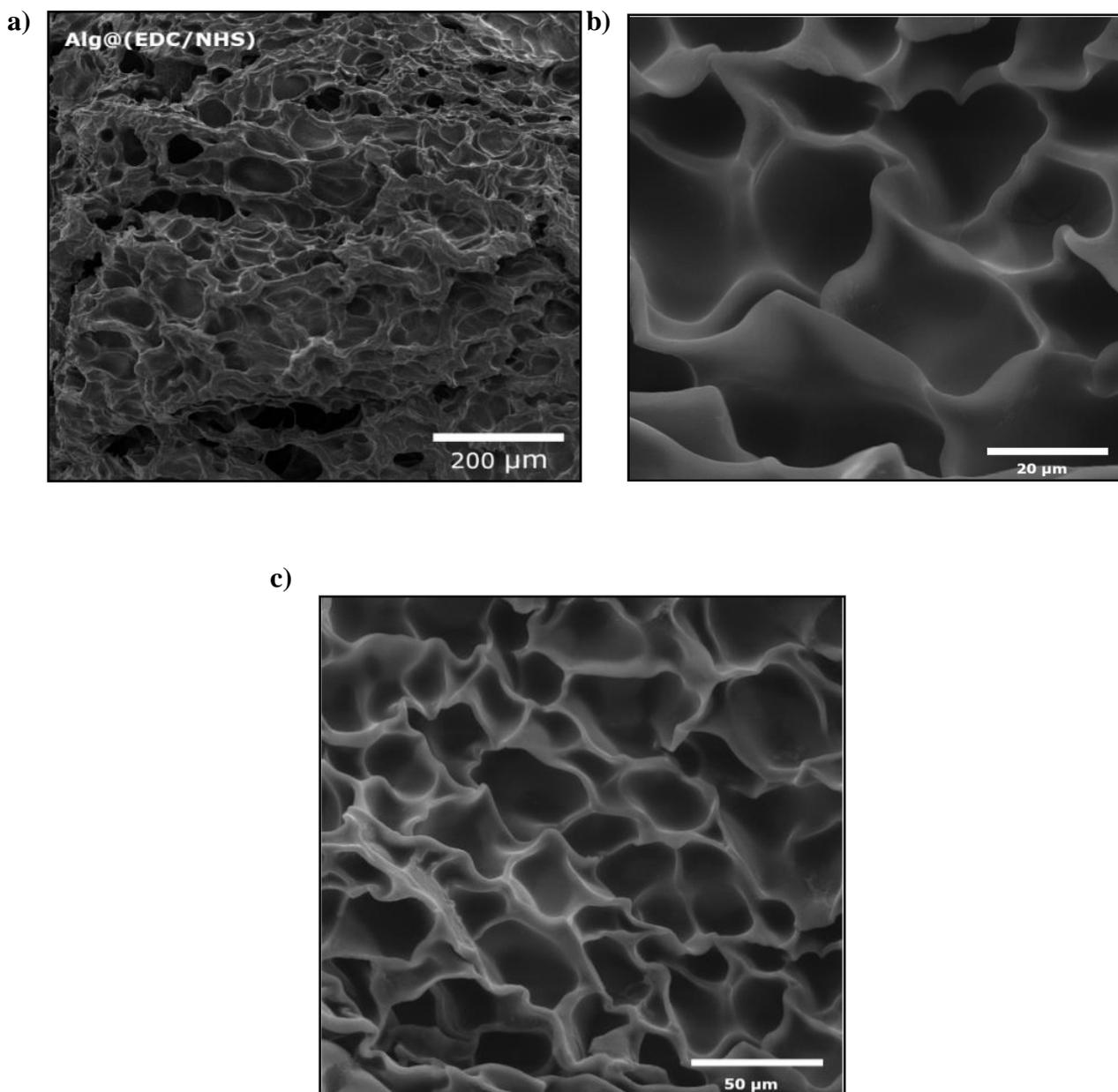
Figura 44- Espectro de Uv-vis-NIR dos géis híbridos da PpIX@(NPsAg@Alg), PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg), PpIX@Alg, PpIX e Alginato. O NBsAu e NPsAg foram feito em solução.



8.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DO GEL DE ALGINATO RETICULADO COM AGENTES QUÍMICOS E DOS GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADOS COM A PROTOPORFIRINA-IX

O estudo morfológico superficial e transversal do gel com biopolímero alginato reticulado com agentes químicos (EDC/NHS) foi realizado através do MEV, conforme apresenta na Figura 45. Na Fig. 45 a, o gel de Alg@(EDC/NHS) liofilizado apresentou a morfologia superficial porosa, indicando estruturas contínuas semelhantes em tamanho e forma para hidrogéis a base de alginato (LI et al., 2017; WAN et al., 2015). Ao analisar a vista em corte transversal do gel de Alg@(EDC/NHS), a imagem de MEV (Figura 45 b e c), revela uma estrutura contínua e porosa do gel de alginato reticulado covalentemente, na qual indica o tamanho dos poros interconectados em uma faixa de 20 a 50 μm . Normalmente estruturas porosas de hidrogéis macromoleculares estão atribuídas ao grau de reticulação covalente durante o processo sintético, na qual podem apresentar menores tamanho de poros (KHORSHIDI; KARKHANEH, 2016; WANG et al., 2018).

Figura 45- Imagens do MEV de uma vista superficial do gel de Alg@EDC/NHS, com magnificação de a) 338x e vista transversal com magnificação de b) 3.39 kx e c) 1.40kx.

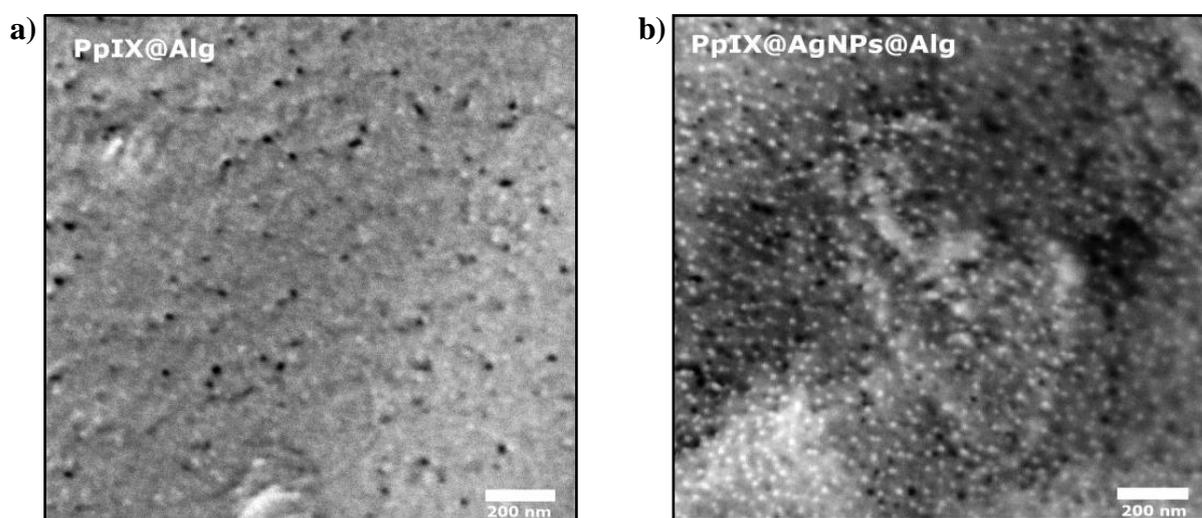


O estudo morfológico superficial dos géis híbrido conjugado, PpIX@Alg e PpIX@(NPsAg@Alg) foi realizado através do MEV, conforme apresentado na Figura 46. Os géis híbridos, indicam nas estruturas morfológicas superficiais a presença do macrocíclico PpIX, bem como as nanopartículas de prata esférica na faixa de tamanho de 15-40 nm (Figura 46 a-b). As NPsAg esféricas formadas nas redes interligadas são dispersa e distribuída na rede polimérica do gel híbrido ((MURTHY et al., 2008).

Wang e colaboradores (2018) apresentaram em seu trabalho um sistema de hidrogel a base de poli (2-hidroxietil metacrilato) (pHEMA) reticulado covalentemente

com hidrogel de alginato, com o objetivo de obter um material de revestimento utilizado para aplicações biomédicas. Neste novo sistema incorporou também as nanopartículas de prata, que através da imagem de MEV superficial, apresentou tamanho em torno de 20-40 nm das NPsAg presente na superfície dos hidrogéis, desda forma estes hidrogéis podem ser considerado bons agentes antimicrobianos utilizados como curativos em feridas.

Figura 46- Imagens do MEV de uma vista superficial do gel híbrido de a) PpIX@Alg e b) PpIX@(NPsAg@Alg) com magnificação de 180 kx.



8.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DOS GÉIS HIBRIDOS CONJUGADOS COM A PROTOPORFIRINA-IX

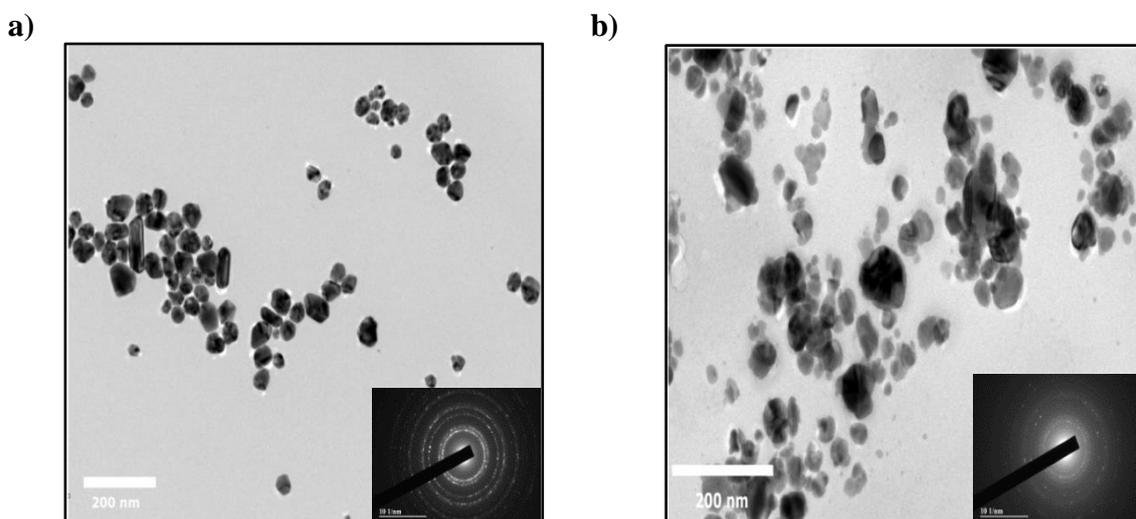
As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) para as nanopartículas de prata e o gel híbrido associado às nanopartículas de prata, confirmaram as imagens do MEV e revelaram uma distribuição das NPsAg esféricas dispersas na matriz do gel híbrido com tamanho de diâmetro entre 15-60 nm e também de acordo o histograma apresentando o cálculo de distribuição de tamanho médio de partículas conforme apresenta na (Figura 47a-b). Os resultados de UV-vis-NIR para o gel híbrido contendo NPsAg, revelaram a presença da banda de absorção registrada entre 400-440 nm características das nanopartículas de prata, o que confirma a formação

de nanopartículas de prata, assim como através do padrão de SAED da inserção na (Figura 47a-b), (GICHEVA; YORDANOV, 2013; ELBESHEHY et al., 2015). Pode-se observar que a partir da área selecionada da imagem TEM, o padrão de difração de elétrons (SAED) de nanopartículas de prata foi visível, o que sugere estar de acordo com anéis de difração, atribuída a estrutura cristalina cúbica de face centrada (CFC) características das nanopartículas de prata (BINDHU; UMADEVI, 2015; BALAKUMARAN et al., 2016).

Murthy e pesquisadores, afirmaram ao observar o (SAED) das nanopartículas de prata em seu trabalho, que um anel mais brilhante e um mais próximo do centro é uma combinação de reflexão de difração (111) e (200), o segundo anel pertence à reflexão (222) e o terceiro anel mais fraco é devido a reflexões (420) ou (422) (MURTHY et al., 2008).

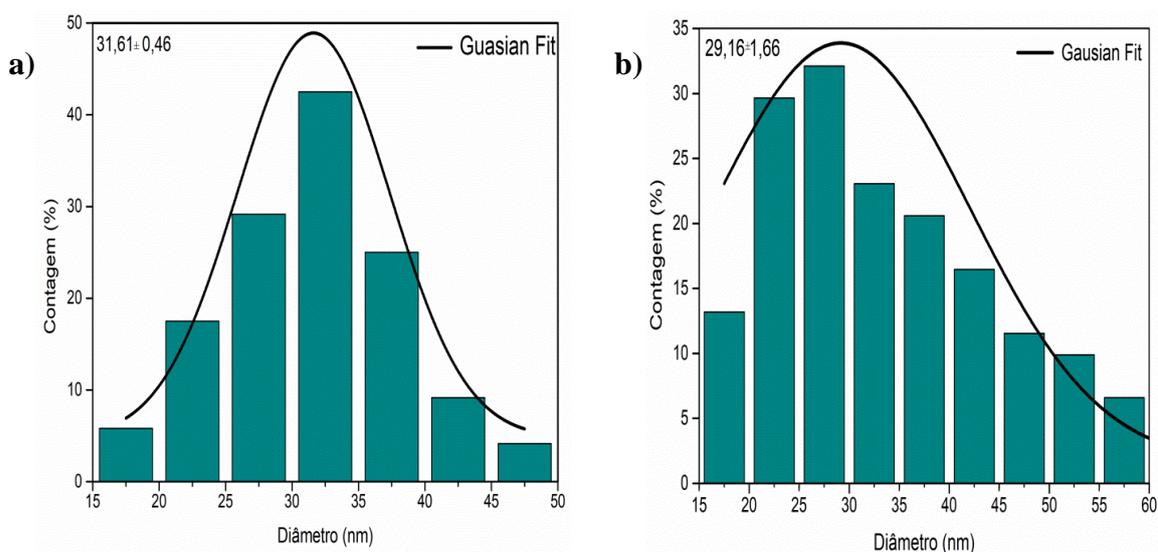
Recentemente, estudo sobre uma nova plataforma a partir de um gel a base de gelatina metacrilada incorporando nanopartículas metálicas de prata (NPsAg), com o objetivo de desenvolver *scaffolds* com propriedade antibacteriana e cicatrizações em feridas de lesões dérmicas profundas, apresentaram nos resultados de caracterização das NPsAg, banda acentuada no espectro UV-vis-NIR na região de 400 nm, com forma esférica e de acordo com MET indicou tamanho menores das nanopartículas na faixa de 6–14 nm (JAHAN et al., 2019). Este processo está relacionado ao método sintético para obtenção das NPsAg e através dos agentes redutores como por exemplo, boridreto de sódio e citrato de sódio podem influenciar no tamanho das nanopartículas de prata (SOLOMON et al., 2007; GICHEVA; YORDANOV, 2013; JAHAN et al., 2019).

Figura 47- Imagem do TEM para a) NPsAg e b) gel híbrido de PpIX@(NPsAg@Alg. Insert: Indica o padrão SAED.



O histograma para a análise de distribuição de tamanho de partícula tanto para apenas as nanopartículas de prata e gel híbrido de PpIX@(NPsAg@Alg) revelou valor do tamanho médio de diâmetro de $31,61 \pm 0,46$ e $29,16 \pm 1,66$ respectivamente, calculando com uso de 160 e 200 partículas selecionadas aleatoriamente conforme apresenta na (Figura 48 a-b). (JOVANOVIĆ, Z. et al.,2012; YANG et al., 2015; ELBESHEHY et al., 2015).

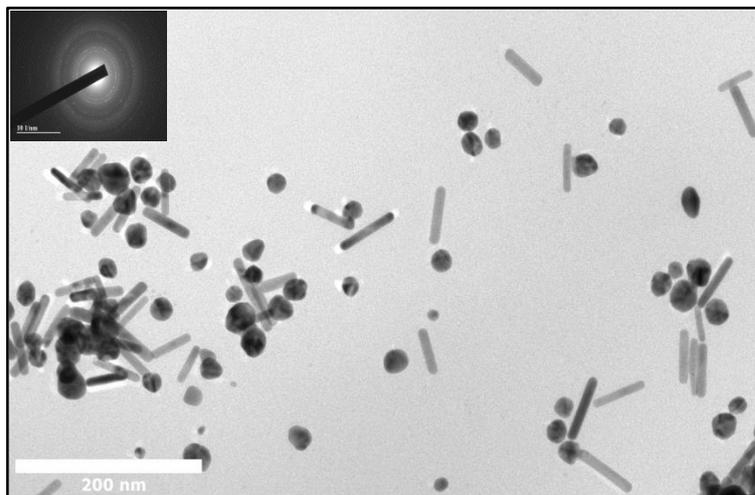
Figura 48- Histograma de distribuição de tamanho de partículas para a) NPsAg, n=160 e b) PpIX@(NPsAg@Alg), n=200.



A Figura 49 apresentam as imagens de MET para o gel híbrido associados às nanopartículas de prata (NPsAg) e os nanobastões de ouro (NBsAu), as imagens confirmam a presença das nanopartículas de prata esféricas, quanto os nanobastões de ouro, distribuídas uniforme e dispersa no gel híbrido. As nanopartículas e nanobastões apresentaram tamanho de comprimento para as esferas de prata em torno de 18-45 nm e os nanobastões de ouro com tamanho de comprimento referente à banda longitudinal em torno de 35-75 nm e de largura em torno de 7-20 nm referente à banda transversal. Estes resultados estão de acordo com os de Uv-Vis-NIR que apresentam para os nanobastões de ouro regiões plasmônicas com bandas transversais e longitudinais com comprimento de onda em torno de ($517 \text{ nm} \pm 10$ e $870 \pm 10 \text{ nm}$), indicando que as bandas da de ressonância plasmônica de superfície (SPR) mantevem presente no gel híbrido atribuído a uma boa estabilidade dos NBsAu, assim como a preservação da morfologia dos nanobastões. Pode-se observar também que a partir de uma área selecionada da imagem TEM, o padrão de difração de elétrons (SAED) dos nanobastões de ouro foram obtidos

com mostra no insert da Figura 49, de acordo com o anéis de difração (111), atribuído ao sentido longitudinal dos NBsAu, de uma estrutura (CFC) características de metais nobre como o ouro (WANG et al., 2006; GAI; HARMER; 2002; TIAN et al., 2003).

Figura 49- Imagem do TEM para o gel híbrido de PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg; Insert: Indica o padrão SAED.

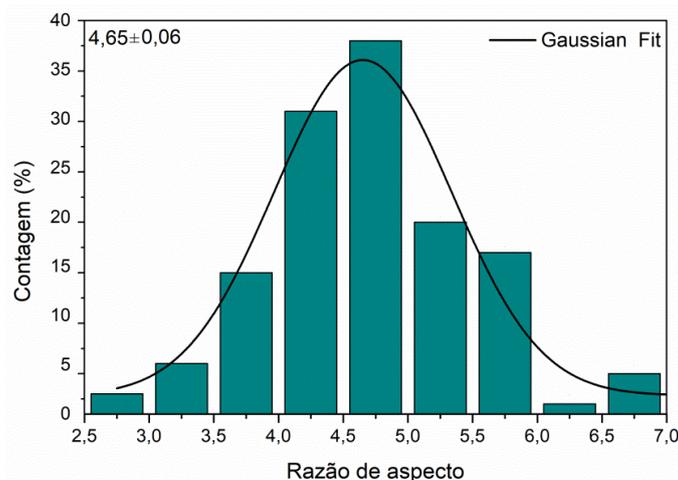


A caracterização através do TEM também foi utilizada para obter a forma e tamanho, e também a razão de aspectos (RA) das nanoestruturas, determinando assim a média e ajustando a (RA), conforme indica o histograma para a análise de distribuição de tamanho de partícula dos NBsAu apresentada na Figura 50. Consideramos cerca de 280 nanoestruturas selecionadas aleatoriamente, onde medimos seu comprimento referente à banda longitudinal e largura atribuída à banda transversal para estimar RAs em forma de bastões. Ao analisar a distribuição do tamanho médio, indicou o valor para razão de aspecto de $(4,65 \pm 0,06)$. Os valores de tamanhos médios para comprimento e largura também foram calculados e apresentaram tamanho médio de $54,69 \pm 0,58$ nm e $11,73 \pm 0,18$ nm respectivamente, corroborando com o que foi observado através do UV-vis-NIR. Ainda neste contexto, observou-se que a forma e tamanho dos nanobastões de ouro foram preservada na matriz do conjugado, não alterando sua morfologia significativamente após adição da PpIX, nesse caso, sugerimos que o gel híbrido de PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, podem ser considerados como grande potencial e excelente agente fototérmico plasmônico.

Recentemente Im & Kim (2018), desenvolveram um criogel macroporoso a partir de hidrogel do alginato reticulado covalentemente com nanobastões de ouro (NBsAu), incorporando o fármaco mitoxantrona (MX) como potencial antineoplásico

aplicada na terapia de câncer. Neste estudo, observou-se que os nanobastões foram modificados com polietilenoglicol (PEG) e através das caracterizações por MET e Uv-vis-NIR, as imagens dos NBsAu foram bem dispersas e apresentou pico de absorção longitudinal em torno de 808 nm, sugerindo que esta plataforma pode maximizar um efeito fototérmico devido a presença dos NBsAu no criogel, através de um laser na região do infravermelho próximo de 808 nm (IM; KIM, 2018).

Figura 50- Histograma de distribuição de tamanho de partículas para o gel de PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg.



Estudos relacionados sobre os nanobastões de ouro incorporados em polissacarídeos naturais a partir da quitosana sulfatada e goma arábica, foram realizados com intuito de observar a interação eletrostática entre a superfície dos NBsAu com os polissacarídeos e de acordo com as imagens de microscopia eletrônica de transmissão, observou-se que os NBsAu, NBsAu-GA e NBsAu-QuiS, indicaram tamanho médio de 45 nm × 15 nm, (razão de aspecto = 3), 47 nm × 15 nm e 43 nm × 14 nm, respectivamente, indicando que a forma e tamanho dos nanobastões foram preservada na estrutura formada (BARROS et al., 2016).

Mahmoud e colaboradores 2019 demonstraram em seu trabalho sobre uma promissora plataforma com propriedades antimicrobianas, teste *in-vitro* e *in-vivo*, a partir de hidrogel de polietilenoglicol (PEG), polialilamina (PAA) e hidrocloreto de polialilamina (PAH) com nanobastões de ouro. Os resultados obtidos através das imagens de MET para NBsAu e após diferentes modificações de superfície dos hidrogéis associados aos nanobastões de ouro indicaram comprimento e largura médios em torno de $49,2 \pm 1,8$ nm e $\sim 12,9 \pm 0,7$ nm, respectivamente e RA de aproximadamente $\sim 3,9$ (MAHMOUD et al., 2019).

8.9 GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETO DOS GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADO COM PpIX

A geração de oxigênio singleto foi determinada através do método químico (Figura 51), usando o 1,3-difelnilisobenzofurano (DPBF) como um sensor de oxigênio singleto por monitoramento fotooxidação sensibilizado de sua banda de absorção em ~ 400-410 nm (TADA et al., 2007). Na Fig. 51 a, observamos uma diminuição significativa na absorção máxima de DPBF de 46%, 41% e 55% na presença de géis PpIX, PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg respectivamente para banda máxima DPBF no intervalo de 30 min (Insert Fig 51 a). Há um decréscimo contínuo e uniforme de todos os géis, monitorando a banda de absorção de DPBF (414 nm) em função do tempo de irradiação com a maior redução para o gel de PpIX@(NPsAg@Alg) na degradação de DPBF, indicando que as nanopartículas de prata ajudaram na produção de ROS e neste sentido, podem ser consideradas uma ferramenta promissora para TFD. A estimativa do rendimento quântico de oxigênio singleto foi calculado por meio da Equação 5:

$$\Phi_S = \frac{K_S}{K_R} \times \frac{OD_R}{OD_S} \Phi_R \quad \text{Eq. 5}$$

onde k é slope para cada composto obtido após o ajuste com uma função linear (Tabela 1), OD, é a densidade óptica no comprimento de onda de irradiação do laser (660 nm), S e R representam amostra e referência respectivamente. Depois que os dados foram plotados como Ln versus tempo de irradiação, linhas retas foram obtidas para os sensibilizadores, e o slope para cada composto foi obtida após o ajuste com uma função linear (Figura 51 b). O rendimento quântico do oxigênio singleto (Φ_S) foi calculado para todas as amostras a partir do valor referência em etanol ($\Phi_R = 0.49$) (CHENG et al., 2008; LEE et al., 2009; FAKAYODE et al., 2017; GUALDESIA et al., 2016). O perfil de redução da intensidade de absorção do DPBF foi similar para todos os géis (Figura 52).

Figura 51- a) Variação da absorbância da banda em 414 nm da solução de DPBF na presença de géis híbridos PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg: **Insert:** variação da absorbância máxima na faixa DPBF para todos os géis. b) Fotooxidação de DPBF através da produção de oxigênio singlete irradiado com um laser de 660 nm CW.

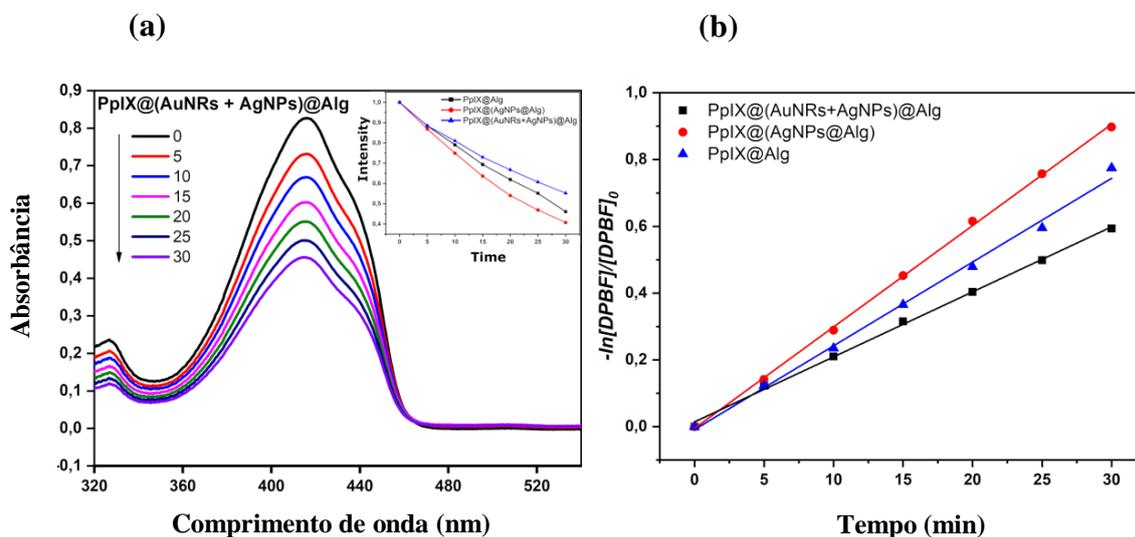
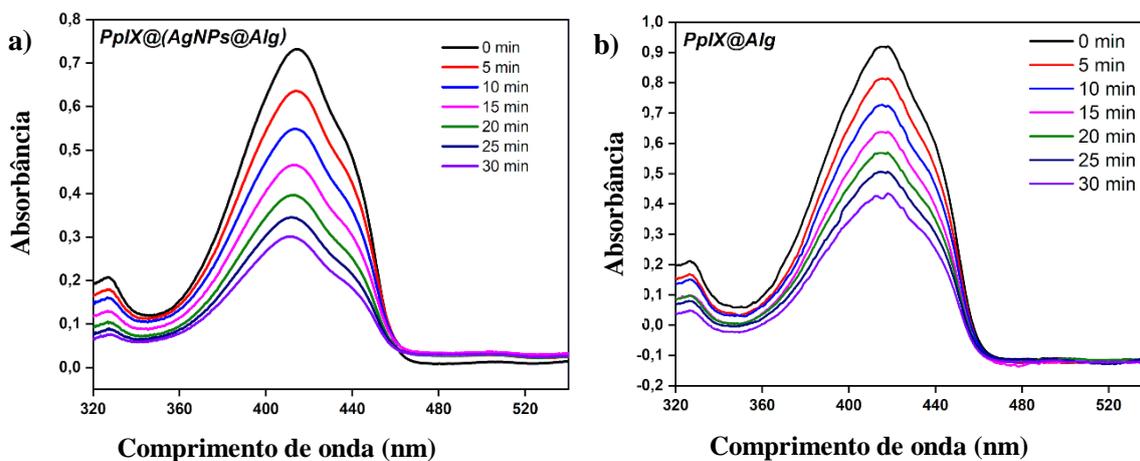


Figura 52- Variação da absorbância da banda máxima em 414 nm da solução de DPBF nos géis híbridos de : a) PpIX@(NPsAg@Alg) e b) PpIX@Alg.



O rendimento quântico do oxigênio singlete (Φ_s) para os géis híbridos são apresentados na Tabela 6:

Tabela 6- Rendimento quântico e oxigênio singleto de alguns fotossensibilizador relatados.

Fotossensibilizador	Método	$^1\text{O}_2$ Rendimento (Φ_s)	Referências
Poli (N-isopropilacrilamida)- Porfirina	Químico	43%	(BELALI et al., 2017)
PpIX@Alg	Químico	12,9%	Este trabalho
PpIX@(NPsAg@Alg)	Químico	26,4%	Este trabalho
PpIX@(NBsAu+NPsAg@Alg)	Químico	17,5%	Este trabalho

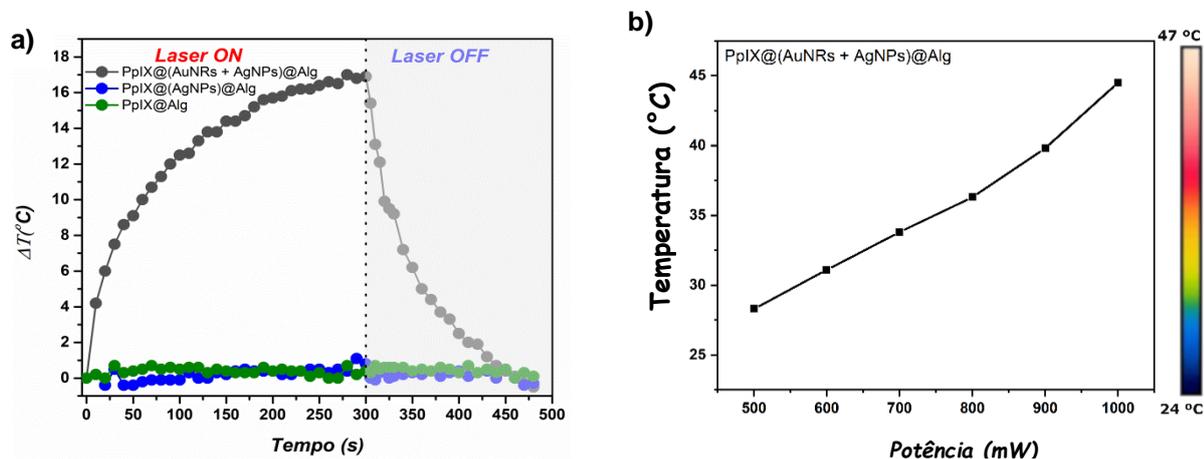
A incorporação de prata no gel aumenta consideravelmente o Φ_{Δ} quando comparado com o gel PpIX@Alg, indicando que as nanopartículas de prata grande potencial a formação de oxigênio singleto. Depois a incorporação de nanobastão de ouro, houve uma redução considerável de $\Phi(s)$ em relação à PpIX@(NPsAg@Alg), devido à absorvância dos nanobastões de ouro estar próxima da banda de absorção do fotossensibilizador PpIX. A intereção entre PpIX e o nanobastão de ouro favorece um rendimento quântico mais baixo para o gel híbrido, devido a contribuição dos picos menos intenso do macrociclo PpIX região de absorção da banda Q (FERREIRA et al., 2017). A PpIX atua como fotossensibilizador, absorvendo fótons através da intereção da radiação laser (660 nm), levando ao estado excitado. No ambiente molecular, a intereção entre o excesso energético emitido pelo fotossensibilizador é suficiente para ativar a região do estado tripleto. Através da interseção em intersistema, o oxigênio molecular é ativado, levando à geração do estado singleto com alta reatividade (CHIAVIELLO et al., 2011).

8.10 TERAPIA FOTOTÉRMICA DOS GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADOS- PpIX

Afim de verificar as propriedades fototérmicas dos diferentes géis híbridos, um estudo do perfil fototérmico foi realizado para todos os géis (Figura 53). Um gráfico típico de temperatura versus tempo foi obtido da irradiação das amostras de géis com

laser 785 nm CW na potência de excitação 1000 mW (Fig. 53 a). Há variação total foi de $T_{amb} = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$ a temperatura máxima $T_{max} = 44,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, após 300 s de irradiação para o gel PpIX@(NBsAu + NPsAg)@Alg. O perfil de aquecimento mostra que a temperatura subiu rapidamente com o aumento do tempo de irradiação, bem como em relação a potência de excitação (Figura 53 b), mostrando boa eficiência de conversão da energia da radiação de excitação em energia térmica e viabilidade de aplicação para sistemas de tratamento de células cancerígenas a $T > 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ (JAQUE et al, 2014; CHEN et al., 2017). Não há variação significativa de T em relação ao controle e demais géis em estudo.

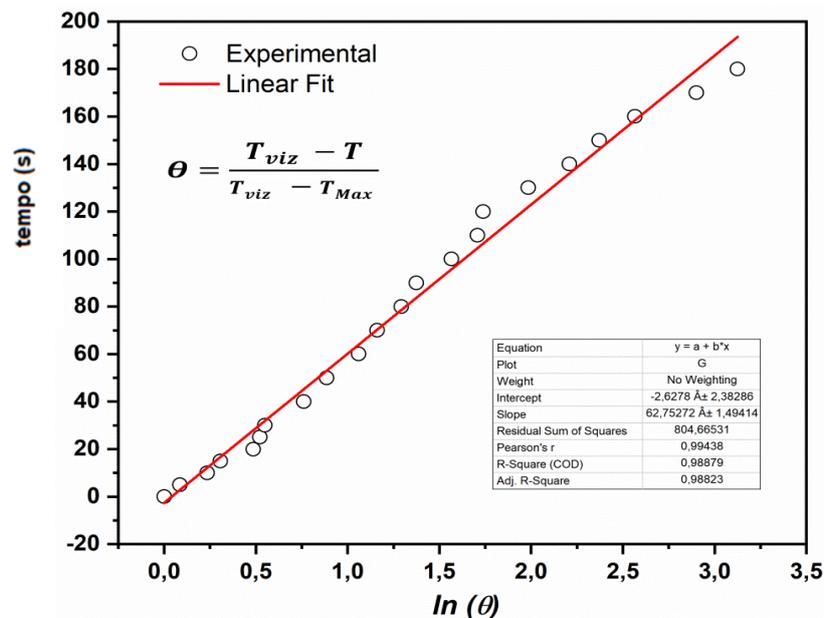
Figura 53- a) Efeito fototérmico da irradiação dos géis durante 5 min de irradiação (laser ON) NIR (785 nm) e 3 min de resfriamento (laser OFF). **b)** Variação da temperatura em função da potência de irradiação 500 a 1000 mW, laser CW 785 nm.



Após ajuste dos dados e com base na equação 3, avaliamos a eficiência de conversão fototérmica (η) para determinar a eficiência da luz de transdução para aquecimento do gel em função da presença de NBsAu. No plote do período de resfriamento (180 s) versus o logaritmo natural negativo da temperatura da força motriz (Θ), resultou no slope = 62,75 s (Figura 54). A eficiência de conversão fototérmica foi estimada em $\eta = 54,3\%$, indicou que o gel PpIX@(NBsAu + NPsAg)@Alg apresenta um alto potencial para ser usado como agente fototérmico na terapia fototérmica, sendo mais eficiente quando foi comparado com Wu e colaboradores et al., 2016, que apresentou em seu trabalho um novo nanocompósito fototérmico a partir de nanobastões de ouro e indicou uma eficiência fototérmica em torno de 25,6% (WU et al., 2016). Outro trabalho mais recente para obtenção de um hidrogel injetável multifuncional a base de alginato de sódio reticulado covalentemente com dissulfeto de molibdênio

(MoS₂), sulfeto de bismuto (III) (Bi₂S₃) e polietileno glicol (PEG), indicou um alto valor da eficiência de conversão fototérmica em torno de 42,7%, o que resultou em boas propriedades fototérmicas para o hidrogel (AS/MBP) (ZHAO et al., 2018).

Figura 54- Fit linear do período de resfriamento (180 s) versus o logaritmo natural negativo da temperatura da força motriz (Θ).

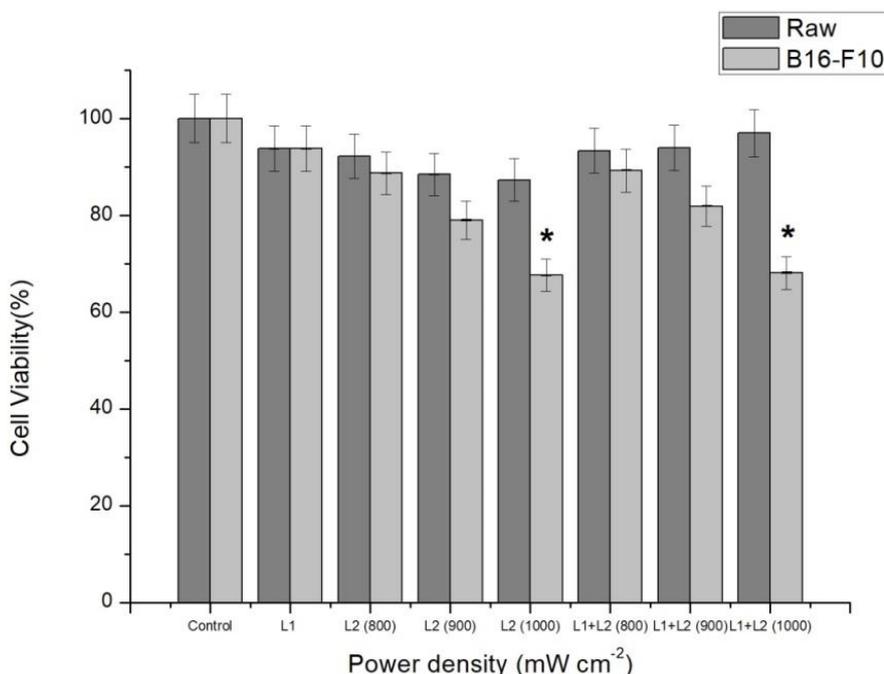


8.11 TESTES *IN VITRO* DOS GÉIS HÍBRIDOS CONJUGADO COM PPIX, APLICADA A TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD), FOTOTÉRMICA (TFT) E QUIMIOFOTOTERMAL

Nossa proposta foi desenvolver um gel híbrido conjugado, que a partir do uso de terapia Fotodinâmica (PDT), Fototérmica (PTT) e Quimiofototermal, fossem eficazes para o tratamento de câncer de pele. Contudo, é interessante que os materiais desenvolvidos apresentem baixa citotoxicidade para as células não tumorais, evitando assim possíveis efeitos adversos para o indivíduo que fará uso dessas terapias.

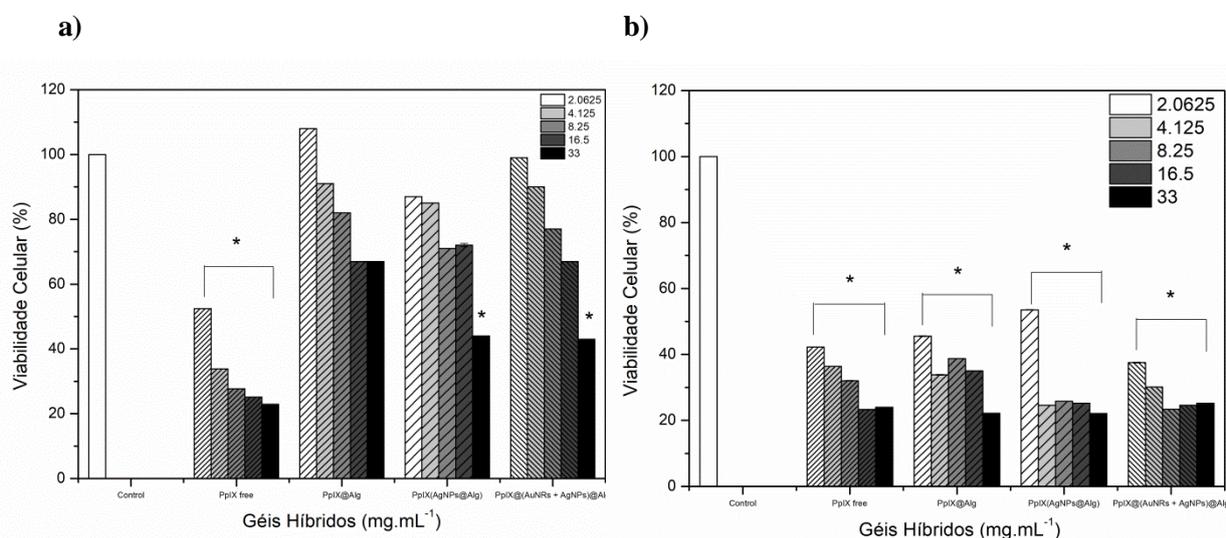
Para verificar a segurança do uso dos efeitos fotodinâmico e fototérmico, as células foram irradiadas com o Laser 1 (NIR CW 660 nm e 30 mW) e Laser 2 (NIR CW 785 nm, em diferentes densidades, variando de 800 a 1000 mW) como apresentada na Figura 55.

Figura 55- O efeito dos lasers usados para realizar efeito fotodinâmico e eficiência de conversão fototérmica: Laser 1 (NIR CW 660 nm e 30 mW) e Laser 2 (NIR CW 785 nm, sob diferentes densidade de potência, variando de (800 a 1000 mW) na viabilidade celular de célula Raw 264.7 e B16-F10. Os valores são mostrados com medias \pm DP; * $P < 0.05$.



A partir da Figura 55, verificou-se que o Laser 1 (L1), não reduziu significativamente a viabilidade celular nas linhagens Raw 264.7 e B16-F10, apresentando percentual de viabilidade de 93,79 e 93,77%, respectivamente. Com relação ao Laser 2 (L2), testado em diferentes potências, observou-se que este não apresentou efeito significativo na redução da viabilidade na linhagem de macrófagos Raw 264.7 em nenhuma das potências testadas (acima de 87%), porém para a linhagem de melanoma B16-F10, houve redução significativa da viabilidade celular na potência de 1000 mW, com porcentagem de 67,02% (SILVA et al., 2018). Quando se aplicou os dois lasers (L1+L2) simultaneamente, o padrão de resposta foi semelhante ao observado ao uso do laser 2 (L2), com redução de 68% de viabilidade na potencia de 1000 mW para L1+L2. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade dos géis híbridos bem como da PpIX livre sem irradiação podem ser observados nas Figures 56 a-b, para as linhagens celulares RAW 264.7 e B16-F10, respectivamente.

Figura 56- Citotoxicidade de PpIX livre, PpIX@Alg, PpIX(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu + NPsAg)@Alg em diferentes concentrações frente **a)** às linhagens de macrófagos Raw 264.7. **b)** de melanoma B16-F10, após 48 horas de exposição. Os valores estão apresentados em média \pm desvio padrão; $*P < 0.05$.

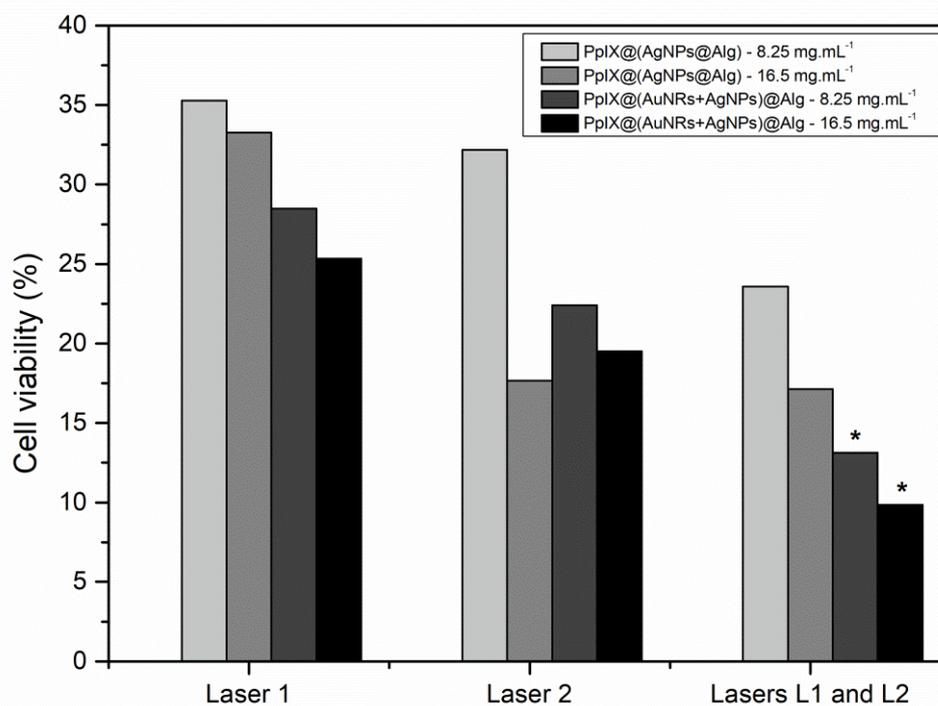


A protoporfirina (PpIX), utilizada na forma livre, reduziu significativamente a viabilidade celular tanto em células não tumorais (Raw 264.7) quanto para as células de melanoma (B16-F10), apresentando considerada citotoxicidade (LEE et al., 2011). Contudo, ao analisar os géis híbridos PpIX@Alg, PpIX(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, verificamos que concentrações variando entre 2,0625 a 16,5 mg.mL⁻¹ apresentou citotoxicidade significativa apenas para a linhagem de melanoma B16-F10. Apenas na concentração de 33 mg.mL⁻¹ os géis híbridos conjugados PpIX(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu + NPsAg)@Alg reduziram de forma significativa, para aproximadamente 44% de viabilidade celular, na linhagem não tumoral Raw 264.7. Estes resultados sugerem que os géis híbridos conjugados apresentam seletividade para linhagem de melanoma, o que é interessante, pois reduz os efeitos adversos para células não tumorais.

Segundo Baffy (2015), a maioria dos tratamentos utilizados no tratamento de câncer produzem efeitos colaterais muito prejudiciais ao paciente, principalmente aos mais debilitados, em virtude da citotoxicidade das drogas nas células não-tumorais, promovendo muitos efeitos colaterais graves. Atualmente, têm-se desenvolvido

diferentes tipos de carreadores visando à entrega controlada de uma grande variedade de fármacos. Esses nanocarreadores tem demonstrado grande potencial para transportar substâncias no organismo vivo com reduzida toxicidade, como verificado nos hidrogéis híbridos conjugados desenvolvidos neste trabalho. Além de trazer vários benefícios terapêuticos, estes podem também superar casos de resistência a múltiplas drogas pelas células cancerosas (JABIR et al., 2012). Para verificar se os géis híbridos conjugados apresentavam efeito satisfatório e sinérgico das terapias fotodinâmica e quimiofototermal, foram selecionados: PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu + NPsAg)@Alg, nas concentrações intermediárias de 8,25 e 16,5 mg.mL⁻¹ (Figura 57).

Figura 57- Terapia fotodinâmica e Quimiofototermal dos géis híbridos conjugados de PpIX(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu + NPsAg)@Alg, irradiados por: Laser 1 (NIR CW 660 nm e 30 mW), Laser 2 (NIR CW 785 nm, na potência 1000 mW) e os Lasers 1 e 2, simultaneamente em células tumorais B16-F10. Valores mostrados em média ± DP; **P* < 0.05.



Na Figura 57, o uso do Laser 1 indicou uma redução da viabilidade das células tumorais B16-F10 entre 25 a 35%, essa redução da viabilidade celular, ocasionada pelos géis híbridos de PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu +NPsAg)@Alg irradiados apenas com laser 1, ocorreu devido ao efeito fotodinâmico em decorrência do aumento da geração de oxigênio singlete. Pode-se sugerir que os plasmons de superfície das nanopartículas metálicas, presente no gel conjugado com a PpIX, contribuiu doando energia ou elétrons para o fotossensibilizador, originando um aumento da eficiência na

geração de oxigênio singleto (ROS) destes materiais e em decorrência disso houve redução da viabilidade das células tumorais (FREITAS et al., 2017; KAH et al., 2008).

Com relação a essas amostras irradiadas com laser 2, a viabilidade é reduzida ainda mais, principalmente para o gel PpIX@(NBsAu +NPsAg)@Alg, cuja o percentual de viabilidade é cerca de 20% na concentração de 16,5 mg.mL⁻¹. Esse resultado foi atribuído ao gel que contém (NBsAu +NPsAg), pois devido a presença dos nanobastões de ouro, a eficiência de conversão fototérmica foi significativa quando utilizou apenas o laser 2(NIR CW= 785 nm, potência de 1000 mW), indicando alto potencial fototérmico. Os NBsAu geram calor apenas quando irradiação do Laser 2, então sugere-se que uma elevação da temperatura com laser NIR em 785 nm favoreceu a uma boa citotoxicidade (THIRUNAVUKKARASU et al., 2019).

Após a irradiação com os dois Lasers simultaneamente, verificamos que o gel PpIX@(NBsAu + NPsAg)@Alg, nas concentrações testadas (8,25 e 16,5 mg.mL⁻¹) reduziram de forma significativa a viabilidade das células tumorais para 13,13 e 9,83%, respectivamente, confirmando assim a eficácia do uso da terapia fotodinâmica e quimiofototermal desse gel híbrido conjugado, o que sugere como uma plataforma com alto potencial gerando assim novas alternativas para o tratamento de câncer de pele.

Quando analisou a terapia fotodinâmicas e quimiofototermal combinadas, utilizando os dois lasers simultaneamente (Laser 1+Laser 2), observamos um resultado bastante promissor para os géis PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, pois apresentaram um efeito sinérgico das duas terapias e uma redução significativa uma vez que as células tumorais foram mais suscetíveis. Este sinergismo podem ser atribuído tanto a geração de oxigênio singleto na presença do NIR laser 1, devido a presença das nanopartículas metálicas e do fotossensibilizador PpIX conjugado nos géis (BELALI et al., 2018), o que provocou uma aceitável fotocitotoxicidade, quanto ao efeito fototérmico dos NBsAu na presença de NIR laser 2, assim como a classe dos fotossensibilizadores exibirem propriedades fototérmicas (BHANA et al., 2016; CHAMBRE, et al.,2018; XU et al., 2019). Desta forma, as terapias fotodinâmica e fototérmica são indicadas como grande potencial para serem aplicadas contra o câncer (ROZANOVA; ZHANG; 2009). Muitos estudos demonstram que a hipertermia imediatamente após a TFD, aumenta a eficácia de ambos os tratamentos. Isso acontece provavelmente por causa de uma inibição do reparo celular sistema causado pela TFD,

ou porque a hipertermia também inibe a resposta de reparo contra a TFD. Existe também um efeito sinérgico, uma vez que a PDT induz danos mitocondriais enquanto a hipertermia induz danos em outras organelas, como núcleo e membrana plasmática que não são oxidados pelo oxigênio singleto produzido nas mitocôndrias (MANG, 1990; YANASE et al., 2009).

9 CONCLUSÕES PARCIAIS

Hidrogéis a partir de alginato de sódio na concentração de 4% foi bem reticulado através do uso dos agentes químicos EDC/NHS, eles foram obtidos através de um método fácil e em uma única etapa de reação. Para a obtenção dos géis híbridos incorporando NBAu, NPAg e (NBAu+NPAg) conjugado com a PpIX, realizou um outra etapa e foram obtidos com sucesso.

De acordo com os testes reológicos, através do método rotacional, à viscosidade de todos os géis híbridos diminuíram à medida que a taxa de deformação aumentou, desta forma, os géis obtiveram um comportamento de fluxo classificando como não newtoniano com características de um material pseudo-plásticos. Os resultados para o método oscilatório indicam que o comportamento de todos os géis híbrido reticulado e conjugado covalentemente a PpIX e indicou maior módulo de armazenamento em relação ao módulo de perda, em toda região da frequência angular estudada, classificando os géis como sólidos viscoelástico. As propriedades viscoelásticas também foram analisadas com base na $\tan(\delta) < 1$ para os géis, características de um material sólido elástico, no intervalo de frequência estudada. Os espectros de FT-IR, dos géis híbrido a base de SA conjugado a NPsAg, NBsAu e PpIX apresentaram mudanças a aparecimento de picos característicos do alginato devido a reticulação com os agentes químicos EDC/NHS. Ao introduzir a PpIX ativada nos géis híbridos observou a formação da reticulação covalente entre o géis de Alg com a PpIX, sugerindo uma boa conjugação.

Através dos espectros de $^1\text{H-NMR}$ os resultados indicaram que a conjugação covalente dos géis híbridos foi confirmada através dos picos do biopolímero observados na região do alginato e foram identificados nos espectros picos distintos dos géis híbridos a partir da conjugação entre Alg com NPsAg, NBsAu e PpIX. Alguns sinais do Alg foram sobrepostos e novos picos surgiram entre 3,2- 4,1 ppm. Os sinais que aparecem nos géis híbridos em torno de 5,8-6,1 ppm são atribuídos a PpIX. A reticulação dos géis foram confirmadas também por picos adicionais em torno de 0,9-1,2 ppm atribuídos aos prótons do grupo CH_3 , por conta da ativação dos grupo carboxílico do alginato na presença de (EDC/NHS). As caracterizações térmicas de TGA e DSC se complementaram e confirmaram boa estabilidade para os géis híbridos conjugados com a PpIX. A inserção das nanopartícula de prata contribuíram para um aumento da estabilidade, entretanto, o efeito sinérgico entre a NPsAg e NBsAu,

indicaram uma menor estabilidade para este gel híbrido, conforme o resultado encontrado no DSC. A absorção do espectro de UV-vis-NIR, apresentou banda característica, desta família de compostos macrocíclicos, em boa concordância com outros derivados de compostos da porfirina previamente reportados, assim como série de bandas características dos grupos inseridos como as das nanopartículas de prata e nanobastões de ouro).

As imagens obtidas por MEV revelaram que os géis de Alg@(EDC/NHS), apresentou a morfologia superficial e transversal com tamanho dos poros em torno de 50 a 100 μm e indicou estruturas contínuas de formas semelhantes. Os géis híbridos conjugados, apresentaram em suas estruturas morfológicas superficial a presença da PpIX, bem como das NPsAg esférica dispersa na faixa de tamanho características da nanopartícula de prata. As imagens obtidas por MET confirmaram a presença das NPsAg no gel híbrido PpIX@(NPsAg@Alg), assim como das (NPsAg+NBsAu) no gel de PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, conforme suas morfologias de forma esféricas para NPsAg e nanobastões para NBsAu, através do cálculo de tamanho de partícula, não houve mudança significativa, predominando assim as características de forma e tamanho nos géis conjugado das nanopartículas de prata de $(29,16\pm 1,66)$. O tamanho médio dos nanobastões no gel de PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, indicou valor para razão de aspecto de $(4,65\pm 0,06)$.

O efeito fotodinâmico apresentado indicou que as nanopartículas de prata ajudaram na produção de ROS, como uma ferramenta promissora para PDT. A incorporação de prata no gel aumentou o rendimento quântico de 47,10%, indicando as nanopartículas de prata como grande potencial a formação de oxigênio singlete. A incorporação de nanobastão de ouro, indicou também uma redução considerável do rendimento de 29,88%, devido à absorbância dos nanobastões de ouro estar próxima da banda de absorção do fotossensibilizador PpIX. A propriedade fototérmica do gel híbrido PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, apresentou uma boa eficiência de conversão fototérmica estimada em torno de $\eta=54,3\%$, e indicou o gel PpIX@(NBsAu + NPsAg)@Alg como alto potencial e bom agente fototérmico.

Em virtude dos resultados *in vitro* obtidos, conclui-se que os géis híbridos conjugados desenvolvidos são promissores no tratamento de câncer de pele, apresentando seletividade para as mesmas. Com destaque para o gel PpIX@(NBsAu +

NPsAg)@Alg, que quando irradiados com os Lasers 1 (PDT) e Laser 2 (PTT), simultaneamente, torna-se eficaz para o tratamento de melanoma, devido ao excelente efeito fotodinâmico + quimiofototérmico, pois a viabilidade celular das células B16-F10 diminuiu significativamente para 9,83%, após a ação dos NIR Lasers 1+2 (660 nm, potência de 30 mW) + (785 nm, potência de 1000 mW), cinco minutos para cada laser. Assim, recomenda-se a realização de ensaios *in vivo* para verificar a segurança de uso desses materiais na terapia antitumoral.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do biopolímero alginato de sódio, síntese de fluidos e hidrogéis reticulado fisicamente, foram realizadas com sucesso. Sendo corroborada com os resultados dos testes reológicos rotacionais e oscilatório, FT-IR, TGA e DSC. A incorporação das soluções de nanopartículas de prata e os nanobastões de ouro também foram bem realizadas conforme indicaram os resultados do Uv-vis-NIR. As imagens de MEV e MET confirmaram a obtenção das NPsAg e dos NBsAu respectivamente. Os hidrogéis de Alg@(NBsAu+NPsAg), reticulado fisicamente também indicaram resultados satisfatórios diante dos testes biológicos utilizando os métodos por CMI, CMB e halos de inibição frente a bactérias gram positivas e negativa.

Os hidrogéis a base de alginato foram também reticulados quimicamente utilizando agentes químicos de acoplamento (EDC/NHS), durante o processo de síntese, este novo gel foi obtido de forma satisfatória, confirmando através das caracterizações por reologia, FT-IR, RMN¹, TGA e DSC. Ao associar as nanopartículas de prata e nanobastões de ouro e conjugar com o fármaco fotossensibilizador PpIX, foram obtidos os géis híbridos conjugados de PpIX@Alg, PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, na qual confirmaram suas sínteses através do aparecimento das bandas características das NPsAg e à ressonância de plasma de superfície transversal (TSPR) e a ressonância de plasma de superfície longitudinal (LSPR) característicos dos NBsAu, assim como bandas do macrociclo derivados do grupo das porfirinas foram presentes nos espectros de UV-vis-NIR. Após a reticulação com agentes químicos e conjugação os géis híbridos apresentaram mudanças espectrais na região do infravermelho e também o aparecimento de novos picos conforme indicaram o FT-IR e RMN¹ respectivamente. Os géis conjugados resultaram em melhores estabilidades térmicas de acordo com TGA e DSC. As imagens de MEV superficial e transversal corroboram a esses resultados, pois apresentaram a formação dos poros característicos do gel de Alg@EDC/NHS. As imagens por MEV superficial para o gel conjugado contendo nanopartículas de prata apresentaram uma boa dispersão com tamanho característico das NPsAg. As imagens por transmissão confirmaram a presença das NPsAg e dos (NBsAu+NPsAg) nos géis híbridos conjugados. Os tamanhos e formas das nanopartículas e dos nanobastões não obtiveram mudanças significativas nos géis conforme a realização do cálculo da distribuição de tamanho de partículas e corroboram aos espectros de UV-vis-NIR dos géis híbridos conjugados.

Estudo de terapia fotodinâmicas e propriedades fototérmicas foram evidenciados nos géis de PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg, indicando estes géis promissores para geração de oxigênio singlete (ROS) e bons agentes fototérmico, respectivamente.

Baseando nos resultados *in vitro* obtidos, os géis híbridos conjugados de PpIX@(NPsAg@Alg) e PpIX@(NBsAu+NPsAg)@Alg foram considerados uma plataforma bastante promissora, no tratamento de câncer de pele, atribuída a seletividade para as mesmas, assim como um efeito sinérgico apresentado quando irradiados com os Laser 1 (PDT) e Laser 2 (PTT), simultaneamente, devido apresentar excelente efeito fotodinâmico + quimiofototérmico. Uma ênfase maior foi para o gel de PpIX@(NBsAu + NPsAg)@Alg, pois a viabilidade das células B16-F10 diminuiu drasticamente, após irradiação com os dois lasers. Estes resultados recomenda-se a realização de ensaios *in vivo* para avaliar a eficiência antitumoral e segurança e eficácia de uso desses géis híbridos conjugados, através das terapias fotodinâmica, fototérmica e quimiofototermal.

11 PERSPECTIVAS

- ✚ Determinar as concentrações dos metais presentes nas soluções coloidais das nanopartículas de prata e nanobastões de ouro presente nos géis híbridos através da técnica de ICP-OES;
- ✚ Realizar análise por microscopia confocal dos géis conjugados;
- ✚ Realizar testes *in vivo* dos géis híbridos conjugado na linhagem celular B16-F10, e aplicar terapia fotodinâmica, fototérmica e quimiofototérmal.

REFERÊNCIAS

- ABDELRASOUL, G.N. et al., Nanocomposite scaffold fabrication by incorporating gold nanoparticles into biodegradable polymer matrix: Synthesis, characterization, and photothermal effect. **Materials Science and Engineering C**, v. 56, p.305–310, 2015.
- AHMED, E. M. et al. An innovative method for preparation of nanometal hydroxide superabsorbent hydrogel. **Carbohydr Polym.** v.91, p.693–8, 2013.
- AHN, D. et al. Doxorubicin-Loaded Alginate - g - Poly(N - isopropylacrylamide) Micelles for Cancer Imaging and Therapy. 2014.
- AN, H. et al. Hyaluronate-alginate hybrid hydrogels modified with biomimetic peptides for controlling the chondrocyte phenotype. **Carbohydrate Polymers**, v.197, p.422-430, 2018.
- AKHTAR, M. F.; HANIF, M.; RANJHA, N.; M. Methods of synthesis of hydrogels . . . A review. **Saudi Pharmaceutical Journal.** v.24, p.554–559, 2016.
- ALKILANY, A. M. et al. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects. **Small**, v. 5, n. 6, p. 701–708, 2009.
- ALMDAL, K.; HVIDT, J.; D.; S.; KRAMER, O. *Polymer Gels and Networks*, v.1, p. 5 1993.
- ALSBERG, E. et al. Cell-Interactive Alginate Hydrogels for Bone Tissue Engineering. **J. Dent. Res.** v.80, n.11, p. 2025–2029, 2001.
- ALVAREZ, K.; NAKAJIMA, H. Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. p. 790–832, 2009.
- AMULYA, K. Saxena synthetic biodegradable hydrogel (Pleura Seal) sealant for sealing of lung tissue after thoracoscopic resection. **J Thoracic Cardiovasc Surg.** v. 139, p. 496–7, 2010.
- BAFFY, G. Decoding multifocal hepatocellular carcinoma: an opportune pursuit. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 4, n. 3, p. 206–20610, 2015.
- BAPTISTA, M.S. et al. Type I and type II photosensitized oxidation reactions: guidelines and mechanistic pathways. **Photochem. Photobiol.** n. 4, p. 912-919, 2017.
- BAKER, S.; SATISH, S. Biosynthesis of gold nanoparticles by *Pseudomonas veronii* AS41G inhabiting *Annona squamosa* L, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 150, 691–695, 2015.

BALAKRISHNAN, B. et al. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate na gelatin. **Biomaterial.** v.26, p. 6335-42, 2005.

BALAKUMARAN, M. D. et al., Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. **Microbiological Research.** v. 182, p.8–20, 2016.

BANORIYA, D.; PUROHIT, R.; DWIVEDI, R. K. Advanced Application of Polymer based Biomaterials. **Materials Today: Proceedings,** v. 4, n. 2, p. 3534–3541, 2017.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. **An introduction to rheology,** elsevier science b.v. 1989.

BARROS, H. R. et al. Surface interactions of gold nanorods and polysaccharides: From clusters to individual nanoparticles. **Carbohydrate Polymers.** v. 152, p. 479–486, 2016.

BASTUS, N.G. et al. Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties, **Chem. Mater.** v.26, p.2836–2846, 2014.

BAYAZITOGLU, et al., An overview of nanoparticle assisted laser therapy. **International Journal of Heat and Mass Transfer.** v.67, p.469-486, 2013.

BELALI, S. et al. Synthesis and Characterization of Temperature-Sensitive and Chemically Cross-Linked Poly(N-isopropylacrylamide)/Photosensitizer Hydrogels for Applications in Photodynamic Therapy. **Biomacromolecules,** v. 19, n. 5, p. 1592–1601, 2018.

BELALI, S.; KARIMI, A. R.; HADIZADEH, M. Novel nanostructured smart, photodynamic hydrogels based on poly(N -isopropylacrylamide) bearing porphyrin units in their crosslink chains: A potential sensitizer system in cancer therapy. **Polymer,** v. 109, p. 93–105, jan. 2017.

BELALI, S.; KARIMI, A. R.; HADIZADEH, M. Cell-specific and pH-sensitive nanostructure hydrogel based on chitosan as a photosensitizer carrier for selective photodynamic therapy. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 110, p. 437–448, 2018.

BENCHABANE, A.; BEKKOUR, K. Rheological properties of carboxymethyl cellulose (CMC) solutions. **Colloid and Polymer Science,** v. 286, n. 10, p. 1173–1180, 2008.

BENNETT, C. O.; MEYERS, J.E. – **Fenômenos de Transporte: quantidade de movimento, calor e massa** – McGraw-Hill do Brasil – São Paulo, 1982.

BHANA, S. et al. Photosensitizer-loaded gold nanorods for near infrared photodynamic and photothermal cancer therapy. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 469, p. 8–16, 2016.

BHATTACHARYA, R.; MUKHERJEE, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v.60, p.1289–1306, 2008.

BINDHU, M.R.; UMADEVI, M. Antibacterial activities of green synthesized gold nanoparticles, **Mater. Lett.** 120, 122–125 (2014).

BRAATHEN, L.R. et al. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 56, p. 125-143, 2007.

BHAUMIK, J. et al. Applications of phototheranostic nanoagents in photodynamic therapy. **Nano Research**, v. 8, n. 5, p. 1373–1394, 2015.

BRYDSON, J.A. London, **Elsevier Applied Science**. 1 ed., 1988.

BRESOLIN, T.M.B. et al. Sistemas de liberação de fármacos. In: BRESOLIN, B.M.T.; CECHINEL FILHO, V. Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Univali, p. 192-214, 2003.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncol.** v. 5, p. 497-508, 2004.

BOCA, S. C. et al. Chitosan-coated triangular silver nanoparticles as a novel class of biocompatible, highly effective photothermal transducers for *in-vitro* cancer cell therapy. **Cancer Letters**, v.311, p. 131–140, 2011.

BOSE, S.; ROY, M.; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 546–554, 2012.

BURYGIN, G.L. On the enhanced antibacterial activity of antibiotics mixed with gold nanoparticles. **Nanoscale Res. Lett.** 4, 794–801 (2009).

CALLISTER, W. D. Jr. Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução. Rio de Janeiro, LTC, 2002.

CALLISTER, J.; R., W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução**. LTC, v. 8^o Edição, 201, 2013.

CANEVAROLO, J.R.S.V. Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. 3^a edição. São Paulo: Artliber Editora, 2010.

CAPLIN, J. D.; GARCÍA, A. J. Implantable antimicrobial biomaterials for local drug delivery in bone infection models. **Acta Biomaterialia**, v. 93, n. January, p. 2–11, 2019.

CARBO´-ARGIBAY, E. et al. **Angew. Chem. Int.** v. 46, p. 8983, 2007.

CAROTHERS, W. H. Studies on polymerization and ring formation. I. An introduction to the general theory of condensation polymers. **J. Am. Chem. Soc.** v.51, n.8, p.2548–2559, 1929.

CASAS, A. et al. ALA and ALA hexyl ester-induced porphyrin synthesis in chemically induced skin tumours: the role of different vehicles on improving photosensitization. **Brit. J. Cancer**, v. 85, p. 1794–1800, 2001.

CELIKIN, N. et al. Naturally derived proteins and glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v.1, p.1277-1299, 2017.

CHAMBRE, L. et al. Surfactant-Free Direct Access to Porphyrin-Cross-Linked Nanogels for Photodynamic and Photothermal Therapy. **Bioconjugate Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 4149–4159, 2018.

CHEN, X. et al. Enzymatic and chemo enzymatic approaches to synthesis of sugar based polymer and hydrogels. **Carbohydr Polym.** v.28, p.15–21, 1995.

CHEN, X. et al. A new extraction method of fucoidan from the soaked water of brown seaweed (*Laminaria japonica*). **Desalination and Water Treatment**, v. 40, n. 1–6, p. 204–208, 2012.

CHEN, H. et al. Gold nanorods and their plasmonic properties. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 7, p. 2679–2724, 2013.

CHEN, M. et al. Synthesis and solar photo-thermal conversion of Au, Ag, and Au-Ag blended plasmonic nanoparticles. **Energy Conversion and Management**, v.127, p.293–300, 2016.

CHEN, W. et al. Black Phosphorus Nanosheet-Based Drug Delivery System for Synergistic Photodynamic/Photothermal/Chemotherapy of Cancer. **Advanced Materials**, v. 29, n. 5, p. 1–7, 2017.

CHEN, H. et al. Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v.70, p. 287–295, 2017.

CHEN, W. H. et al. Overcoming the Heat Endurance of Tumor Cells by Interfering with the Anaerobic Glycolysis Metabolism for Improved Photothermal Therapy. **ACS Nano**, v. 11, n. 2, p. 1419–1431, 2017a.

CHEN, X. et al. Facile synthesis of polypyrrole@metal-organic framework core-shell nanocomposites for dual-mode imaging and synergistic chemo-photothermal therapy of cancer cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 9, p. 1772–1778, 2017b.

CHEN, T. et al. Ultratough, Self-Healing, and Tissue-Adhesive Hydrogel for Wound Dressing. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 39, p. 33523–33531, 2018.

CHENG, Y. et al. Highly Efficient Drug Delivery with Gold Nanoparticle Vectors for in Vivo Photodynamic Therapy of Cancer. **J. Am. Chem. Soc.** v. 130, p.10643–10647, 2008.

CHENG, H. B. et al. Turn-On Supramolecular Host-Guest Nanosystems as Theranostics for Cancer. **Chem**, v. 5, n. 3, p. 553–574, 2019.

- CHIAVIELLO, A.; POSTIGLIONE, I.; PALUMBO, G. Review: Targets and Mechanisms of Photodynamic Therapy in Lung Cancer Cells: A Brief Overview. **Cancers**, v.3, p.1014-1041, 2011.
- CHOLEWINSKI, A.; YANG, F. K.; ZHAO, B. Underwater Contact Behavior of Alginate and Catechol-Conjugated Alginate Hydrogel Beads. **Langmuir**, v.33, p.8353–8361, 2017.
- CHRISTOPHER, G. et al. Polyelectrolyte-coated gold nanorods and their interactions with type I collagen. **Biomaterials**. v. 30, p. 5639–5648, 2009.
- CHU, K. F.; DUPUY, D. E. Thermal ablation of tumours: Biological mechanisms and advances in therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 3, p. 199–208, 2014.
- COATES, J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: Meyers, R.A. (Ed.), **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, p. 10815–10837, 2000.
- COPLAND, J.A. et al. Bioconjugated gold nanoparticles as a molecular based contrast agent: implications for imaging of deep tumors using optoacoustic tomography. **Mol. Imaging Biol.**, v.6, p.341–349, 2004.
- COVARRUBIAS, S.A. et al. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 93, p. 2669–2680, 2012.
- DAI, X. H. et al. Synthesis and characterization of thermosensitive, star-shaped poly(ϵ -caprolactone)-block-Poly(N-isopropylacrylamide) with porphyrin-core for photodynamic therapy. **Journal of Polymer Research**, v. 21, n. 6, 2014.
- DAMM, C.; MÜNSTEDT, H.; RÖSCH, A. The antimicrobial efficacy of polyamide 6/silver-nano- and microcomposites. **Materials Chemistry and Physics**, v. 108, n. 1, p. 61–66, 2008.
- DAS, J.; VELUSAMY, P. Catalytic reduction of methylene blue using biogenic gold nanoparticles from *Sesbania grandiflora* L, J. **Taiwan Inst. Chem. Eng.** v. 45, p. 2280–2285, p. 2014.
- DE MORAES, M. A. et al. Silk fibroin and sodium alginate blend: Miscibility and physical characteristics. **Materials Science and Engineering C**. v.40, p. 85–91, 2014.
- DEHGHANI, F.; ANNABI, N. Engineering porous *scaffolds* using gas-based techniques. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.22, p.661–666, 2011.
- DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897–3915, 2004.
- DHINAGAR, N. J.; CELENK, M.; AKINLAR, M. A. **Noninvasive Screening and Discrimination of Skin Images for Early Melanoma Detection**. 2011 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. **Anais...IEEE**, maio 2011Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/5780198/>>

- DING, C. et al. Dually Responsive Injectable Hydrogel Prepared by In Situ Cross-Linking of Glycol Chitosan and Benzaldehyde-Capped PEO-PPO-PEO. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 4, p. 1043–1051, 12 abr. 2010.
- DING, H. et al. Nanoscopic micelle delivery improves the photophysical properties and efficacy of photodynamic therapy of protoporphyrin IX. **Journal of Controlled Release**, v. 151, n. 3, p. 271–277, 2011.
- DIVYARANI, V. V. et al. Fabrication of alginate/nano TiO₂ need le composite scaffolds for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**. v.83, p. 858–864, 2011.
- D’ORAZIO, J. et al. UV radiation and the skin. **Int. J. Mol. Sci.** v.14 (6), p. 12222–12248, 2013.
- DRAGET, K.; I.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. Alginate based new materials. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 2, p. 47-55, 1997.
- DRURY, J.; L.; MOONEY, D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**. v.24, p.4337-4351, 2003.
- EGHBALIFAM, N.; FROUNCHI, M.; DADBIB, SUSAN. Antibacterial silver nanoparticles in polyvinyl alcohol/sodium alginate blend produced by gamma irradiation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p.170-176, 2015.
- ELBESHEHY, E.K.F.; ELAZZAZY, A.M.; AGGELIS, G. Silver nanoparticles synthesis mediated by new isolates of Bacillus spp., nanoparticle characterization and their activity against bean yellow mosaic virus and human pathogens. **Front.Microbiol.** v. 6, p. 453, 2015.
- ELIM, S. H. et al. Electronic and optical properties of nitrogen-doped multiwalled carbon nanotubes, **Phys Rev. B**, v. 73, 1–6, 2006.
- ERATHODIYIL, N.; YING, J. Y. Functionalization of inorganic nanoparticles for bioimaging applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 925–935, 2011.
- ESCOSURA-MUNIZ, A. D. L. et al. **Anal. Chem.** v.81, p. 10268–10274, 2009.
- FAFAL, T. et al. Synthesis, characterization and studies on antioxidant activity of silver nanoparticles using *Asphodelus aestivus* Brot. aerial part extract. **South African Journal of Botany**. v.112, p. 346–353, 2017.
- FAKAYODE, O. J.; SONGCA, S. P.; OLUWAFEMI, O. S. Singlet oxygen generation potential of thiolated methoxy-polyethyleneglycol encapsulated superparamagnetic iron oxide nanoparticles-gold core-shell meso-5, 10, 15, 20-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin. **Materials Letters**, v.199, p.37-40, 2017.

- FAN, L. et al. Sodium alginate conjugated graphene oxide as a new carrier for drug delivery system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, 582–590, 2016.
- FENG, L.; CAO, Y.; XU, D.; WANG, S.; ZHANG, J. Molecular weight distribution, rheological property and structural changes of sodium alginate induced by ultrasound. **Ultrasonics Sonochemistry**. 34, 609–615 (2017).
- FERNANDEZ-FERNANDEZ, A.; MANCHANDA, R.; MCGORON, A. J. Theranostic applications of nanomaterials in cancer: Drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 7–8, p. 1628–1651, 2011.
- FERNÁNDEZ-FARRÉS, I.; DOUAIRE, M.; NORTON, I.T. Rheology and tribological properties of Ca-alginate fluid gels produced by diffusion-controlled method. **Food Hydrocolloids**. v. 32, p.115-122, 2013.
- FERREIRA, D. C. et al. Hybrid systems based on gold nanostructures and porphyrins as promising photosensitizers for photodynamic therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 297–307, 2017.
- FERRY, J. D. “*Viscoelastic Properties of Polymers*”, John Wiley & Sons, New York, 1980.
- FLORY, P. J. “*Principles of Polymer Chemistry*” Cornell University Press, Ithaca, NY, 1978.
- FREITAS, L. F. et al. Zinc phthalocyanines attached to gold nanorods for simultaneous hyperthermic and photodynamic therapies against melanoma in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 181–186, 2017.
- GAI, P. L.; HARMER, M. A. Surface Atomic Defect Structures and Growth of Gold Nanorods. **Nano Letters**, v. 2, n. 7, p. 771–774, 2002.
- GAWARE, V. S. et al. Tetraphenylporphyrin Tethered Chitosan Based Carriers for Photochemical Transfection. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 807–819, 14 fev. 2013.
- GE, J. et al. A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–8, 2014.
- GEORGE, M.; ABRAHAM, E.T. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**. v. 114, p. 1-14, 2006.
- GHASEMZADEH, H.; GHANAAT, F. Antimicrobial alginate/PVA silver nanocomposite hydrogel, synthesis and characterization. **Journal of Polymer Research**, v.21, p.355, 2014.

GICHEVA, G.; YORDANOV, G. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Removal of citrate-coated silver nanoparticles from aqueous dispersions by using activated carbon. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 431, p. 51–59, 2013.

GINZBERG, M. D. et al. Liver tissue engineering within alginate scaffolds: Effects of cell-seeding density on hepatocyte viability, morphology and function. **Tissue Engineering**. v. 9, p. 757–766, 2003.

GREENLEE, R. T. et al. *Cancer Statistics*, 2000. p. 7–33, 2000.

GOLE, A.; MURPHY, C.J. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed, **Chem. Mater.** v.16, p.3633–3640, 2004.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, M. I. et al. Silver nanoparticle based antibacterial methacrylate hydrogels potential for bone graft applications. **Materials Science and Engineering C**. v.50, p.332–340, 2015.

GU, Z. et al. Recent advances in design and fabrication of upconversion nanoparticles and their safe theranostic applications. **Advanced Materials**, v. 25, n. 28, p. 3758–3779, 2013.

GUO, M. et al. Dual imaging-guided photothermal/photodynamic therapy using micelles. **Biomaterials**, v. 35, n. 16, p. 4656–4666, 2014.

GUALDESIA, M. S. et al. International Synthesis and physicochemical properties of polyacrylamide nanoparticles as photosensitizer carriers. **Journal of Pharmaceutics**, v.512, p.213–218, 2016.

HACKER, M.; MIKOS, C.; A.; G. Synthetic polymers, principles of regenerative medicine. 2nd ed.; p. 587–622, 2011.

HAINES-BUTTERICK, L. et al. Controlling hydrogelation kinetics by peptide design for three-dimensional encapsulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.104, p.7791-7796, 2007.

HAEDICKE, K. et al. Multifunctional calcium phosphate nanoparticles for combining near-infrared fluorescence imaging and photodynamic therapy, **Acta Biomater.** v. 14 p. 197-207, 2015.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638–1649, dez. 2008.

HAO, M. et al. Polydopamine-coated Au-Ag nanoparticle-guided photothermal colorectal cancer therapy through multiple cell death pathways. **Acta Biomaterialia**, v. 83, p. 414–424, 2019.

- HARIKIRAN, L.; NARSIMHAREDDY, Y. Cytotoxicity, oxidative stress, and inflammation in human Hep G2 liver epithelial cells following exposure to gold nanorods. **Toxicol. Mech. Methods**, v. 26, p. 340–347, 2016.
- HIKMET, R.M.; CALLISTER, S. ; KELLER, A. **Polymer**, 29, p. 1378, 1988.
- HO, V. T. T. Synthesis of Silver Nanoparticles via Chemical Reduction and its Anti-bacterial Activities in Wastewater of Shrimp Pond. v. 5, n. 6, p. 4–8, 2016.
- HOFFMAN, A.; S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 18-23, 2012.
- HONG, E.J.; CHOI, D.G.; SHIMN, M.S. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials, **Acta Pharm. Sin. B** v. 6 (4), p. 297–307, 2016.
- HOQUE, M. E.; CHUAN, Y. L.; PASHBY, I. Extrusion based rapid prototyping technique: an advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication, **Biopolymers**, v.97, p. 83–93, 2011.
- HUANG, X.; NERETINA, S.; EL-SAYED, M. A. Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. **Adv. Mater.** v.21, p. 4880 - 4910, 2009.
- HUANG, X. et al. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. **Lasers in Medical Science**, v. 23, n. 3, p. 217–228, 3 jul. 2008.
- HUFF, T.; B. et al. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. **Nanomedicine**. v.2, p. 125-132, 2007.
- IM, P.; KIM, J. On-Demand Macroscale Delivery System Based on a Macroporous Cryogel with a High Drug Loading Capacity for Enhanced Cancer Therapy. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 4, n. 10, p. 3498–3505, 2018.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Disponível em: < <http://https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma/profissional-de-saude>. Acesso em: 15 mai. 2019.
- ISO/TR 10993-22. Biological evaluation of medical devices part 22: guidance on nanomaterials. International Organization for Standardization, 2016.
- IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chem.** v.13, p. 2638, 2011.
- ISLAM, M. S.; KARIM, M. R. Fabrication and characterization of poly(vinyl alcohol)/alginate blend nanofibers by electrospinning method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 366, n. 1–3, p. 135–140, 2010.
- JAISWAL, D. et al. Gelatin nanofiber matrices derived from schiff base derivative for tissue engineering applications, *J. Biomed. Nanotechnol.* v. 11, p. 2067-2080, 2015.

- JAQUE, D. et al. Nanoparticles for photothermal therapies, **Nanoscale**, v. 21, p. 9494-530, 2014.
- JIA, Q. et al. Gold nanorod@silica-carbon dots as multifunctional phototheranostics for fluorescence and photoacoustic imaging-guided synergistic photodynamic/photothermal therapy. **Nanoscale**, v. 8, n. 26, p. 13067–13077, 2016.
- JING, T. et al. A reduction-responsive polypeptide nanogel encapsulating NIR photosensitizer for imaging guided photodynamic therapy, **Polym. Chem.** v. 7, p. 951-957, 2016.
- JOVANOVIĆ, Z. et al. Alginate hydrogel microbeads incorporated with Ag nanoparticles obtained by electrochemical method. **Materials Chemistry and Physics**, v. 133, p.182–189, 2012.
- JUNG, H. S. et al. Nanographene oxide-hyaluronic acid conjugate for photothermal ablation therapy of skin cancer. **ACS Nano**, v. 8, n. 1, p. 260–268, 2014.
- KAH J.C.Y. et al. Combinatorial treatment of photothermal therapy using gold nanoshells with conventional photodynamic therapy to improve treatment efficacy: An in vitro study. **Lasers Surg Med**, n. 40(8), p. 584–9, 2008.
- JABIR, N. R. et al. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. **International Journal of Nanomedicine**, p. 4391, 2012.
- KANTONIS, G.; TRIKERIOTIS, M.; GHANOTAKIS, D. F. Biocompatible protoporphyrin IX-containing nano hybrids with potential applications in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 185, n. 1, p. 62–66, 2007.
- KARIMI, A. R.; KHODADADI, A. Mechanically Robust 3D Nanostructure Chitosan-Based Hydrogels with Autonomic Self-Healing Properties. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 40, p. 27254–27263, 2016.
- KARIMI, A. R.; KHODADADI, A.; HADIZADEH, M. A nanoporous photosensitizing hydrogel based on chitosan cross-linked by zinc phthalocyanine: an injectable and pH-stimuli responsive system for effective cancer therapy. **RSC Advances**, v. 6, n. 94, p. 91445–91452, 2016.
- KARRI, V. V. S. R. et al. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate *scaffolds* for diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.93, p.1519-1529 2016.
- KARUPPUSAMY, S.; HYEJIN, K.; KANG, H. W. Nanoengineered chlorin e6 conjugated with hydrogel for photodynamic therapy on cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 181, n. May, p. 778–788, 2019.
- KASHYAP, N.; KUMAR, N.; KUMAR, M. Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. **Crit Rev Ther Drug Carr Syst**. v. 22, p.107–49, 2005.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacaros, utilizando glicosil transferase microbiana. **Quim. Nova.** v. 31, p. 134-143, 2008.

KEMPA, M. et al. Physicochemical properties of potential porphyrin photosensitizers for photodynamic therapy, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* v. 146, p. 249-254, 2015.

KHORSHIDI, S.; KARKHANEH, A. A self-crosslinking tri-component hydrogel based on functionalized polysaccharides and gelatin for tissue engineering applications. **Materials Letters**, v. 164, p. 468–471, 2016.

KIM, S. et al. Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation. *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 5, p. 1768–1777, 2012.

KIM, H. et al. Theranostic designs of biomaterials for precision medicine in cancer therapy. **Biomaterials**, v. 213, n. May, p. 119207, 2019.

KIRSCHNER, C. M.; ANSETH, K. S.; **Acta Materialia.** v.61, p.931, 2013.

KONG, Q. et al. **Material Science Forum.** v. 610, p.1188–1191, 2009.

KOMARNENI, S. et al. Microwave-polyol process for metal nanophases. **Journal of Physics Condensed Matter**, v. 16, n. 14, 2004.

KOZEK, K.A. et al. **Chemistry of Materials: a Publication of the American Chemical Society.** v. 25, p. 537-4544, 2013.

KRAMMER, B.; ÜBERRIEGLER, K. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, p.121-126, 1996.

KÜBLER, A. C. Photodynamic therapy. **Medical Laser Application**, v. 20, n. 1, p. 37–45, maio 2005.

KUMAR, M.N.R. A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.*, 46, p.1-27, 2000.

KURUPPUARACHCHI, M. et al. Polyacrylamide nanoparticles as a delivery system in photodynamic therapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 3, p. 920–931, 2011.

LANH, L. T. et al. Shape and size controlled synthesis of Au nanorods: H₂S gas-sensing characterizations and antibacterial application. **Journal of Alloys and Compounds.** v.635, p. 265–271, 2015.

LAURA, M.; <http://elfaronanotec.blogspot.com.br/2016/10/que-es-la-nanotecnologia-el-tamano-si.html>, 2016.

LAWRIE, G. et al. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. **Biomacromolecules.** v.8, p.2533-2541, 2007.

- LEE, H. I.; KIM, Y. J. Enhanced cellular uptake of protoporphyrine IX/linolenic acid-conjugated spherical nanohybrids for photodynamic therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 142, p. 182–191, 2016.
- LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. **J. Phys. Chem.** v.86, p. 3391, 1982.
- LEE, K.Y.; MOONEY, D.J. Hydrogels for tissue engineering, **Chem. Rev.** v.101, p.1869- 1880, 2001.
- LEE, S. J. et al. Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice. **Biomaterials**, v.15, p. 2929-2939, 2009.
- LEE, S. J. et al. Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system. **Biomaterials**, v. 32, n. 16, p. 4021–4029, 2011.
- LEE, K.Y.; MOONEY, D.J. Alginate: properties and biomedical applications, **Prog. Polym. Sci.** v.37, p. 106–126, 2012.
- LESSA, L.Z. Simulação de escoamento com inércia de um fluido viscoplásticos através do método de elementos finitos via Galerkin-mínimo –quadrado- Dissertação para obtenção do título de mestre em engenharia-Porto Alegre-2008.
- LEONG M.F. et al. Patterned prevascularised tissue constructs by assembly of polyelectrolyte hydrogel fibres. **Nat Commun.** v.4, p. 2353, 2013.
- LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R.; Cytotoxicity of nanoparticles, **Small** n. 4, p. 26–49, 2008.
- LI, Z.; ZHANG, M. Chitosan–alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A.** v. 75A, p.485–493, 2005.
- LI, Z. et al. Chitosan/alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials.** v.26, p. 3919–3928, 2005.
- LI, Y. et al. Enhanced anti-swelling property and dehumidification performance by sodium alginate-poly (vinyl alcohol)/polysulfone composite hollow fiber membranes, **J. Membr. Sci.** v.407, p. 211-220, 2012.
- LI, M. et al. De Novo Design of Phototheranostic Sensitizers Based on Structure-Inherent Targeting for Enhanced Cancer Ablation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 46, p. 15820–15826, 2018.

LIAO, H.; HAFNER, J.H. Gold nanorod bioconjugates. **Chem. Mater.** v.17, p. 4636–4641, 2005.

LIN, Y. H., LIANG, H. F., CHUNG, C. K., CHEN, M. C., & SUNG, H. W. Physically crosslinked alginate/N, O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. **Biomaterials.** 26, 2105–2113 (2005).

LI, H. et al. 3D Bioprinting of Highly Thixotropic Alginate/Methylcellulose Hydrogel with Strong Interface Bonding. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 23, p. 20086–20097, 2017.

LI, W. et al. Poly (vinyl alcohol)/ sodium alginate / layered silicate based nanofibrous mats for bacterial inhibition. v. 92, p. 2232–2238, 2013.

LING, Z. et al. Preparation of collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid hybrid hydrogel scaffolds and cell compatibility in vitro. **Carbohydr Polym.** v.84, p.118–25, 2011.

LISTIARINI, K. et al. Fouling mechanism and resistance analyses of systems containing sodium alginate, calcium, alum and their combination in dead-end fouling of nano filtration membranes, **J. Membr. Sci.** v.344, p.244-251, 2009.

LIU, M. et al. Injectable Thermoresponsive Hydrogel Formed by Alginate - g - Poly (N - isopropylacrylamide) That Releases Doxorubicin- Encapsulated Micelles as a Smart Drug Delivery System. p. 35673–35682, 2017.

LIU, Y. et al. Thermoresponsive Semi-IPN Hydrogel Microfibers from Continuous Fluidic Processing with High Elasticity and Fast Actuation. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v.9, p. 901–908, 2017.

LIU, X. et al. Multidentate zwitterionic chitosan oligosaccharide modified gold nanoparticles: Stability, biocompatibility and cell interactions. **Nanoscale**, v. 5, n. 9, p. 3982–3991, 2013.

LUO, G.-F. et al. A Triple-Collaborative Strategy for High-Performance Tumor Therapy by Multifunctional Mesoporous Silica-Coated Gold Nanorods. **Advanced Functional Materials**, v. 26, n. 24, p. 4339–4350, jun. 2016.

LV, F.; MAO, L.; LIU, T. Thermosensitive porphyrin-incorporated hydrogel with four-arm PEG–PCL copolymer: Preparation, characterization and fluorescence imaging in vivo. **Materials Science and Engineering C**, v.43, p. 221–230, 2014.

MA, H. et al. Grape Seed-Inspired Smart Hydrogel Scaffolds for Melanoma Therapy and Wound Healing. **ACS Nano**, v. 13, n. 4, p. 4302–4311, 2019.

MA, J. et al. Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions, **Food Hydrocolloids** v. 38, p. 119–128, 2014.

MA, Z. et al. Applications of gold nanorods in biomedical imaging and related fields.

Chinese Science Bulletin, v. 58, n. 21, p. 2530–2536, 6 jul. 2013.

MACHADO, J. C. V. – **Reologia e escoamento de fluidos: ênfase na indústria de petróleo** – Editora Interciência – Rio de Janeiro, 2002.

MAEDA, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **J. Control. Release**, v.65, p.271–284, 2000.

MADHUSUDANA, K. et al. **J. Biomed. Mater. Res. Part A**. v.102, p. 3196–3206, 2014.

MAKI, D. G.; “*In vitro* studies of a novel antimicrobial luer-activated needleless connector for prevention of catheter-related bloodstream infection,” **Clinical Infectious Diseases**. v. 50, p. 1580–1587, 2010.

MANDAL, B.B.; KUNDU, S.C. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. **Biomaterials**, v.30, p. 2956–2965, 2009.

MARKSTEDT, K. et al. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. **ACS Biomacromolecules**, v.16, p. 1489–1496, 2015.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531–1551, 2010.

MARTÍNEZ-GÓMEZ, F. et al. *In vitro* release of metformin hydrochloride from sodium alginate/polyvinyl alcohol hydrogels. **Carbohydrate Polymers**. v.155, p. 182–191, 2017.

MARTINS, S. et al. Insulin-loaded alginate microspheres for oral delivery – Effect of polysaccharide reinforcement on physicochemical properties and release profile. **Carbohydrate Polymers**. v.69, p. 725–731, 2007.

MARTINS, A. F. et al. Preparation and cytotoxicity of N,N,N-trimethyl chitosan/alginate beads containing gold nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 466–471, 2015.

MEHRDAD, H.; AMIR, A.; PEDRAM, R. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**. v.60, p.1638–49, 2009.

MEYERS, M. A.; MISHRA, A.; BENSON, D.J. Mechanical properties of nanocrystalline materials, **Progress. Mater. Sci**. v.51, p.427–556, 2006.

MIRZAEI, A. et al. Characterization and optical studies of PVP-capped silver nanoparticles. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 37–46, 2017.

MORONES, J.R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles, **Nanotechnology**. v. 16, p. 2346–2353, 2005.

MO, Y. et al. . A new perspective on the effect of complexation between calcium and alginate on fouling during nanofiltration, **Sep. Purif. Technol.** v.82, p.121-127, 2011.

MROZ, P. et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. **Cancers (Basel)**. v. 3, p. 2516-2539, 2011.

MOKWENA, M.G. et al. A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 22, p. 147–154, 2018.

MULFINGER, L. et al. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, p. 322, 2007.

MURTHY, P. S. K. et al. First successful design of semi-IPN hydrogel-silver nanocomposites: A facile approach for antibacterial application. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 318, n. 2, p. 217–224, 2008.

NAGHIZADEH, Z.; KARKHANEH, A.; KHOJASTEH, A. Self-crosslinking effect of chitosan and gelatin on alginate based hydrogels: Injectable in situ forming scaffolds. **Materials Science and Engineering: C**, v.89, p.256-264, 2018.

NARAYANAN, D.L.; SALADI, R.N.; FOX, J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer, **Int. J. Dermatol.** v. 49 n. (9), p. 978–986, 2010.

NARAYANAN, K.; B.; HAN, S. S. Dual-crosslinked poly(vinyl alcohol)/sodium alginate/silver nanocomposite beads – A promising antimicrobial material. **Food Chemistry**, v.234, p.103-110, 2017.

NAVAEI, A. et al. Gold nanorod-incorporated gelatin-based conductive hydrogels forengineering cardiac tissue constructs. **Acta Biomaterialia**. v.41, p.133–146, 2016.

NAVARRO, R. F. Fundamentos de Reologia de Polímeros. Caxias do Sul, Educ, 1997.

NATESAN, S. et al. Engineering a bilayered hydrogel to control ASC differentiation. **J. Vis. Exp.** v. 63, p. 3953, 2012.

NEAL, A. L. What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 362–371, 2008.

NEEDHAM, D. et al. Bottom up design of nanoparticles for anti-cancer diapeutics: “put the drug in the cancer’s food”. **J. Drug Target**. p.1–21, 2016.

NG, K. K.; ZHENG, G. Molecular Interactions in Organic Nanoparticles for Phototheranostic Applications. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 11012–11042, 2015.

NIKOBAKHT, B.; EL-SAYED, M.A. **Chemistry of materials**. v.15, p.1957–1962, 2003.

NORMAN, R.S. Targeted photothermal lysis of the pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, with gold nanorods. **Nano Lett.** v.8, p.302–306, 2008.

OLIVEIRA, C.S. et al., Major determinants of photoinduced cell death: subcellular localization versus photosensitization efficiency, *Free Radic. Biol. Med.* v.51,p. 824-833, 2011.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos & Aplicações.** Editora Guanabara Koogan, 2012.

PADDLE-LEDINEK, J. E.; NASA, Z.; CLELAND, H. J.; Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. **Plastic Reconstruct Surg.** v.117, p. 110S-8S, 2006.

PARK, K.; DRUMMY, L.F.; VAIA, R.A.; Ag shell morphology on Au nanorod core: role of Ag precursor complex. **J Mater Chem.** v.21, p.15608–18, 2011.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v.33, p.3279-3305, 2012.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and alginate wound dressings: A short review. **Trends in Biomaterials & Artificial Organs.** v.18, p.18–23, 2004.

PEER, D.; KARP, J.; M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O.; C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751–760, 2007.

PEI, M. et al. Alginate-based cancer-associated, stimuli-driven and turn-on theranostic prodrug nanogel for cancer detection and treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 183, n. August 2017, p. 131–139, 2018.

PENON, O. et al. Iron oxide nanoparticles functionalized with novel hydrophobic and hydrophilic porphyrins as potential agents for photodynamic therapy, **J. Colloid Interface Sci.** v. 462, p. 154-165, 2016.

PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations, **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v.50, p.27–46, 2000.

PERES, G. L.; LEITE, D. C.; SILVEIRA, N.P. Ultrasound effect on molecular weight reduction of amylopectin, *Starch Starke*, v. 67, p. 407–414, 2015.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: Tipos, Aplicações e Mercado. **Quim. Nova.** v.38, p. 957-971, 2015.

PISSUWAN, D. et al. Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. **Trends Biotechnol.** v.28, p.207–2139, 2009.

- POP, S. F. et al. Spectral and thermal investigations of porphyrin and phthalocyanine nanomaterials. **J. Optoelectron. Adv. Mater**, v.13, p.906–91, 2013.
- PRIYADARSHANA, G. et al. Synthesis of magnetite nanoparticles by top-down approach from a high purity ore. **J. Nanomater.** p.1–8, 2015.
- QIN, M.; ZONG, H.; KOPELMAN, R. Click conjugation of peptide to hydrogel nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 10, p. 3728–3734, 2014.
- RAI, A., PRABHUNE, A., PERRY, C.C. Antibiotic mediated synthesis of gold nanoparticles with potent antimicrobial activity and their application in antimicrobial coatings. **J. Mater. Chem.** v.20, p.6789–6798, 2010.
- RAO, M. A. Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications. **New York: Aspen Publishers**, 1999.
- RAO, K. M. et al. Polysaccharides based antibacterial polyelectrolyte hydrogels with silver nanoparticles. **Materials Letters**, v. 184, p. 189–192, 2016.
- RAUSCHER, H. et al. Towards a review of the EC recommendation for a definition of the term nanomaterial—part 3 scientific-technical evaluation of options to clarify the definition and to facilitate its implementation. **European Commission**. 2015.
- RASSU, G. et al. Composite chitosan/alginate hydrogel for controlled release of deferoxamine: A system to potentially treat iron dysregulation diseases. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 1338–1347, 2016.
- RATNER, B.; D.; HOFFMAN, A.; S.; SCHOEN, F.; J.; LEMONS, J.E. Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine (3rd Edition), Edited by B.D. Academic Press, Elsevier, 2013.
- RAYAVARAPU, R. G. et al. In vitro toxicity studies of polymer-coated gold nanorods. **Nanotechnology**, 21, 145101, 2010.
- ROZANOVA, N.; ZHANG, J. Photothermal ablation therapy for cancer based on metal nanostructures. **Science in China, Series B: Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 1559–1575, 2009.
- ROBERTSON, C.A.; EVANS, D.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.** v. 96, p. 1–8, 2009.
- ROGERS, H.W. et al. Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer in the United States, 2006, **Arch. Dermatol.** n.146 (3), p. 283–287, 2010.
- ROPER, D. K.; AHN, W.; HOEPFNER, M. Microscale Heat Transfer Transduced by Surface Plasmon Resonant Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 9, p. 3636–3641, 8 mar. 2007.

- RUSSO, P.S. "A Perspective on Reversible gels and Related Systems - Reversible Polymeric Gels and Related Systems", in: **ACS Symposium Series 350, American Chemical Society**, Washington DC, p1, 1987.
- SÁMANO-VALENCIA, C. et al. Characterization and biocompatibility of chitosan gels with silver and gold nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2014, n. September, 2014.
- SANPUI, P. et al. The antibacterial properties of a novel chitosan-Ag-nanoparticle composite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 142–146, 2008.
- SARDAR, S. et al. Direct observation of key photoinduced dynamics in a potential nano-delivery vehicle of cancer drugs. **Phys.Chem.Chem.Phy**, v.17, p. 166-177, 2015.
- SAWANT, S. N. et al. Antibiofilm properties of silver and gold incorporated PU, PCLm, PC and PMMA nanocomposites under two shear conditions, **PLoS One**. v.8, p.1-9, 2013.
- SEO, S. Y. et al. Alginate-based composite sponge containing silver nanoparticles synthesized in situ. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 109–115, 2012.
- SHAJARI, D.; BAHARI, A.; GILL, P.; MOHSENI, M. Synthesis and tuning of gold nanorods with surface plasmon resonance. **Optical Materials**. v.64, p.376-383, 2017.
- SHELKE, N. B. et al. Neural tissue engineering: nanofiber-hydrogel based composite scaffolds, **Polym. Adv. Technol**. v. 27, p.42-51, 2016.
- SHIN, E. J. et al. Fabrication of cellulose-based scaffold with microarchitecture using a leaching technique for biomedical applications. **Cellulose**, v.21, p.3515–3525, 2014.
- SHI, J. et al. Schiff based injectable hydrogel for in situ pH-triggered delivery of doxorubicin for breast tumor treatment. **Polym. Chem.**, v. 5, n. 21, p. 6180–6189, 3 jul. 2014.
- SIBAJA, B. et al. Preparation of alginate–chitosan fibers with potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**. v. 134, p. 598–608, 2015.
- SIDOROFF, A.; THALER, P. Taking treatment decisions in non-melanoma skin cancer--the place for topical photodynamic therapy (PDT). **Photodiagnosis Photodyn. Ther.** v.7, p.24, 2010.
- SILVA, J. S. F. et al. Multifunctional System Polyaniline-Decorated ZIF-8 Nanoparticles as a New Chemo-Photothermal Platform for Cancer Therapy. **ACS Omega**, v. 3, n. 9, p. 12147–12157, 2018.
- SKELLAND, A.H.P. Now Newtonian flow and heat transfer. **Wiley edition**. 1967.

- SIRAJ, S. et al. A Green Approach to Synthesize Silver Nanoparticles in Starch-co-Poly(acrylamide) Hydrogels by *Tridax procumbens* Leaf Extract and Their Antibacterial Activity. *Int. J. Carbohydr. Chem.* Article ID 539636, 10 pages, 2013.
- SOARES, J. et al. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Quimica*. v. 29, p. 53–56, 2004.
- SOLOMON, S. D. et al. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles, *Journal of Chemical Education*. v.84, p.322-325, 2007.
- SOWJANYA J. et al. Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. v.109, p. 294–300, 2013.
- STAMATIALIS, D. F. et al. Medical applications of membranes: drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *J Membr Sci*. v.308, p.1–34, 2008.
- SU, C.; H. et al. Preparation of cotton fabric using sodium alginate-coated nanoparticles to protect against nosocomial pathogens. *Biochemical Engineering Journal*. v.117, p. 28–35, 2017.
- SUH, J.;K.; F. MATTHEW, H.;W.;T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. v. 21, p. 2589–98, 2000.
- SUN, X. et al. Rheological properties of the gels of biological surfactant sodium deoxycholate/amino acids/halide salts systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. v.457, p. 345–353, 2014.
- SUN, J.; TAN, H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials*. v. 6, p. 1285–1309, 2013.
- SUN, X. et al. Adjustable hardness of hydrogel for promoting vascularization and maintaining stemness of stem cells in skin flap regeneration. *Applied Materials Today*, v. 13, p. 54–63, 2018.
- STOJKOVSKA, J. et al. A comprehensive approach to in vitro functional evaluation of Ag/alginate nanocomposite hydrogels, *Carbohydr.Polym.* v.111, p. 305–314, 2014.
- SWIERCZEWSKA, M. et al. Polysaccharide-based nanoparticles for theranostic nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews (Part A)*, v. 99, p. 70–84, abr. 2016.
- TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society Interface*, v.6, p.311-324, 2009.
- TADA, D. B. et al. Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: a potential magnetic carrier for photodynamic therapy. *Langmuir*, v.23, p.8194- 8199, 2007.
- TAGER, A. “*Physical Chemistry of Polymers*”, Mir Publishers, Moscow, 1978.

TALAAT, H. S. M. H. et al. Development of a multicomponent fertilizing hydrogel with relevant techno-economic indicators. **Am-Euras J Agric Environ Sci.** v.3, p.764–70, 2008.

TAN, H. et al. Doubly stimulus-induced stem cell aggregation during differentiation on biopolymer hydrogel substrate. **Chem. Commun.** v. 49, p.11554–11556, 2013.

TANG, J.; HUANG, J.; MAN, S. Q. Preparation of gold nanoparticles by surfactant-promoted reductive reaction without extra reducing agent. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.103, p.349–355, 2013.

TANSIL, N. C.; GAO, Z. Nanoparticles in biomolecular detection. **Nano Today.** v.1,p. 28-37, 2006.

THIRUNAVUKKARASU, G. K. et al. On-demand generation of heat and free radicals for dual cancer therapy using thermal initiator- and gold nanorod-embedded PLGA nanocomplexes. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 69, p. 405–413, 2019.

THOMAS, J. E. et al. **Fundamentos de engenharia de petróleo – 2ª edição –** Petrobrás – Editora Interciência – Rio de Janeiro, 2001.

THU, B. et al. Alginate polycation microcapsules 2. Some functional properties. **Biomaterials**, v.17, p.1069-1079, 1996.

TIAN et al., Electrochemical Growth of Single-Crystal Metal Nanowires via a Two-Dimensional Nucleation and Growth Mechanism. **Nano Letters.** v. 3, n. 7, p. 919–923, 2003.

TIAN, Q. et al. Hydrophilic Flower-Like CuS Superstructures as an Efficient 980 nm Laser-Driven Photothermal Agent for Ablation of Cancer Cells. **Adv. Mater.** v. 23, p. 3542-3547, 2011.

TOMA, H. E. *O Mundo Nanométrico: a dimensão do novo século*, Ed. Oficina de Textos: São Paulo, 2004.

TOSTADO-PLASCENCIA, M. M. et al. Synthesis and characterization of multiwalled carbon nanotubes protoporphyrin IX composites using acid functionalized or nitrogen doped carbon nanotubes. **Diamond & Related Materials**, v.70, 65–75, 2016.

TRAVAN, A. et al. Nanocomposites with Antimicrobial Activity. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1429–1435, 2009.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.; C.; HILLIER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Faraday Discussions London.** v. 11, p.55,1951.

- ULLAH, F. et al. Review: Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science and Engineering: C**. v. 57, p. 414-433, 2015.
- VALENTE, J.F.A. et al. Alginate based scaffolds for bone tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v.32, p.2596–2603, 2012.
- VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL, P.; SCHACHT, E. Biopolymer-Based Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. **Biomacromolecules**, 12 (5), 1387–1408, 2011.
- VANDUIJNHOFEN, F. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer, a literature review. **Immunobiology**, v. 207, n. 2, p. 105–113, 2003.
- VAROL, M. An alternative treatment modality of diseases using photodynamic therapy with a wide range biological targeting possibility, **J. Biol.** v. 3, p. 21-25, 2015.
- VELUSAMY, P. et al. Green approach for synthesis of antibacterial silver nanoparticles using aqueous solution of neem gum (*Azadirachta indica* L.), **Ind. Crop. Prod.** v. 66, p.103–109, 2015.
- VELUSAMY, P. et al. Biopolymers regulate silver nanoparticle under microwave irradiation for effective antibacterial and antibiofilm activities, **PLoS One**. v.11, n. (6), 2016.
- VENKATPURWAR, V.; POKHARKAR, V. Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: study of in-vitro antibacterial activity, **Mater. Lett.** v. 65, p.999–1002, 2011.
- VINOGRADOV, G.; V.; MALKIN, A.; Y.; A. Rheology of Polymers: Viscoelasticity and Flow of Polymers. Editora: Mir,1980.
- VODNIK, V. V. et al. Anisotropic silver nanoparticles as filler for the formation of hybrid nanocomposites. **Materials Research Bulletin**, v.48, p.52–57, 2013.
- VORONOVET, R. et al. **Numerical Methods and Advanced Simulation in Biomechanics and Biological Biomech.** v.43, p. 1279–1286, 2010.
- WAN, W. et al. BMSCs laden injectable amino-diethoxypropane modified alginate-chitosan hydrogel for hyaline cartilage reconstruction. **Journal of Materials Chemistry B**, v.9, p.1990-2005, 2015.
- WANG, H. W. et al. Standing [111] gold nanotube to nanorod arrays via template growth. **Nanotechnology**, v. 17, n. 10, p. 2689–2694, 2006.
- WANG, C.; H.; CHANG, C.; W.; PENG, C. A. Gold nanorod stabilized by thiolated chitosan as photothermal absorber for cancer cell treatment. **Journal of Nanoparticle Research**. v.13, p. 2749–2758, 2011.
- WANG, Y. et al. Preparation and characterization of a novel hybrid hydrogel shell for localized photodynamic therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 46, p.

6411, 2013.

WANG, Y. Biadaptability: an Innovative Concept for Biomaterials. **Journal of Materials Science & Technology**. v.32, p.801-809, 2016.

WANG, Z. et al. Biomineralization-Inspired Synthesis of Copper Sulfide–Ferritin Nanocages as Cancer Theranostics. **ACS Nan**. v. 10, p. 3453–3460, 2016.

WANG, Z. et al. Mechanically enhanced nested-network hydrogels as a coating material for biomedical devices. **Acta Biomaterialia**, v. 70, p. 98–109, 2018.

WEISS, P. et al., Biomedical Applications of Hydrogels, Handbook; Ottenbrite, R. M., Park, K., Okano, T., Eds.; Springer New York: New York, NY, Vol. c, 2010.

WILLIAMS, D.F. Definition in Biomaterials. Proceedins of a Concensus Conference of the European Society for Biomaterials. **Progress in Biomedical Engineering**. 4,1987.

WILLIAMS, D.; SADHANA, Biomaterials and tissue engineering in reconstructive surgery, v. 28, p. 563-574, 2003.

WU S, et al., Long-term ultraviolet flux, other potential risk factors, and skin cancer risk: a cohort study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 23(6), p.1080-9, 2014.

WU, P. et al. Tubelike Gold Sphere-Attapulgit Nanocomposites with a High Photothermal Conversion Ability in the Near-Infrared Region for Enhanced Cancer Photothermal Therapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 16, p. 10243–10252, 2016.

XIHUI, Z. et al. Microwave-assisted synthesis of AgNPs using sodium alginate and their antibacterial activity, **Colloid Surf. A: Physicochem. Eng. Aspect**. v. 444, p.180–188, 2014.

XU, C. et al. Study of Droplet Formation Process During Drop-on-Demand Inkjetting of Living Cell-Laden Bioink. **Langmuir**. v.30, p.9130–9138, 2014.

XU, T. et al. The effect of α -cyclodextrin on poly(pseudo) rotaxane nanoparticles self-assembled by protoporphyrin modified poly(ethylene glycol) for anticancer drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, v.174, 789-797, 2017.

XU, W. et al., PEGylated hydrazided gold nanorods for pH-triggered chemo/photodynamic/photothermal triple therapy of breast cancer. **Acta Biomaterialia**. v. 82, p. 171–183, 2018.

XU, W. et al. A dual-targeted hyaluronic acid-gold nanorod platform with triple-stimuli responsiveness for photodynamic/photothermal therapy of breast cancer. **Acta Biomaterialia**, v. 83, p. 400–413, 2019.

YANASE, S. et al. Synergistic increase in osteosarcoma cell sensitivity to

- photodynamic therapy with aminolevulinic acid hexyl ester in the presence of hyperthermia. **Photomed Laser Surg.** v. 27(5), p. 791–797, 2009.
- YANG, J. et al. Galactosylated alginate as a scaffold for hepatocytes entrapment. **Biomaterials**, v. 23, p.471-9, 2002.
- YANG, J.; XIE, Y.; HE, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review, **Carbohydrate Polymers.** v.84, p.33–39, 2011.
- YANG, J.; PAN, J. Hydrothermal synthesis of AgNPs by sodium alginate and their applications in surface-enhanced Raman scattering and catalysis, **Acta Mater.** v.60, p.4753–4758, 2012.
- YANG, B. et al. Facilely prepared inexpensive and biocompatible self-healing hydrogel: a new injectable cell therapy carrier. **Polymer Chemistry**, v. 3, n. 12, p. 3235-3238, 2012.
- YANG, J. et al. The synthesis of nano-silver/sodium alginate composites and their antibacterial properties, **RSC Adv.** v. 5, p. 2378–2382, 2015.
- YANG, Y. et al. Nanoscale Metal–Organic Particles with Rapid Clearance for Magnetic Resonance Imaging-Guided Photothermal Therapy. **ACS Nano.** v. 10, p. 2774-2781, 2016.
- YANO, S. et al. Current states and future views in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 46–67, 2011.
- YING, T. et al. In vitro cytotoxicity of gold nanorods in A 549 cells. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** v.39, p.871–878, 2015.
- YU, C. et al. A disposable indium-tin-oxide sensor modified by gold nanorod–chitosan nanocomposites for the detection of H₂O₂ in cancer cells. **Chemical Communications.** v.50, p.7329–7331, 2014.
- ZENG, J. Y. et al. Porphyrinic Metal–Organic Frameworks Coated Gold Nanorods as a Versatile Nanoplatfor for Combined Photodynamic/Photothermal/Chemotherapy of Tumor. **Advanced Functional Materials**, v. 28, n. 8, p. 1–13, 2018.
- ZHANG, L. et al. “Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments,” **Clinical Pharmacology and Therapeutics.** v.83, p.761–769, 2008.
- ZHANG, Z.; ZHAO, B.; HU, L. PVP Protective mechanism of ultrafine silver powder synthesized. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 110, n. 121, p. 105–110, 1996.
- ZHI YA, M. et al. Applications of gold nanorods in biomedical imaging and related fields. **Chin. Sci. Bull.** v.58, p.2530–2536, 2013.
- ZHANG, P. et al. Recent progress in light-triggered nanotheranostics for cancer

treatment. **Theranostics**, v. 6, n. 7, p. 948–968, 2016.

ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**. v.257, p.638-665, 2013.

ZHAO, J. et al. Design of Phase-Changeable and Injectable Alginate Hydrogel for Imaging-Guided Tumor Hyperthermia and Chemotherapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 4, p. 3392–3404, 2018.

ZHAO, K. et al. Calcium alginate hydrogel filtration membrane with excellent anti-fouling property and controlled separation performance. **Journal of Membrane Science**, v. 492, p. 536–546, 2015.

ZHAO, X. et al. Dual-stimuli responsive and reversibly activatable theranostic nanoprobe for precision tumor-targeting and fluorescence-guided photothermal therapy. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 14998, 19 maio 2017.

ZHAROV, V. P.; GALITOVSKY, V.; VIEGAS, M. Photothermal detection of local thermal effects during selective nanophotothermolysis. **Applied Physics Letters**, v. 83, n. 24, p. 4897–4899, 2003.

ZHOU, Y. et al. Bioglass Activated Albumin Hydrogels for Wound Healing. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 16, p. 1–13, 2018.

ZIV, K. et al. A tunable silk-alginate hydrogel scaffold for stem cell culture and transplantation. **Biomaterials**, v. 35, n. 12, p. 3736–3743, 2014.

ZLOPASA, J. et al. Rheological investigation of specific interactions in Na Alginate and Na MMT suspension. **Carbohydrate Polymers**. v.151, p.144–149, 2016.

APÊNDICE A – PATENTES DEPOSITADAS

A Confirmação do status de um pedido de patentes poderá ser solicitada à Diretoria de Patentes (DIRPA) por meio de uma Certidão de atos relativos aos processos.

1. JUNIOR, SEVERINO. ALVES; CAMARA, CLAUDIO A.G. DA; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, I. R.; NEVES, ROBERTA C.S.; PAULA, M. V. S.; SILVA, M. M. C.; SILVA, A. M.

Fluido coloidal AgNps-*S.aromaticum*@alginato possuindo atividade frente a *Candida albicans*, 2018. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201806928. Data de depósito: 21/09/2018. Depositante/Titular: SEVERINO ALVES JUNIOR. Depositante/Titular: Universidade Federal de Pernambuco.

2. JUNIOR, SEVERINO. ALVES; CAMARA, CLAUDIO A.G. DA; LIMA, G. M. S.; ARAUJO, I. R.; NEVES, ROBERTA C.S.; PAULA, M. V. S.; MORAES, M. M.; SILVA, A. M.

Fluido coloidal AgNps-*S.aromaticum*@alginato para controle de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, 2019. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR102019001286. Data de depósito: 22/01/2019. Depositante/Titular: SEVERINO ALVES JÚNIOR. Depositante/Titular: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3. JUNIOR, SEVERINO. ALVES; VINHAS, G. M.; PAULA, M. V. S.; SILVA, I. D. L.; NEVES, ROBERTA C.S.; AZEVEDO, L. A.

Nanocompósito polimérico para embalagens de alimentos., 2019. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR102019013811. Data de depósito: 03/07/2019. Depositante/Titular: SEVERINO ALVES JÚNIOR. Depositante/Titular: Universidade Federal de Pernambuco.

4. JUNIOR, SEVERINO. ALVES; BRITO, V. R. S.; LIMA, G. M. S.; SILVA, A. M.; ASSIS, A. M. A. D.; CORREIA, G. S.; AZEVEDO, W. M.; PAULA, M. V. S.; NEVES, ROBERTA C.S.

Nanohíbridos para controle de infecções hospitalares, 2019. Categoria: Produto. Instituição onde foi depositada: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. País: Brasil. Natureza: Patente de Invenção. Número do registro: BR10201901010. Data de depósito: 17/05/2019. Depositante/Titular: SEVERINO ALVES JUNIOR. Depositante/Titular: Universidade Federal de Pernambuco.

ANEXO A- ARTIGO PUBLICADO EM PERIÓDICO

1. RIOS, NATHALIA P.S.M.; AZEVEDO, L. A.; **NEVES, ROBERTA C.S.**; JUNIOR, SEVERINO. ALVES; FALCAO, E. H. L. Synthesis of luminescent gel-like materials based on glutamate and neodymium (III). MATERIALS LETTERS. , v.230, p.69 - 71, 2018.