



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DIMITRI CARLOVICH GOUVEIA FAGUNDES

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS Á BASE DE CARBOPOL 940®
CONTENDO SISTEMAS DE NANOPRISMAS DE PRATA/AZUL DE
METILENO PARA INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE BACTÉRIAS
PATOGENICAS**

**RECIFE
2024**

DIMITRI CARLOVICH GOUVEIA FAGUNDES

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS Á BASE DE CARBOPOL 940® CONTENDO
SISTEMAS DE NANOPRISMAS DE PRATA/AZUL DE METILENO PARA
INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Dissertação de mestrado a ser submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade
Federal de Pernambuco (UFPE) como parte
dos requisitos necessários para a obtenção do
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Beate Saegesser
Santos

RECIFE

2024

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Gouveia, Dimitri Carlovich.

Desenvolvimento de hidrogéis à base de Carbopol 940® contendo sistemas de nanoprismas de prata/azul de metileno para inativação fotodinâmica de bactérias patogênicas / Dimitri Carlovich Gouveia Fagundes. - Recife, 2024.

92f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

Orientação: Beate Saegesser Santos.

Inclui referências.

1. Inativação fotodinâmica; 2. Azul de metileno; 3. Nanopartículas de prata. I. Santos, Beate Saegesser. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

DIMITRI CARLOVICH GOUVEIA FAGUNDES

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS Á BASE DE CARBOPOL 940® CONTENDO
SISTEMAS DE NANOPRISMAS DE PRATA/AZUL DE METILENO PARA
INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: **31/07/2024**

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Beate Saegesser Santos (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Adriana Fontes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a mim mesmo, por não desistir e persistir na realização desse sonho, por buscar uma vida melhor pra mim, buscar uma profissão, me dedicar a estudar e ser feliz com o melhor que posso ser, por acreditar no meu potencial e pela realização de ser o primeiro homem trans e também a primeira pessoa trans a se tornar farmacêutico pelo Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco em 119 anos de existência do curso de farmácia, e também primeira pessoa trans a entrar para o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, e ser o Primeiro Lugar na seleção do mestrado em 2022.2, ao concluir esta dissertação me torno parte da história desta instituição, e abro portas para que mais pessoas trans ocupem a academia.

Agradeço aos meus gatos, Kevin, Lara e Luna, por todo o carinho que me dão, todo o amor que eles têm por mim, todos os momentos de alegria e todas as lembranças que guardo na memória e no coração do meu gatão Kevin que partiu em meio a minha jornada de graduação. Amo muito meus 3 filhos felinos. E também ao meu irmão felino Neguinho, que foi beneficiado dos conhecimentos adquiridos por mim nesse trabalho, tratado e curado da esporotricose pela nossa tecnologia de terapia fotodinâmica. Agradeço a minha mãe Avance, por me dar a vida, alimento, moradia, afeto, apoio, e por me proporcionar um ensino de qualidade que me fez chegar até a conclusão desta dissertação e irá me proporcionar um futuro profissional maravilhoso. Agradeço a Luana por estar ao meu lado durante essa jornada.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Beate Saegesser Santos, por ser um grande exemplo pra mim de professora e pesquisadora, por me ajudar sempre que preciso, por me dar a oportunidade de fazer pesquisa científica, por me ensinar muitas coisas, por ser minha amiga, por confiar na minha capacidade e por estar ao meu lado em minha jornada acadêmica.

Agradeço aos colegas do LINSO, em especial a Cláudio que me ensinou bastante, me ajudou em muitas coisas e deu todo o apoio possível. Agradeço também a Alice Cristina, minha querida amiga e parceira, Luís, Rômulo, Ninho, Nadson, Bruna, Grici, todos que fazem parte da minha história no LINSO. E também a todos os estagiários do IFPE que passaram por aqui, pela ajuda com os procedimentos experimentais deste trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos da vida inteira, os quais carregam em minha memória e fazem parte da minha história e construção como ser humano, e aos que ainda fazem parte da minha vida, como Diego Andrade e Jéssica Marques meus amigos professores, que torcem pelo meu sucesso e vibram a cada conquista minha.

Agradeço a todes as pessoas trans, travestis e não binárias que conviveram comigo durante os anos de minha formação, que me incluíram em suas vidas, que me ensinaram muito, que me proporcionaram momentos felizes, boas conversas e muita diversão. Todes vocês merecem muito, assim como eu, estar ocupando o meio acadêmico. Nós somos o futuro e o exemplo para os nossos descendentes e vamos à luta por uma educação digna para a nossa população, por mais perspectiva de futuro para nossas vidas, por mais vida para nós e reconhecimento profissional.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, ao Departamento de Ciências Farmacêuticas, ao Centro de Ciências da Saúde e a Universidade Federal de Pernambuco, por me receberem, por me abrigarem, por me fornecerem estrutura de estudo, alimentação e lazer durante estes 5 anos de graduação, por me garantirem essa formação, por se adaptarem a mim e a todas as outras pessoas trans estudantes da UFPE que conquistamos juntos com muita luta nossos direitos pelo uso do nome social na instituição, pelo uso do banheiro adequado a nossa identidade de gênero, pela conscientização que promove aos seus estudantes e professores cisgêneros a respeitar todas as pessoas trans que ocupam a nossa universidade. E que seja protocolada em um futuro próximo a cota para pessoas trans terem mais oportunidade de adentrarem ao meio acadêmico com o ensino de qualidade da UFPE.

"Só quando se perde o medo de perder se encontra a alegria de achar"

João W. Nery

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma abordagem promissora contra infecções bacterianas, baseada na interação entre um fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular. A inativação fotodinâmica (IFD) é uma estratégia eficaz contra microrganismos patogênicos, diferenciando-se da TFD pelo contexto de aplicação. Entre os FSs destaca-se o azul de metileno (AM), um corante catiônico e lipofílico. Para aumentar a eficiência do efeito fotodinâmico dos FS, destacam-se as nanopartículas metálicas. As nanopartículas de prata (AgNPs) são conhecidas por sua ação antibacteriana e antifúngica, além da propriedade de ressonância de plásmons de superfície (RPS), que permite a intensificação de sinais ópticos na interface. A resistência a múltiplos medicamentos (MDR) em patógenos nosocomiais do grupo ESKAPE tem aumentado gradualmente. *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são especialmente relevantes e persistentes em infecções bacterianas, com diversos mecanismos de resistência que dificultam o tratamento eficaz. O objetivo geral deste estudo foi desenvolver hidrogéis AM/AgNPr e avaliar seu uso na IFD de bactérias patogênicas. As AgNPr foram escolhidas por sua banda de plásmon em maior proximidade com o perfil espectral de absorbância do azul de metileno, a AgNPr₁ possui $\lambda_{\text{máx}}$ em 642 nm, e a AgNPr₂ possui $\lambda_{\text{máx}}$ em 671 nm. O potencial Zeta da AgNPr₂ mostrou valores muito negativos, como $\zeta = -46,7 \pm 15$ mV, indicando grande estabilidade coloidal. Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível determinar o diâmetro médio das AgNPr₁ e AgNPr₂, 18 ± 5 nm e 25 ± 10 nm respectivamente, e espessura média de 4 ± 1 nm. Os resultados da caracterização óptica das AM/AgNPr revelam diferenças significativas em comparação ao azul de metileno isolado. O FTIR demonstra a associação eficaz das moléculas de AM às AgNPr. Os hidrogéis desenvolvidos apresentaram estabilidade macroscópica ao longo do tempo, sem separação de fases, mesmo após a incorporação dos FSs. A maior produção de EROs pelo AM/AgNPr em comparação ao AM isolado destaca a importância da interação entre fotossensibilizadores e nanopartículas metálicas. Os hidrogéis com AM e AM/AgNPr inativam *S. aureus* eficazmente em concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com uma dose de luz de 2,08 J.cm⁻² em 120 segundos. Especificamente, os hidrogéis de AM/AgNPr inativam *P. aeruginosa* nas mesmas condições. A combinação AM/AgNPr aumenta a produção de EROS e consegue inativar bactérias resistentes como *P. aeruginosa*, diferente do AM isolado que não foi efetivo, resultando em inativação mais eficiente.

PALAVRAS CHAVE: inativação fotodinâmica, azul de metileno, nanopartículas de prata.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT) is a promising approach against bacterial infections, based on the interaction between a photosensitizer (PS), light, and molecular oxygen. Photodynamic inactivation (PDI) is an effective strategy against pathogenic microorganisms, differing from PDT in its application context. Among the PSs, methylene blue (MB) stands out as a cationic and lipophilic dye. To enhance the efficiency of the photodynamic effect of PSs, metallic nanoparticles are noteworthy. Silver nanoprisms (AgNPr) are known for their antibacterial and antifungal action, as well as the property of surface plasmon resonance (SPR), which allows for the intensification of optical signals at the interface. Multidrug resistance (MDR) in nosocomial pathogens of the ESKAPE group has gradually increased. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are especially relevant and persistent in bacterial infections, with various resistance mechanisms that complicate effective treatment. The general objective of this study was to develop MB/AgNPr hydrogels and evaluate their use in the PDI of pathogenic bacteria. AgNPr were chosen for their plasmon band in closer proximity to the absorbance spectral profile of methylene blue; AgNPr₁ has $\lambda_{\max}$ at 642 nm, and AgNPr₂ has $\lambda_{\max}$ at 671 nm. The zeta potential of AgNPr₂ showed very negative values, such as $\zeta = -46.7 \pm 15$ mV, indicating great colloidal stability. Through transmission electron microscopy, it was possible to determine the average diameter of AgNPr₁ and AgNPr₂, 18 ± 5 nm and 25 ± 10 nm respectively, and an average thickness of 4 ± 1 nm. The optical characterization results of MB/AgNPr reveal significant differences compared to isolated methylene blue. FTIR demonstrates the effective association of MB molecules with AgNPr. The developed hydrogels showed macroscopic stability over time, without phase separation, even after the incorporation of PSs. The higher production of ROS by MB/AgNPr compared to isolated MB highlights the importance of the interaction between photosensitizers and metallic nanoparticles. Hydrogels with MB and MB/AgNPr effectively inactivate *S. aureus* at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ with a light dose of 2.08 J.cm⁻² in 120 seconds. Specifically, MB/AgNPr hydrogels inactivate *P. aeruginosa* under the same conditions. The combination of MB/AgNPr increases ROS production and can inactivate resistant bacteria such as *P. aeruginosa*, unlike isolated MB, which was not effective, resulting in more efficient inactivation.

KEYWORDS: photodynamic inactivation, methylene blue, silver nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – (a) Limitações e abordagens para melhorar a TFD; (b) Penetração da luz visível na pele de acordo com seu comprimento de onda.....	29
Figura 2 – Esquema gráfico da IFD onde o conjunto da atuação de um fotossensibilizador, oxigênio e luz promovem a produção de espécies reativas de oxigênio do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS), promovendo a inativação de microrganismos patogênicos em diversas aplicações.....	31
Figura 3 – Esquema ilustrando a ideia central do projeto com o nanossistema de AM/AgNPr em Hidrogel, sob a ação de luz vermelha promovendo Inativação Fotodinâmica de bactérias patogênicas.....	32
Figura 4 – Estrutura molecular do Azul de Metileno.....	33
Figura 5 – Diagrama de energia de Jablonski para um agente fotossensibilizador interagindo com luz mostrando os processos fotoquímicos possíveis de ocorrerem, com ênfase na reação tipo I e reação tipo II.....	34
Figura 6 – (a) Molécula do azul de metileno; (b) Conformações dos dímeros analisados (os átomos de hidrogênios foram omitidos).....	35
Figura 7 – Espectro de absorção de todas as espécies de AM, tanto virtuais (mesômeros) como reais em solução aquosa.....	36
Figure 8 - Espectro de absorção de (a) soluções de AM e (b) conjugados AMNP. Perfis de emissão de (c) soluções de AM e (d) conjugados AMNP ($\lambda_{exc} = 660\text{nm}$).....	38
Figura 9 - Ressonância Plasmônica de Superfície (a) localizada e (b) polarizada.....	40
Figura 10 - Espectro de absorção UV-Vis apresentando diferentes faixas de absorção da luz (banda plasmônica) de nanopartículas de prata em diferentes morfologias: fio, esfera, cubo e prisma triangular, respectivamente.....	41
Figura 11 – (a) Variação da banda de plásmon com a variação de tamanho de nanoprismas de Ag; (b) dispersões coloidais contendo nanoprismas de Ag (18 a 40 nm) preparados pelo Grupo NanoBio/UFPE.....	42

Figura 12 - Estrutura dos hidrogéis combinados com vetores-fármacos (a) o vetor está em suspensão na estrutura porosa; (b) o hidrogel é feito por uma associação de vetores; (c) a rede é feita de polímero combinado com vetores como nós de reticulação.....	43
Figura 13 – Esquematização da preparação de AgNPr (parte 1). (a) Soluções utilizadas no processo com suas devidas concentrações; (b) Preparação da semente de AgNPr; (c) Preparação para o crescimento de AgNPr, ponto de partida.....	48
Figura 14 – Esquematização da preparação de AgNPr (parte 2). (d) Crescimento de AgNPr observado pelas alterações de coloração do meio devido a sua modificação estrutural e seu poder de efeito plasmônico; (e) Finalização do processo de crescimento de AgNPr e caracterização por espectrofotometria UV/Vis identificando a banda de plásmon.....	50
Figura 15 – Amostras de solução de azul de metileno diluídas partindo da solução padrão. (1) 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (2) 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (3) 30 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (4) 40 $\mu\text{mol.L}^{-1}$; (5) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	56
Figura 16 – Curva Padrão de Azul de Metileno.....	57
Figura 17 – Banda de plásmon de AgNPr (1) $\lambda_{\text{máx}}$ 642 nm; (2) $\lambda_{\text{máx}}$ 671 nm.....	58
Figura 18 – Sobreposição espectral do azul de metileno a partir das (a) AgNPs ₁ ; e (b) AgNPr ₂	59
Figura 19 – Distribuição do potencial zeta de AgNPr ₂ em triplicata.....	60
Figura 20 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra 1 ($\lambda_{\text{máx}}$ 642 nm): (a,b,c) Imagens de campo claro das partículas de AgNPr ₁ ; (d) Espectro de absorção correspondente da amostra; (e) Histograma de distribuição do tamanho com diâmetro médio.....	61
Figura 21 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra 2 ($\lambda_{\text{máx}}$ 671 nm). (a,b,c) Imagens de campo claro de AgNPr ₂ ; (d) Perfil espectral de absorção das partículas; (e) Histograma de distribuição do tamanho com diâmetro médio.....	62
Figura 22 – Espectros de absorção UV-Vis dos FSs AM e AM/AgNPr, ambos na mesma concentração de 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	63
Figura 23 – Espectros de emissão de fluorescência dos fotossensibilizadores (a) AM ₁ ; (b) AM/AgNPr ₁ ; (c) AM ₂ ; (d) AM/AgNPr ₂ ; (e) mapeamento em cascata 3D no eixo Z das	

amostras AM₁ e AM/AgNPr₁; (f) mapeamento em cascata 3D no eixo Z das amostras AM₂ e AM/AgNPr₂.....65

Figura 24 – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos sistemas: AM, AgNO₃, PSSS e AM/AgNPr.....66

Figura 25 – Imagem das formulações de hidrogel Carbopol®: contendo (a) 12,5 µmol.L⁻¹ AM; (b) 12,5 µmol.L⁻¹ AM/AgNPr; (c) 25 µmol.L⁻¹ AM; (d) 25 µmol.L⁻¹ AM/AgNPr; (e) 50 µmol.L⁻¹ AM; (f) 50 µmol.L⁻¹ AM/AgNPr; sob luz ambiente.....68

Figura 26 – Determinação da espalhabilidade dos hidrogéis Carbopol® 1% m/v incorporados aos FSs, os dados representam a média das análises (n=3).....73

Figura 27 – Percentual de produção de espécies reativas de oxigênio do AM: (a) Espectroscopia de absorção analisando o decaimento do RNO a cada minuto durante 5 minutos de exposição a LED vermelho λ 660 nm, pela ação do AM na concentração de 5 µmol.L⁻¹; (b) Percentual de RNO consumido pelo tempo de irradiação em minutos, e percentual de produção de espécies reativas de oxigênio pela ação do FS AM ao RNO.....74

Figura 28 – Percentual de produção de espécies reativas de oxigênio do AM/AgNPr: (a) Espectroscopia de absorção analisando o decaimento do RNO a cada minuto durante 5 minutos de exposição a LED vermelho λ 660 nm, pela ação do AM/AgNPr na concentração de 5 µmol.L⁻¹; (b) Percentual de RNO consumido pelo tempo de irradiação em minutos, e percentual de produção de espécies reativas de oxigênio pela ação do FS AM/AgNPr ao RNO.....75

Figura 29 – IFD de cepas *Staphylococcus aureus* utilizando diferentes concentrações de azul de metileno (AM) e conjugados (AM/AgNPr) (a) AM 12,5 µmol.L⁻¹; (b) 12,5 µmol.L⁻¹ AM/AgNPr; (c) AM 25 µmol.L⁻¹; (d) 25 µmol.L⁻¹ AM/AgNPr; (e) AM 50 µmol.L⁻¹; (f) 50 µmol.L⁻¹ AM/AgNPrs.....77

Figura 30 – IFD de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando diferentes concentrações de azul de metileno (AM) e conjugados (AM/AgNPr) (a) AM 12,5 µmol.L⁻¹; (b) AM 12,5 µmol.L⁻¹/AgNPr; (c) AM 25 µmol.L⁻¹; (d) AM 25 µmol.L⁻¹/AgNPr; (e) AM 50 µmol.L⁻¹; (f) AM 50 µmol.L⁻¹/AgNPr.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Energia do dímero, diferença de energia total (ΔE) entre cada dímero e a energia total do monômero multiplicada por 2 em fase gasosa e distância entre cada dímero.....	35
Tabela 2 – Parâmetros ópticos e termodinâmicos do AM em meio aquoso.....	36
Tabela 3 – Componentes dos hidrogéis desenvolvidos para a incorporação do AM/AgNPr testado neste estudo.....	51
Tabela 4 – Valores das cinco soluções utilizadas na curva de calibração do azul de metileno, partindo de seus espectros de absorbância.....	57
Tabela 5 – Valores do Potencial Zeta, Condutividade e Áreas dos Picos das Amostras de AgNPr ₂	59
Tabela 6 – pH e viscosidade das soluções e hidrogéis, nas concentrações 12,5, 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com os FS AM e AM/AgNPr.....	70
Tabela 7 – Determinação de espalhabilidade dos hidrogéis Carbopol® 1% m/v incorporados com 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM (HG ₁) e 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr (HG ₂).....	72
Tabela 8 – Determinação de espalhabilidade dos hidrogéis Carbopol® 1% m/v incorporados com 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM (HG ₃) e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr (HG ₄).....	72
Tabela 9 – Determinação de espalhabilidade dos hidrogéis Carbopol® 1% m/v incorporados com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM (HG ₅) e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr (HG ₆).....	73

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ABS_i – Absorbância inicial do fotossensibilizador

ABS_f – Absorbância final do fotossensibilizador

AgNPs – Nanopartículas de Prata

AgNPr – Nanoprismas de Prata

AM – Azul de Metileno

aPDT - TFD antimicrobiana do inglês *antimicrobial photodynamic therapy*

DP – Desvio padrão

ESKAPE – Grupo composto pelas bactérias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FS – Fotossensibilizador

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

HEC – hidroxietilcelulose

L-His – L-Histidina

LSP – Ressonância plasmônica de superfície localizada do inglês *Localized Surface Plasmo*

MDR – Resistência a múltiplos medicamentos

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MM – Massa molar

NCTC® – National Collection of Type Cultures

NIR – Infravermelho próximo do inglês *Near-Infrared*

IFD – Inativação Fotodinâmica

PACT – Terapia antimicrobiana fotodinâmica do inglês *photodynamic antimicrobial*

PDDI – Desinfecção fotodinâmica do inglês *photodynamic disinfection*

PDI – Inativação fotodinâmica do inglês *photodynamic inactivation*

pH – Potencial hidrogeniônico

PIT – Fotoimunoterapia do inglês *photoimmunotherapy*

PIT – Tempo de incubação pré-irradiação

RNO_C = percentual de RNO consumido

ROS – Espécies reativas de oxigênio do inglês *Reactive Oxygen Species*

ROS_P = percentual de produção de ROS

rpm – Rotações por minuto

RPS – Ressonância Plasmônica de Superfície

SPP – Ressonância plasmônica de superfície polarizada do inglês *Surface Plasmon Polariton*

SPR – Ressonância plasmônica de superfície do inglês *Surface Plasmon Resonance*

SSTIs – Infecções de pele e tecidos moles do inglês *Skin and Soft Tissue Infections*

TFD – Terapia Fotodinâmica

TSC – Citrato trissódico

ua - Unidades adimensionais

UV – Ultravioleta

Vis – Visível.

LISTA DE SÍMBOLOS

$\pi = 3,14$.

O_2^- - Ânion superóxido

NaBH_4 – Borohidreto de sódio

cm^{-1} – Centímetros inversos

λ – Comprimento de Onda (nm)

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ – Concentração micro molar por litro

d = Diâmetro médio (mm)

ΔE – Diferença de energia total

E_i = espalhabilidade da amostra para peso i (mm^2)

ν – Frequência vibracional da molécula

g - Grama

g.mol^{-1} – Grama por mol

$^\circ\text{C}$ – Graus Celsius

Ag^+ - Íons de prata

J.cm^{-2} – Joule por centímetro ao quadrado

kDa – Kilodalton

Log_{10} – Logaritmo de base 10

μL – Microlitro

μM – Micro molar

mg.L^{-1} – Miligrama por litro

mL – Mililitro

mm^2 – Milímetros quadrados

mmol.L^{-1} – Mili molar por litro

mS.cm^{-1} – Milisiemens por centímetro

mV – Milivolt

mW.cm⁻² – Miliwatt por centímetro ao quadrado

min - Minuto

nm – Nanômetro

AgNO₃ – Nitrato de prata

RNO – N,N-dimetil-4-nitrosoanilina

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

PSSS – Poli-4(estirenosulfonato) de sódio

ζ – Potencial zeta

Ag – Prata

OH⁻ - Radical hidroxila

s - Segundo

UFC.mL⁻¹ – Unidades formadoras de colônias por mililitro

SUMÁRIO PROGRESSIVO

1.	INTRODUÇÃO	23
2.	OBJETIVOS	26
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3.	REFERENCIAL TEÓRICO	28
3.1.	TERAPIA FOTODINÂMICA	28
3.1.1.	Inativação Fotodinâmica	30
3.1.2.	Fotossensibilizadores.....	32
3.1.3.	Aglomeração Do Azul De Metileno.....	34
3.2.	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	39
3.3.	HIDROGÉIS	43
3.3.1.	Comportamento Reológico de Hidrogéis	44
3.4.	MICROORGANISMOS E RESISTÊNCIA	44
4.	METODOLOGIA	47
4.1.	TIPO DE ESTUDO	47
4.2.	LOCAL DE ESTUDO.....	47
4.3.	MATERIAIS	47

4.4.	MÉTODOS.....	48
4.4.1.	Preparação de AgNPr	48
4.4.2.	Preparação de Sistemas AM/AgNPr.....	51
4.4.3.	Incorporação de AM/AgNPs em Hidrogéis.....	51
4.4.4.	Determinação de pH.....	52
4.4.5.	Determinação de Viscosidade.....	52
4.4.6.	Determinação de Espalhabilidade	52
4.4.7.	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	53
4.4.8.	Inativação Fotodinâmica de Bactérias Patogênicas	54
4.4.9.	Estatística	54
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1.	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO AM	56
5.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs	58
5.2.1.	Espectroscopia de absorção UV-Vis	58
5.2.2.	Potencial Zeta	59
5.2.3.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	61
5.3.	CARACTERIZAÇÃO OPTICA DOS CONJUGADOS AM/AgNPs	63
5.3.1.	Espectroscopia de Absorção UV-Vis	63

5.3.2.	Espectroscopia de Emissão	64
5.3.3.	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	66
5.4.	ASPECTOS MACROSCÓPICOS DOS HIDROGÉIS	67
5.5.	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS	69
5.5.1.	Determinação de pH e Viscosidade.....	69
5.5.2.	Espalhabilidade	71
5.6.	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	74
5.7.	INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA (IFD).....	76
5.7.1.	IFD <i>Staphylococcus aureus</i>	76
5.7.2.	IFD <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	78
6.	CONCLUSÃO	82
7.	PERSPECTIVAS.....	84
	REFERÊNCIAS	85

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica promissora para o tratamento de diversas doenças, que utiliza moléculas fotossensíveis, também conhecidas como fotossensibilizadores (FS), em combinação com uma fonte de luz e oxigênio molecular presente no meio celular. A interação entre o FS e o oxigênio resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são altamente tóxicas e promovem a morte celular no alvo específico (Jesus *et al.*, 2018).

Atualmente, a ação fotodinâmica vem sendo utilizada como uma estratégia para aniquilar cepas bacterianas resistentes, numa variação que é denominada inativação fotodinâmica (IFD). Já se tem relatos de aplicação para o tratamento de infecções localizadas superficiais, como as que ocorrem na pele e na cavidade oral, e bons resultados foram obtidos contra uma ampla faixa de micro-organismos resistentes a antibióticos, o que lança a terapia como uma forma alternativa menos invasiva e promissora para erradicação de microrganismos (Galo *et al.*, 2020). A inativação fotodinâmica antimicrobiana pode ser uma alternativa interessante e consequentemente, importante na prevenção e tratamento das lesões cáries, infecções por bactérias e leveduras.

Entre os diversos fotossensibilizadores (FS) mencionados na literatura, destaca-se o azul de metileno (AM), um corante catiônico com propriedades relativamente lipofílicas (Fabio *et al.*, 2023). Entre os vários sistemas desenvolvidos para aprimorar a eficiência do efeito fotodinâmico dos FSs, destacam-se os sistemas nanoestruturados, como as nanopartículas metálicas (Ribeiro *et al.*, 2018). As nanopartículas de prata (AgNPs) são amplamente reconhecidas na literatura devido à sua ação antibacteriana e antifúngica, além de possuírem a propriedade de ressonância plasmônica de superfície (RPS), o que favorece seu uso em aplicações de intensificação de sinais ópticos na interface (Li *et al.*, 2019). Portanto, a combinação do azul de metileno com nanopartículas de prata (AM/AgNPs) apresenta um enorme potencial para o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos baseados na terapia fotodinâmica.

A escolha de hidrogéis como matriz para a incorporação dos conjugados AM/AgNPs é motivada por diversas vantagens inerentes a esses materiais. Hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros que podem absorver grandes quantidades de água, conferindo-

lhes uma consistência semelhante à de tecidos biológicos (M. *et al.*, 2021). Essa propriedade torna os hidrogéis altamente biocompatíveis e adequados para aplicações farmacêuticas. Além disso, a estrutura porosa dos hidrogéis permite uma liberação controlada e sustentada dos agentes terapêuticos (Cascone; Lamberti, 2020), o que pode aumentar a eficácia do tratamento fotodinâmico ao garantir que o fotossensibilizador e as nanopartículas permaneçam no local da infecção por períodos prolongados. A capacidade dos hidrogéis de formar filmes aderentes e flexíveis facilita a aplicação tópica em superfícies irregulares, como feridas ou lesões na pele, assegurando uma cobertura uniforme e eficaz do agente terapêutico (Firlar *et al.*, 2022).

A capacidade das nanopartículas de prata de intensificar os sinais ópticos e a ação antibacteriana do azul de metileno pode levar a tratamentos mais eficazes e direcionados contra infecções bacterianas resistentes. Dada a crescente preocupação com a resistência aos antibióticos, a inativação fotodinâmica (IFD) surge como uma alternativa promissora e menos invasiva para a erradicação de microrganismos patogênicos. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo principal desenvolver hidrogéis contendo conjugados de nanoprismas de prata/azul de metileno e avaliar sua eficácia na inativação fotodinâmica de bactérias patogênicas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver hidrogéis contendo sistemas entre nanoprismas de prata/azul de metileno e avaliar seu uso na inativação fotodinâmica de bactérias patogênicas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Preparar nanoprismas de prata por via coloidal;
- ✚ Montar sistemas com o fotossensibilizador azul de metileno e os nanoprismas de prata;
- ✚ Desenvolver hidrogéis poliméricos incorporados com os sistemas AM/AgNPr obtidos;
- ✚ Caracterizar os sistemas obtidos utilizando metodologias analíticas, como espectroscopia eletrônica na região UV-Vis, espectroscopia de emissão e fluorescência, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier FTIR, microscopia eletrônica de transmissão (MET), potencial zeta;
- ✚ Utilizar a técnica de IFD *in vitro* para avaliar o potencial dos conjugados incorporados em gel frente a *Staphylococcus aureus* NCTC® 12973 e *Pseudomonas aeruginosa* NCTC® 12903.

REFERENCIAL TEÓRICO

3. REFERENCIAL TEÓRICO

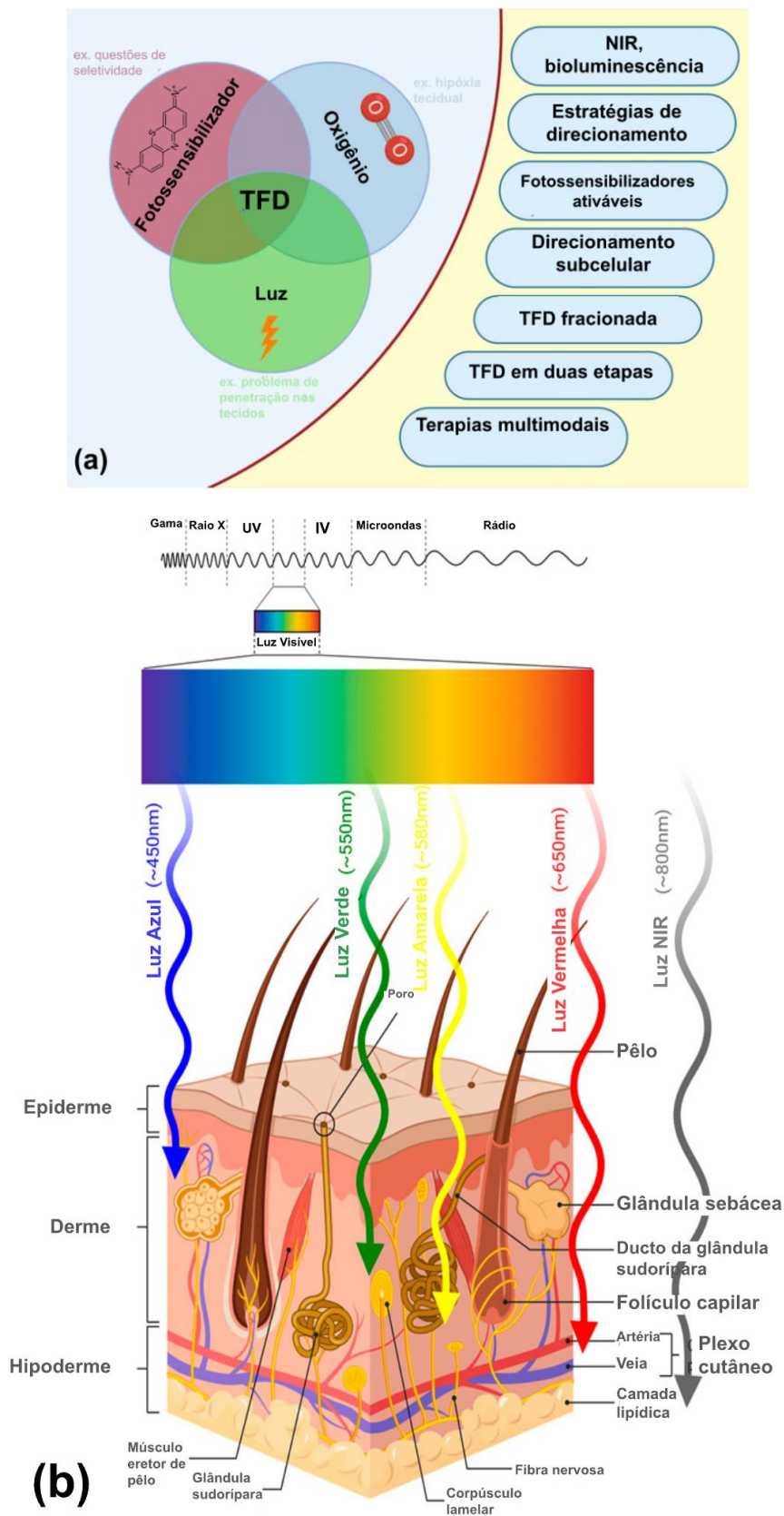
3.1. TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) emerge como uma promissora abordagem terapêutica para o tratamento de uma variedade de condições médicas, incluindo infecções bacterianas (Law; Leung; Xu, 2023). Fundamentada na interação entre um fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular, a TFD oferece uma alternativa viável e eficaz aos tratamentos convencionais (Correia *et al.*, 2021). O princípio básico subjacente à TFD envolve a administração de um fotossensibilizador que, quando ativado por uma fonte de luz adequada, gera espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto e o radical hidroxila (Younis *et al.*, 2021). Essas espécies altamente reativas são capazes de induzir danos irreversíveis às estruturas celulares, resultando na morte seletiva de microrganismos patogênicos, sem causar danos significativos aos tecidos circundantes (Caruso *et al.*, 2021).

A eficácia da TFD reside na capacidade dos fotossensibilizadores em seletivamente acumular nas células-alvo, juntamente com a precisão de direcionar a luz para a região afetada (Gunaydin; Gedik; Ayan, 2021). Entretanto, a luz não consegue penetrar além de alguns milímetros de tecido (Stolik *et al.*, 2000), o que limita o potencial terapêutico a doenças cutâneas superficiais. A Figura 1 (a) ilustra as limitações e estratégias para uma melhor TFD (b) mostra o potencial de penetração da luz visível na pele, a maior penetração é alcançada pelo infravermelho próximo do inglês *Near-Infrared* (NIR) em $\lambda \sim 800\text{nm}$.

Dentre os diversos fotossensibilizadores utilizados na TFD, o azul de metileno emerge como um candidato proeminente devido à sua capacidade de absorver eficientemente luz na faixa visível do espectro e sua relativa baixa toxicidade (Linger; Lancel; Port, 2023). No entanto, é importante destacar que o desempenho terapêutico do azul de metileno pode ser influenciado pela formação de aglomerados em soluções aquosas, o que pode afetar sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio e, consequentemente, comprometer a eficácia da TFD (Rodrigues *et al.*, 2024).

Figura 1 – (a) Limitações e abordagens para melhorar a TFD; (b) Penetração da luz visível na pele de acordo com seu comprimento de onda.



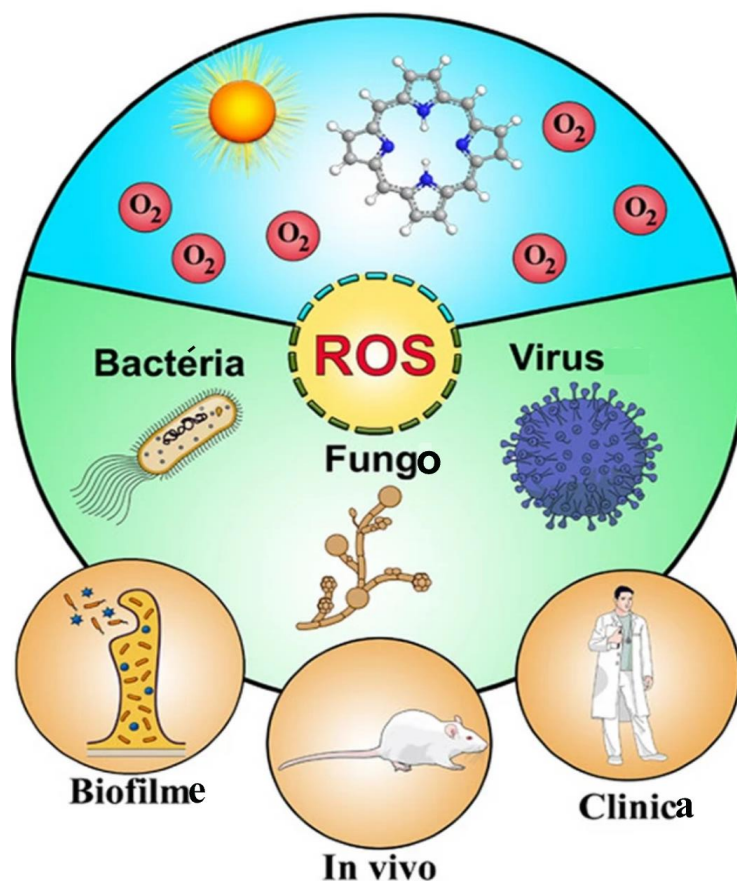
Fonte: Adaptado de Gunaydin; Gedik; Ayan, 2021.

Além disso, a TFD oferece uma série de vantagens sobre os tratamentos convencionais, incluindo a capacidade de atingir microrganismos resistentes a antibióticos, bem como a ausência de resistência induzida pela terapia (Doleżych-Teister *et al.*, 2020). A aplicação da TFD abrange uma ampla gama de áreas médicas, incluindo dermatologia, oncologia, e mais recentemente, o tratamento de infecções bacterianas (Clément; Winum, 2024). No entanto, desafios persistem, como a otimização da formulação do fotossensibilizador, a escolha adequada da fonte de luz e a compreensão dos mecanismos de resposta bacteriana à TFD, garantindo assim sua eficácia contínua no tratamento de infecções bacterianas.

3.1.1. Inativação Fotodinâmica

A inativação fotodinâmica (IFD) representa uma estratégia poderosa no combate a microrganismos patogênicos, diferenciando-se da terapia fotodinâmica (TFD) principalmente pelo contexto de sua aplicação (Willis *et al.*, 2021). Enquanto a TFD é um tratamento realizado em organismos vivos, como parte do processo terapêutico para diversas condições médicas, a IFD é conduzida *in vitro*, visando a inativação seletiva de microrganismos. Esta distinção fundamental permite uma aplicação mais direcionada da IFD no ambiente laboratorial, onde é possível estudar os efeitos do tratamento em microrganismos específicos sob condições controladas. Sua aplicação para inativação de agentes patogênicos como bactérias, fungos e vírus é reconhecida como TFD antimicrobiana do inglês *antimicrobial photodynamic therapy* (aPDT), inativação fotodinâmica do inglês *photodynamic inactivation* (PDI), terapia antimicrobiana fotodinâmica do inglês *photodynamic antimicrobial chemotherapy* (PACT) ou desinfecção fotodinâmica do inglês *photodynamic disinfection* (PDDI) (Aroso *et al.*, 2021). Recentemente, a união de uma substância fotossensibilizadora com um anticorpo monoclonal que tem como alvo um antígeno presente na superfície da célula cancerígena foi denominado fotoimunoterapia do inglês *photoimmunotherapy* (PIT) (Kobayashi; Choyke, 2019). Embora diferentes termos sejam utilizados em diversos campos, o princípio do processo fotodinâmico permanece o mesmo. A Figura 2 ilustra um esquema gráfico da IFD onde o conjunto da atuação de um fotossensibilizador, oxigênio livre e uma fonte de luz visível promovem a produção de espécies reativas de oxigênio do inglês *Reactive Oxygen Species* (ROS), resultando na morte de vírus, bactérias e fungos, quebras de biofilmes e podendo ser utilizada na desinfecção de ambientes, em tratamentos *in vivo* e na clínica.

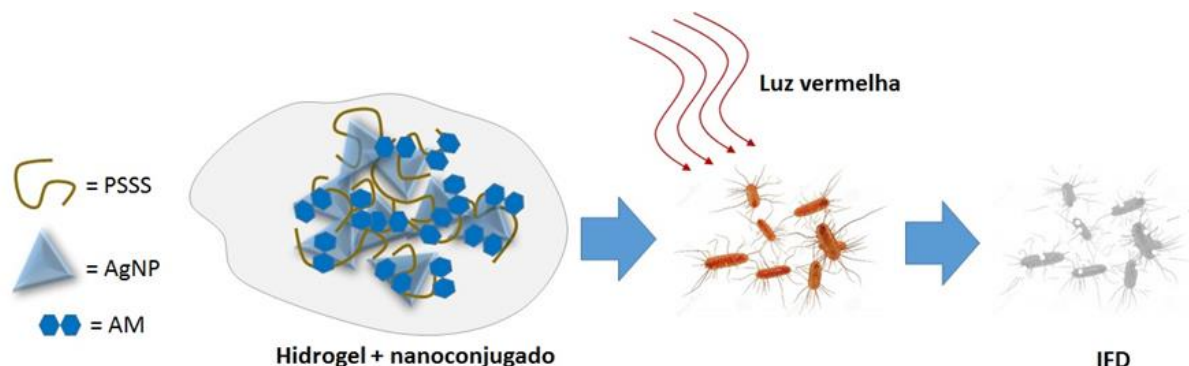
Figura 2 – Esquema gráfico da IFD onde o conjunto da atuação de um fotossensibilizador, oxigênio e luz promovem a produção de espécies reativas de oxigênio do inglês *Reactive Oxygen Species* (ROS), promovendo a inativação de microrganismos patogênicos em diversas aplicações.



Fonte: Adaptado de Aroso *et al.*, 2021.

O processo de IFD envolve a administração de um fotossensibilizador ao meio de cultura contendo os microrganismos-alvo, seguida pela exposição à luz de comprimento de onda adequado. Uma vez ativado pela luz, o fotossensibilizador gera espécies reativas de oxigênio, que atuam na oxidação de biomoléculas vitais nos microrganismos, resultando em sua inativação (Youf *et al.*, 2021). Esta abordagem oferece vantagens significativas na pesquisa microbiológica, permitindo a investigação dos mecanismos de ação da IFD, bem como a avaliação de sua eficácia contra diferentes patógenos (Pucelik; Dąbrowski, 2022). A Figura 3 mostra o esquema de IFD proposto neste estudo, onde a associação do fotossensibilizador Azul de Metileno a Nanopartículas de Prata em meio hidrogel é utilizado para inativar bactérias patogênicas por ação da luz vermelha no comprimento de onda $\lambda = 660\text{nm}$.

Figura 3 – Esquema ilustrando a ideia central do projeto com o nanosistema de AM/AgNPs em Hidrogel, sob a ação de luz vermelha promovendo Inativação Fotodinâmica de bactérias patogênicas.



Fonte: Grupo NanoBio/UFPE.

A eficácia da IFD é influenciada por diversos fatores, incluindo a escolha do fotossensibilizador, sua concentração, o regime de irradiação e as características dos microorganismos a serem tratados (Shleeve; Savitsky; Kaprelyants, 2021). Fotossensibilizadores com maior intensidade de fluorescência tendem a apresentar melhor desempenho na inativação de patógenos (Meerovich *et al.*, 2023). Um dos principais atrativos da IFD é sua capacidade de evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, pois os mecanismos de ação são baseados em processos físico-químicos que não estão sujeitos às adaptações genéticas que levam à resistência aos antibióticos (Soares *et al.*, 2022). Isso a torna uma alternativa valiosa para o tratamento de infecções resistentes a medicamentos convencionais.

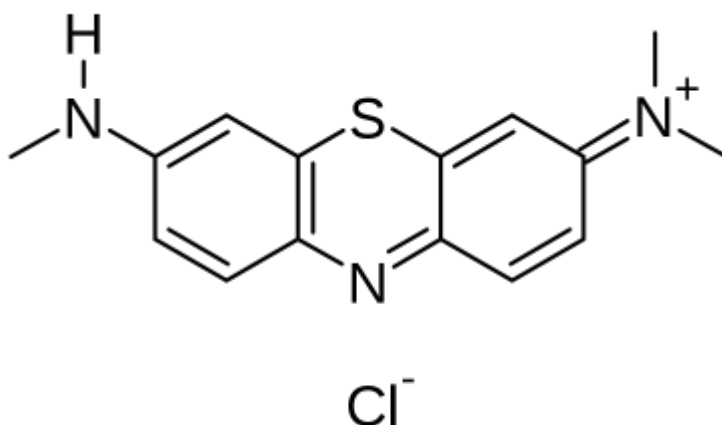
Apesar de sua aplicação em ambiente laboratorial, os insights obtidos com estudos de IFD têm implicações importantes para o desenvolvimento de terapias fotodinâmicas mais eficazes. Compreender os mecanismos de ação da IFD e sua seletividade para microorganismos patogênicos pode fornecer informações valiosas para a otimização de tratamentos *in vivo* e a expansão do arsenal terapêutico disponível para o combate a infecções resistentes a antibióticos.

3.1.2. Fotossensibilizadores

Entre os diferentes Fotossensibilizadores (FS) já relatados na literatura, temos o azul de metileno (AM), que é um corante catiônico e relativamente lipofílico (Fabio *et al.*, 2023).

Tais propriedades, bem como seu baixo custo, garantem sua penetração nas membranas, bem como uma atração por algumas organelas celulares, como a mitocôndria (Taldaev *et al.*, 2023). Além disso, o fato de a molécula ser positiva possibilita sua ligação tanto nas bactérias Gram-positivas, quanto nas Gram-negativas, sendo efetivo na erradicação de fungos na forma planctônica (livre) (Law; Leung; Xu, 2023). A Figura 4 mostra a estrutura molecular do Azul de Metileno.

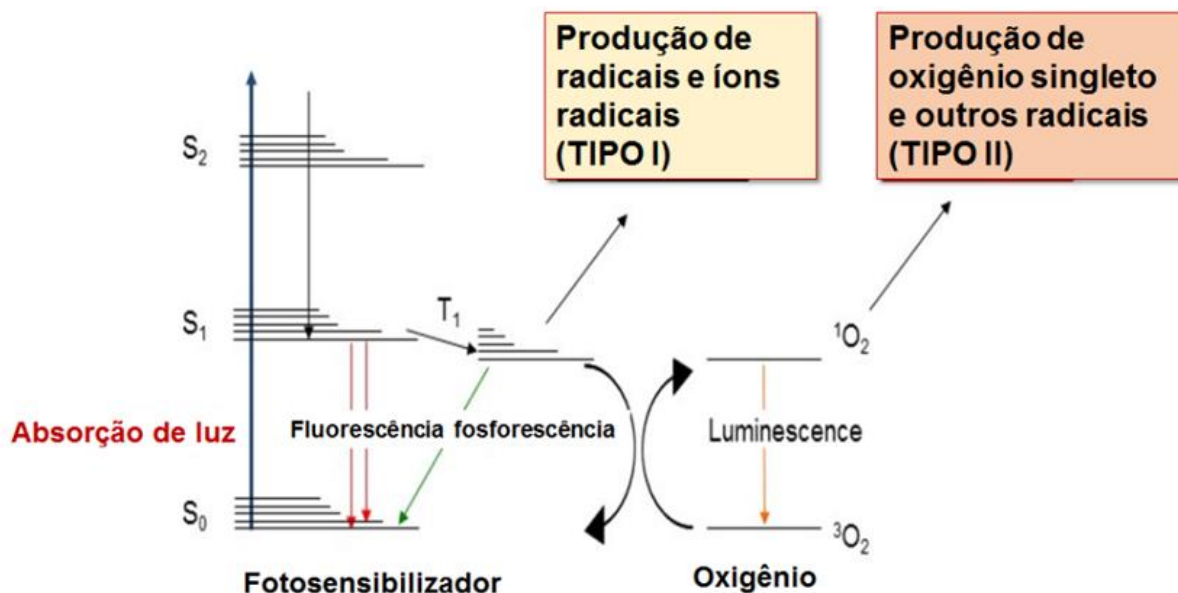
Figura 4 – Estrutura molecular do Azul de Metileno.



Fonte: Próprio autor.

Quando a luz atinge um FS, coincidente a sua região de absorção ocorre à transição de elétrons de seu estado fundamental para o estado excitado. Essa molécula pode então regressar ao estado fundamental por meio de fluorescência, ou pode passar para outro estado, o tripleto, e reagir com o oxigênio molecular através de duas reações: tipo I e tipo II. Essas reações estão representadas no diagrama de Jablonski na Figura 5. Na primeira, temos uma reação direta com o substrato e ocorre a transferência de elétrons, fazendo com que sejam formados radicais livres do FS ou do oxigênio, como, o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical alcoxila, radical peroxila e radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) (Belekov *et al.*, 2020). Na reação do tipo II, temos um outro fenômeno, a transferência de energia, que ocorre por meio da emissão de fluorescência. Essa energia é transferida para o oxigênio, que passa do estado tripleto para o singlete, que possui citotoxicidade intrínseca (Hileuskaya *et al.*, 2023).

Figura 5 – Diagrama de energia de Jablonski para um agente fotossensibilizador interagindo com luz mostrando os processos fotoquímicos possíveis de ocorrerem, com ênfase na reação tipo I e reação tipo II.



Fonte: Grupo NanoBio/UFPE, 2022.

3.1.3. Aglomeração Do Azul De Metileno

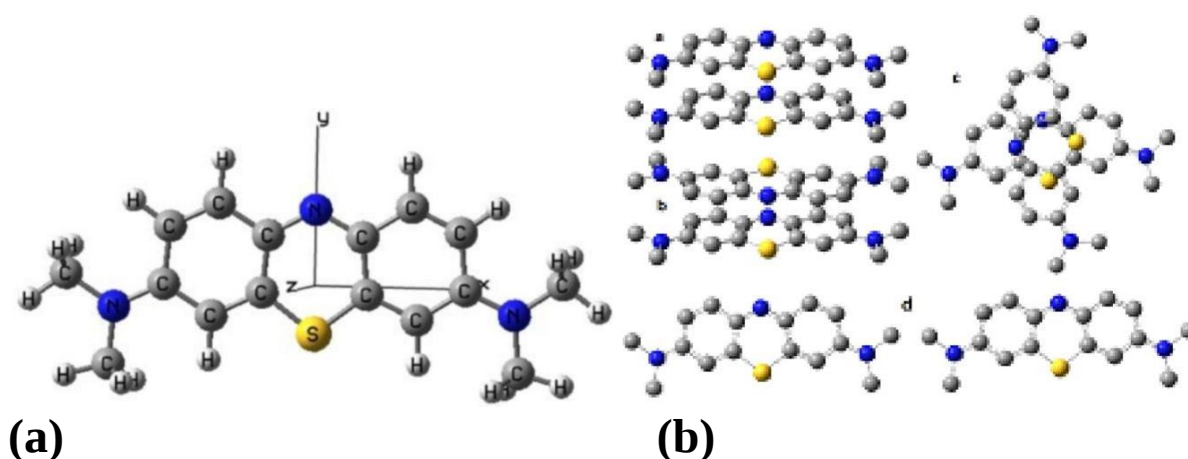
A dimerização do azul de metileno (AM) é um fenômeno amplamente estudado na química e bioquímica. Este processo ocorre devido a interações eletrostáticas e hidrofóbicas, como interações π - π entre suas estruturas aromáticas, que promovem a agregação das moléculas. Bettanin et al. (2007) estudou de forma teórica a formação de dímeros do azul de metileno, comparando as energias dos dímeros a energia total do monômero do AM (Figura 6.a) multiplicada por 2, e propôs 4 diferentes estruturas de dímeros de AM (Figura 6.b), foi observado que as energias dos dímeros, além de possuir valores semelhantes, apresentaram energia de acordo com o dobro da energia do monômero de -140,4061 como mostra a Tabela 1 (Bettanin; Coutinho-Neto; Homem-de-Mello, 2007).

Tabela 1 – Energia do dímero, diferença de energia total (ΔE) entre cada dímero e a energia total do monômero multiplicada por 2 em fase gasosa e distância entre cada dímero.

Dímero	E dímero (Kcal/mol)	ΔE (Kcal/mol)	Distância (Å)
a	-281,75681	0,05542	1,22
b	-281,76262	0,04961	2,36
c	-281,76112	0,05111	3,11
d	-281,76782	0,04441	1,45

Fonte: Bettanin; Coutinho-Neto; Homem-de-Mello, 2007.

Figura 6 – (a) Molécula do azul de metileno; (b) Conformações dos dímeros analisados (os átomos de hidrogênios foram omitidos).

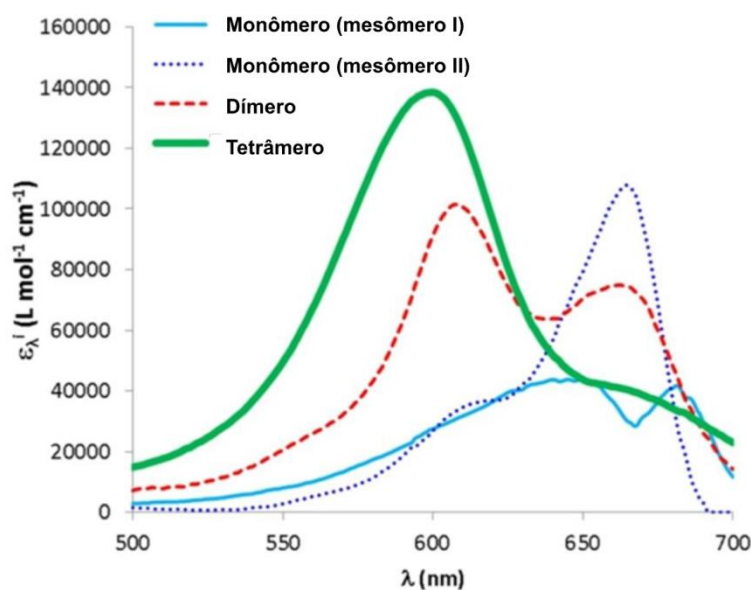


Fonte: Bettanin; Coutinho-Neto; Homem-de-Mello, 2007.

As estruturas de dímeros do AM, determinadas com base em cálculos teóricos, possuem um comportamento de absorção distinto em relação à estrutura monomérica, como pode ser observado em seu espectro de absorção (Figura 7). O espectro apresenta um pico principal de absorção em torno de 664 nm, atribuído às moléculas do monômero na sua forma mesomérica II, enquanto uma banda menos intensa em torno de 607 nm está associada à dimerização das moléculas. Na Figura 7, é possível visualizar também o perfil espectral do tetrâmero do AM e do seu respectivo monômero, este na forma mesomérica I. O estudo sugere que as formas mesoméricas I e II do monômero do AM existem em um equilíbrio dinâmico em solução aquosa, não representando espécies químicas distintas, mas sim duas formas ressonantes que coexistem. Essas formas foram propostas a partir de um modelo teórico que leva em consideração o efeito da ressonância sobre a estrutura molecular do AM. Para determinar a proporção das diferentes formas mesoméricas em solução, foi utilizado um

modelo matemático que considera as constantes de equilíbrio para as reações de autoassociação do AM em solução. De acordo com esse modelo, a proporção entre os mesômeros I e II depende da temperatura e da concentração de AM na solução (Fernández-Pérez; Marbán, 2020). A Tabela 2 apresenta os parâmetros ópticos e termodinâmicos do AM em solução aquosa, com base nesses cálculos teóricos.

Figura 7 – Espectro de absorção de todas as espécies de AM, tanto virtuais (mesômeros) como reais em solução aquosa.



Fonte: Adaptado de Fernández-Pérez; Marbán, 2020.

Tabela 2 – Parâmetros ópticos e termodinâmicos do AM em meio aquoso.

Parâmetros ópticos		
Espécies	$\lambda_{\max}$ nm	$\epsilon_{\lambda_{\max}} \times 10^{-4} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Tetrâmero	600	13.85
Dímero	607	10.14
Monômero (mesômero I)	664	10.78
Monômero (mesômero II)	650	4.40
Parâmetros termodinâmicos		
Monômero $\leftrightarrow$ Tetrâmero		
$\Delta S_{4\&0}$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)		-109.4
$\Delta H_{4\&0}$ (kJ mol ⁻¹)		-100.9
Monômero $\leftrightarrow$ Dímero		
ΔS_d (J mol ⁻¹ K ⁻¹)		-25.6
ΔH_d (kJ mol ⁻¹)		-30.5
Mesômero II $\leftrightarrow$ Mesômero I		
ΔS_m (J mol ⁻¹ K ⁻¹)		24.0
ΔH_m (kJ mol ⁻¹)		8.1

Fonte: Adaptado de Fernández-Pérez; Marbán, 2020.

Vários estudos têm explorado as condições em que a dimerização ocorre mais facilmente, incluindo o efeito do pH, concentração e temperatura. Por exemplo, um estudo de Bergmann & O’Konski (1963) mostrou que a dimerização do azul de metileno é influenciada pela concentração do composto e pelo meio em que está presente (Bergmann; O’Konski, 1963). Em soluções aquosas, a dimerização é mais favorecida em pH ácido ou neutro, enquanto que em pH alcalino, a tendência é que as moléculas se mantenham na forma monomérica. Outro estudo de Florence & Naorem (2014) investigou espectrofotometricamente a dimerização do AM em água e diferentes misturas de água com solventes orgânicos e relatou que a dimerização ocorre mais rapidamente em solventes polares, como o próprio meio aquoso em comparação com solventes menos polares, como o meio misto.

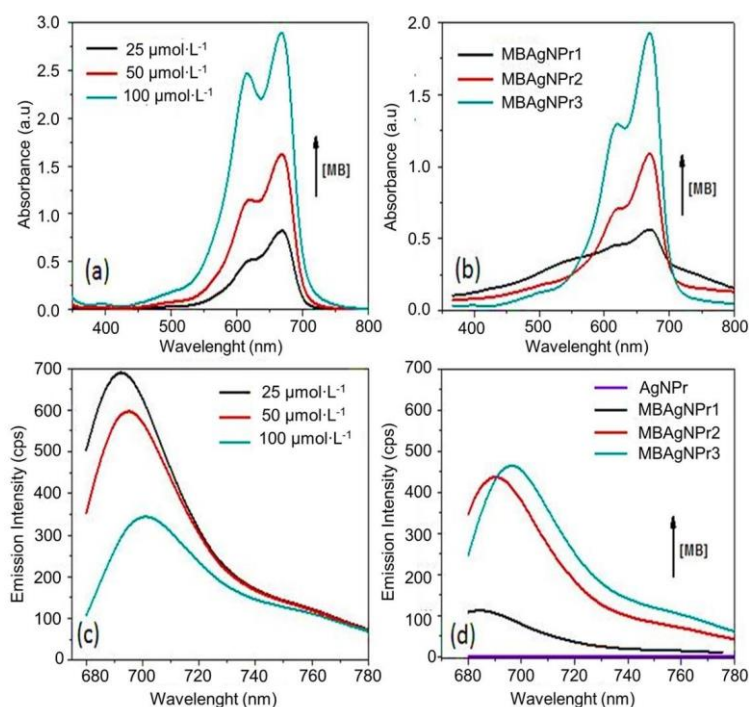
O termo metacromaticidade é citado por Demidova *et al.* (2005) e Monteiro *et al.* (2020) que é uma propriedade de corantes fenotiazínicos, em que eles exibem diferentes cores quando expostos a diferentes condições ambientais, como variações de pH, concentração de íons metálicos ou solventes. Essa propriedade é resultado de mudanças estruturais nas moléculas do material, afetando a forma como a luz é absorvida e refletida, é o que acontece com o AM quando ocorre sua agregação e ele passa de um monômero para um dímero. Quando fenotiazínicos são adicionados a uma suspensão que contém bactérias, ocorre a formação de dímeros ligados aos biopolímeros presentes na superfície bacteriana, resultando na agregação do corante (Monteiro *et al.*, 2020).

De acordo com Usacheva *et al.* (2023) a influência dos dímeros pode desempenhar um papel mais significativo na inativação fotodinâmica do que as espécies monoméricas, embora as propriedades fotofísicas e fotoquímicas das moléculas sejam geralmente analisadas em sua forma não agregada. O azul de toluidina demonstrou não apenas um efeito metacromático mais pronunciado em comparação ao AM, mas também uma eficiência fotodinâmica maior, o que levanta a hipótese de que a interação com os biopolímeros de membrana bacteriana seja um fator importante na inativação de microorganismos (Usacheva *et al.*, 2023).

A dimerização do AM influencia no tipo de mecanismo fotoquímico. Na excitação eletrônica de dímeros, são observadas reações de transferência de elétrons (tipo I), formando radicais semi-reduzidos e semi-oxidados, ou seja, em alta concentração de dímeros, o

mecanismo tipo II é suprimido, favorecendo o mecanismo tipo I, diminuindo ou até eliminando a formação de oxigênio singlete. É sugerido que os radicais semi-reduzidos podem reagir com oxigênio formando superóxido, que pode levar à formação de várias outras espécies reativas de oxigênio, como radical hidroxila (Gabrielli *et al.*, 2004). A concentração do AM no meio também influencia sua dimerização. Observa-se na Figura 8 (a) que o aumento da concentração de AM em meio aquoso leva a um aumento da banda em 607 nm correspondente ao perfil de absorção do dímero, em (b) nota-se uma redução dessa banda indicando que com o aumento da concentração de AM, essas moléculas passaram a interagir mais com as AgNPr do que entre elas mesmas. Na Figura 8 (c) mostra que como aumento da concentração e provável aumento da formação de dímeros de AM ocorre uma diminuição da sua intensidade de emissão, evidenciando que a dimerização não é favorável para a terapia fotodinâmica, em contrapartida em (d) na presença de AgNPr mesmo com o aumento da concentração a intensidade de emissão aumenta, ou seja, não é inversamente proporcional, o que sugere novamente uma maior interação de monômeros AM com as AgNPr (Rodrigues *et al.*, 2024).

Figure 8 - Espectro de absorção de (a) soluções de AM e (b) conjugados AMAgNPr. Perfis de emissão de (c) soluções de AM e (d) conjugados AMAgNPr ($\lambda_{exc} = 660 \text{ nm}$).



Fonte: Rodrigues *et al.* 2024.

3.2. NANOPARTÍCULAS DE PRATA

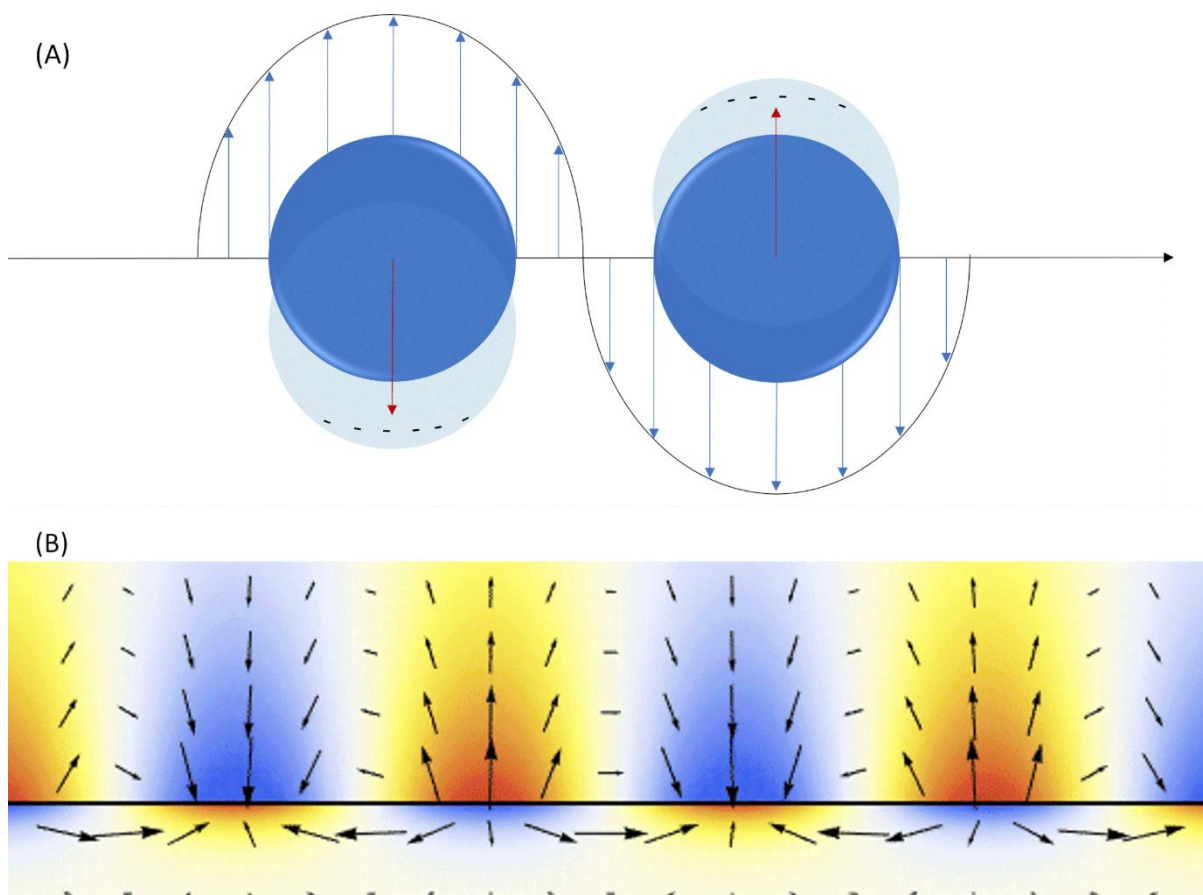
As nanopartículas de prata (AgNPs), obtidas na forma coloidal, apresentam geralmente dimensões entre 10 a 100 nm. Estas nanopartículas possuem diversas propriedades úteis à área da saúde, com ênfase a sua atuação antimicrobiana sendo uma alternativa a resistência bacteriana, ação em terapia fotodinâmica, quimioterapia, radioterapia, como carreadores de fármacos, entrega direcionada de medicamentos, entre outros (Miranda *et al.*, 2022). As AgNPs podem ser sintetizadas por diversas metodologias físicas, químicas e biológicas (Iravani *et al.*, 2014).

Entre os diversos sistemas que visam aumentar a eficiência do efeito fotodinâmico de FS, temos os sistemas nanoestruturados, como as nanopartículas metálicas (Ribeiro *et al.*, 2018). As nanopartículas de prata (AgNPs) já são conhecidas na literatura por conta da sua ação antibacteriana e antifúngica, tendo também a propriedade de ressonância de plásmons de superfície (RPS) que torna seu uso para aplicações de intensificação de sinais ópticos em sua interface (Li *et al.*, 2019). A RPS corresponde à oscilação coletiva dos elétrons presentes na superfície da partícula, após irradiação por um feixe de luz, o que vai ocasionar a transferência de campo eletromagnético para o FS, quando ocorre uma sobreposição espectral de ambos, fazendo com que ocorra uma amplificação da atividade óptica da molécula (Li *et al.*, 2019). Como o espalhamento de luz das AgNPs é um fenômeno dependente da forma e tamanho das partículas, é possível se obter partículas que possuem uma banda de plásmom próxima ao azul de metileno, tendo como um bom exemplo os nanoprismas de prata (AgNP_r) (Ribeiro *et al.*, 2018). Alguns estudos evidenciam a capacidade destes sistemas de amplificar, por efeito plasmônico, as propriedades ópticas de absorção/emissão de luz por parte de FS (Ribeiro *et al.*, 2018).

A denominação plasmônica está atrelada às propriedades ópticas únicas apresentadas por nanopartículas metálicas, possibilitando a manipulação ativa da luz em escala nanométrica (Brongersma e Shalaev, 2010). As nanopartículas metálicas podem ser excitadas por radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho tendo essa última absorção denominada de banda plasmônica na região do visível ou ressonância plasmônica de superfície (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) (Netto-Ferreira, 2015). Essa banda acontece pela oscilação de elétrons na camada de valência dos átomos metálicos devido a excitação óptica promovido por exposição a uma fonte de luz. O comprimento de onda de

absorção plasmônica (banda de plásmom) é dependente de diversos fatores como tamanho de partículas, agente estabilizante de superfície e formas geométricas (Corrêa, 2017). Observa-se na Figura 9 a representação gráfica da ressonância plasmônica de superfície (a) localizada (*Localized Surface Plasmon, LSP*) e (b) polarizada (*Surface Plasmon Polariton, SPP*).

Figura 9 - Ressonância Plasmônica de Superfície (a) localizada e (b) polarizada.



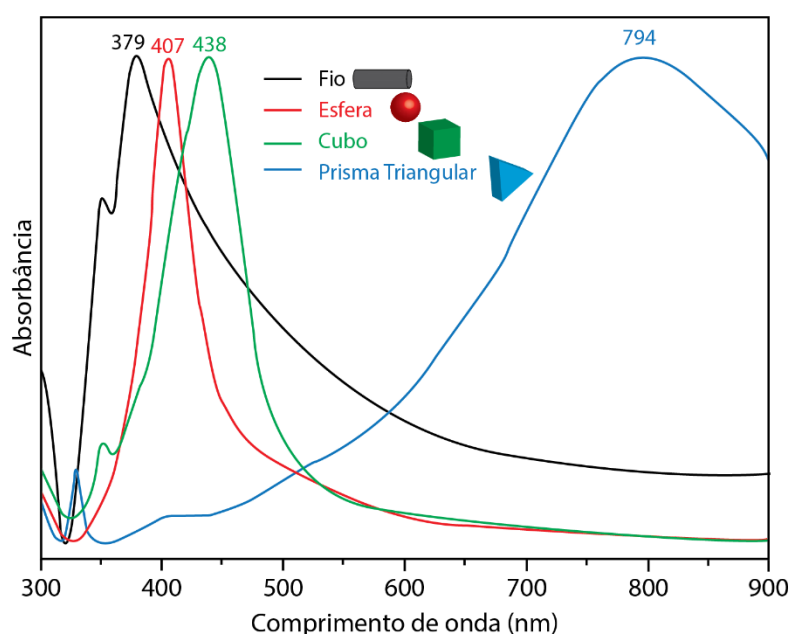
Fonte: Adaptado de Hou; Cronin, 2013.

O SPP ocorre quando fótons de luz incidem em filmes finos metálicos e são confinados em sua superfície, e o LSP ocorre quando o diâmetro da nanopartícula metálica é muito menor que o comprimento de onda incidente, em ambos os casos ocorre ressonância, as nanopartículas de metais nobres como prata e ouro, e outros metais como cobre e cobalto, possuem sua constante dielétrica alta (-) na parte real e baixa (+) na parte imaginária, sendo reconhecidas como nanopartículas plasmônica (Hou; Cronin, 2013).

As partículas de metais nobres como ouro, prata e cobre, adquirem colorações características quando suspensas em meio coloidal, devido a posição da ressonância no espectro de absorção, identificado pelo pico máximo de absorbância, em consequência da

absorção ou espalhamento de luz nas partículas em determinada faixa do espectro de luz visível (Menegotto, 2011). As diferentes colorações são observadas as cores complementares das cores absorvidas relacionadas ao comprimento de onda em que se encontra sua absorbância, estas cores estão associadas ao tamanho e morfologia das nanopartículas, o tamanho das nanopartículas de prata aumenta com o aumento do máximo de absorbância em relação ao comprimento de onda, alterando também a morfologia que pode ser fio, esfera, cubo ou prisma triangular (Silva *et al.*, 2015), como mostra a Figura 10.

Figura 10 - Espectro de absorção UV-Vis apresentando diferentes faixas de absorção da luz (banda plasmônica) de nanopartículas de prata em diferentes morfologias: fio, esfera, cubo e prisma triangular, respectivamente.

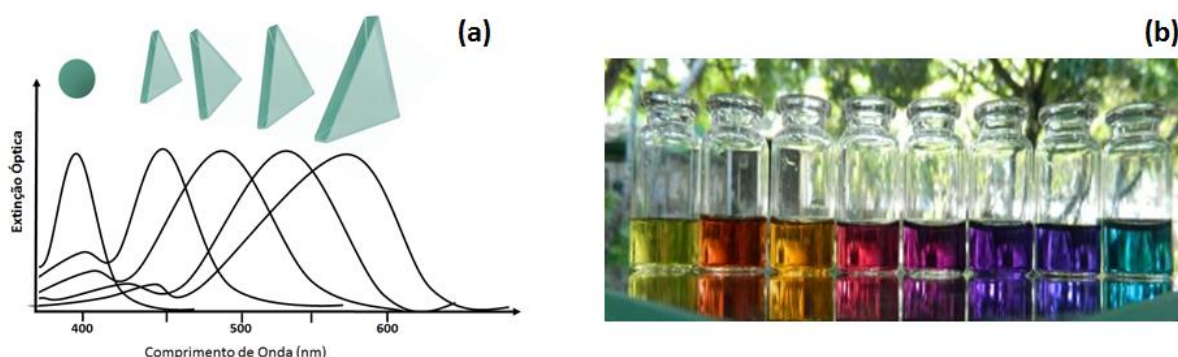


Fonte: Adaptado de DA SILVA *et al.*, 2015.

As morfologias das AgNPs se apresentam geralmente como esféricas, porém podem se apresentar de diversas formas e estão ligadas intrinsecamente ao seu tamanho e a ressonância de plásmos em sua superfície, possibilitando inúmeras aplicações, como por exemplo, ópticas, catalíticas, farmacêuticas, biomédicas e no desenvolvimento de sensores (Firdhouse; Lalitha, 2015). Assim como, podem ser utilizadas na amplificação de fluorescência por seus efeitos plasmônicos, atuando na inativação fotodinâmica de microrganismos, onde com o auxílio de um fotossensibilizador e uma fonte de luz são produzidos radicais livres que inativam os microrganismos (Jesus *et al.*, 2018). A Figura 11 (a) mostra a variação plasmônica de AgNPs prismáticas obtidas a partir do crescimento de

discos, decorrentes das variações de seus tamanhos. AgNPs prismáticas são obtidas através de crescimento anisotrópico em meio aquoso, podendo-se variar sua banda plasmônica em toda a região do visível (400 – 800 nm). Como demonstrado na Figura 11 (b), nosso grupo de pesquisas tem preparado vários destes sistemas, observa-se uma fotografia que mostra dispersões coloidais de AgNPr em diferentes tamanhos de partículas prismáticas (18-40 nm), com variação na coloração destas.

Figura 11 – (a) Variação da banda de plásmon com a variação de tamanho de nanoprismas de Ag; (b) dispersões coloidais contendo nanoprismas de Ag (18 a 40 nm) preparados pelo Grupo NanoBio/UFPE.



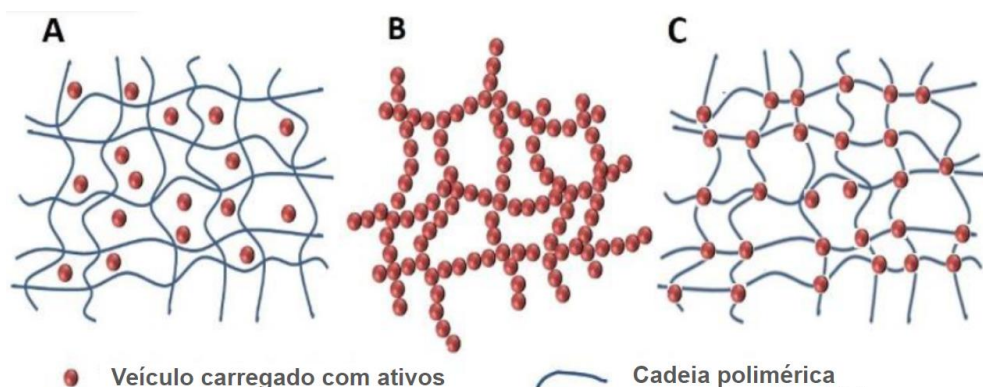
Fonte: Grupo NanoBio/UFPE.

Esses nanoprismas, altamente estáveis com relação à estabilidade coloidal e resistência à agregação, podem ser obtidos facilmente em meio aquoso por meio de uma síntese coloidal "crescida por semente" (Aherne *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2021). Por meio dela, o formato prismático é obtido utilizando diferentes volumes de uma partícula esférica estabilizada por um polímero, o poli-4(estirenosulfonato) de sódio (PSSS). Esse polímero possui vários grupamentos sulfato que vão interagir fortemente com a prata, gerando defeitos na superfície e impedindo o ligamento de íons Ag^+ numa segunda etapa, e permitindo o crescimento modelado dessas partículas (Aherne *et al.*, 2008), que possuem absorção na região do visível, entre 500 e 700 nm (Rodrigues *et al.*, 2024), o que os caracterizam para uso com o AM. Recentemente, o grupo NanoBio/UFPE mostrou a utilização destas conjugadas ao fotossensibilizador azul de metileno, numa concentração final de $45 \mu\text{mol.L}^{-1}$, reduzindo a dose e o tempo utilizados para a inativação de *Staphylococcus aureus* isolada da mastite bubalina, com inativação total com 6 minutos (Rodrigues *et al.*, 2021).

3.3. HIDROGÉIS

Hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros reticulados que têm a capacidade de absorver e reter grandes quantidades de água (M. *et al.*, 2021). Esses materiais são amplamente estudados e utilizados em diversas aplicações biomédicas, farmacêuticas, cosméticas e ambientais devido às suas propriedades únicas, como alta capacidade de hidratação, biocompatibilidade e capacidade de liberar substâncias ativas de forma controlada (Cascone; Lamberti, 2020). Dentre os polímeros comumente empregados na fabricação de hidrogéis, destacam-se o Carbopol 940® e o Natrosol® (HEC - hidroxietilcelulose), que oferecem diferentes características de gelificação e comportamento reológico (Labie; Blanzat, 2023). A Figura 12 mostra diferentes estruturas de hidrogéis associados a compostos ativos (a) uma suspensão de compostos em uma rede polimérica; (b) a formação de hidrogéis através da montagem de compostos; (c) um hidrogel híbrido, ou seja, o hidrogel é composto por uma rede polimérica na qual os nanocompostos são inseridos como um nó de reticulação.

Figura 12 - Estrutura dos hidrogéis combinados com vetores-fármacos (a) o vetor está em suspensão na estrutura porosa; (b) o hidrogel é feito por uma associação de vetores; (c) a rede é feita de polímero combinado com vetores como nós de reticulação.



Fonte: Adaptado de Labie; Blanzat, 2023.

Na TFD, o uso dos FS está fortemente atrelado ao uso em solução, não tendo, muitas vezes, uma padronização de dose em aplicação, como no campo da odontologia, dermatologia e oncologia (Niculescu; Grumezescu, 2021). Por isto, se faz necessário a incorporação destes em formas farmacêuticas viáveis para a aplicação, como as formas semissólidas. Por meio da manutenção da viscosidade destas, diferentes aplicações podem ser traçadas. Recentemente, o uso de hidrogéis contendo conjugados de AM com nanopartículas de ouro foi explorado para

a inativação de células cancerígenas (Jin *et al*, 2021), bem como seu uso para inativação de bactérias (Leung *et al*, 2020).

3.3.1. Comportamento Reológico de Hidrogéis

O comportamento reológico dos hidrogéis desempenha um papel crucial em sua aplicabilidade em diferentes áreas. O Carbopol®, um polímero acrílico reticulado, é amplamente utilizado na formulação de géis devido à sua capacidade de formar redes entrelaçadas estáveis em meio aquoso. Esses géis apresentam uma resposta reológica característica, demonstrando comportamento pseudoplástico sob tensão, o que significa que sua viscosidade diminui quando submetidos a esforços de cisalhamento. Por outro lado, o Natrosol® (HEC), derivado de celulose, é frequentemente utilizado na fabricação de géis transparentes e viscosos devido à sua capacidade de formar redes poliméricas flexíveis. Esses géis exibem comportamento reológico dependente da concentração e da interação entre as cadeias poliméricas, apresentando viscosidade e elasticidade variáveis de acordo com as condições de formulação e processamento. O estudo do comportamento reológico desses hidrogéis é essencial para otimizar suas propriedades físicas e mecânicas, garantindo sua eficácia em diferentes aplicações.

3.4. MICROORGANISMOS E RESISTÊNCIA

A resistência a múltiplos medicamentos (MDR) a classes críticas de antibióticos aumentou gradualmente em patógenos nosocomiais, incluindo *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (que estão reunidos no chamado grupo ESKAPE) (Mulani *et al.*, 2019). *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são dois dos patógenos mais clinicamente relevantes e persistentes encontrados em infecções bacterianas, apresentando uma variedade de mecanismos de resistência que desafiam o tratamento eficaz (Parasuraman *et al.*, 2020).

A espécie *Staphylococcus aureus* é um dos principais agentes patogênicos responsável por infecções hospitalares e adquiridas na comunidade, é frequentemente encontrado na pele e membranas mucosas, como narinas e intestino, podendo também colonizar quase todas as partes do corpo, pode causar uma grande variedade de infecções, desde infecções de pele e tecidos moles do inglês *Skin and Soft Tissue Infections* (SSTIs) a

infecções invasivas graves como a bacteremia, endocardite e pneumonia (Tong *et al*, 2015). Na pele, *S. aureus* pode invadir a barreira cutânea através dos folículos pilosos, causando foliculites ou infecções mais graves como o furúnculo, que pode evoluir para carbúnculo, ocorrendo a invasão de tecidos adjacentes causando danos extensos, é também o agente infeccioso do impetigo não bolhoso ou bolhoso, este último associado a toxina A estafilocócica, a síndrome de pele escaldada é uma outra infecção associada a toxina B estafilocócica (Tortora *et al*, 2010). Nos estágios iniciais da formação de feridas crônicas, microrganismos gram-positivos, especificamente *S. aureus*, são predominantes. Nos últimos estágios, gram-negativos como a *Pseudomonas aeruginosa* é observada e invade camadas mais profundas da pele causando danos significativos nos tecidos. Além disso, as espécies de estafilococos e estreptococos também são encontradas em 50% das feridas (Simões *et al.*, 2018).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa amplamente distribuída no meio ambiente e é um patógeno oportunista comumente associado a infecções hospitalares, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou com doenças crônicas (Behzadi; Baráth; Gajdács, 2021). Esta bactéria é notória por sua habilidade de adquirir resistência a múltiplos antibióticos, incluindo beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, através de mecanismos como a produção de beta-lactamases, bombas de efluxo e alterações na permeabilidade da membrana externa (Mustafa *et al.*, 2021). A resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antibióticos representa um desafio significativo no tratamento de infecções bacterianas, especialmente em ambientes hospitalares, onde cepas resistentes podem se disseminar rapidamente entre os pacientes (Behzadi; Baráth; Gajdács, 2021).

Diante da crescente ameaça representada pela resistência bacteriana, é crucial desenvolver abordagens terapêuticas alternativas e estratégias de controle de infecção para combater eficazmente patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Parasuraman *et al.*, 2020). A IFD tem emergido como uma promissora modalidade terapêutica que pode superar os desafios impostos pela resistência aos antibióticos (Hu *et al.*, 2022). Ao utilizar uma combinação de fotossensibilizadores e luz para inativar seletivamente as bactérias, a IFD oferece uma abordagem eficaz e de amplo espectro para o tratamento de infecções, potencialmente diminuindo a pressão seletiva para o desenvolvimento de resistência bacteriana (Youf *et al.*, 2021).

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. TIPO DE ESTUDO

A pesquisa desenvolvida tem caráter experimental, qualitativo e quantitativo. Inicialmente foi selecionado o sistema AM/AgNPr (FS) com maior efetividade para a aplicação fotodinâmica em solução e em seguida foram desenvolvidos os hidrogéis com incorporação do mesmo. As formulações de Carbopol® foram testadas em diferentes concentrações do FS para a escolha da formulação com melhor perfil para os testes *in vitro* com cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2. LOCAL DE ESTUDO

Os experimentos foram realizados nos laboratórios: LINS (Laboratório de Interfaces, Nanomateriais e Sistemas Coloidais), LAM (Laboratório de Análises Microbiológicas) e Central Analítica, localizados do Departamento de Ciências Farmacêuticas, LBQ (Laboratório de Biofísica Química) e LEB (Laboratório de Engenharia Biomédica), ambas do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, todos lotados na Universidade Federal de Pernambuco.

4.3. MATERIAIS

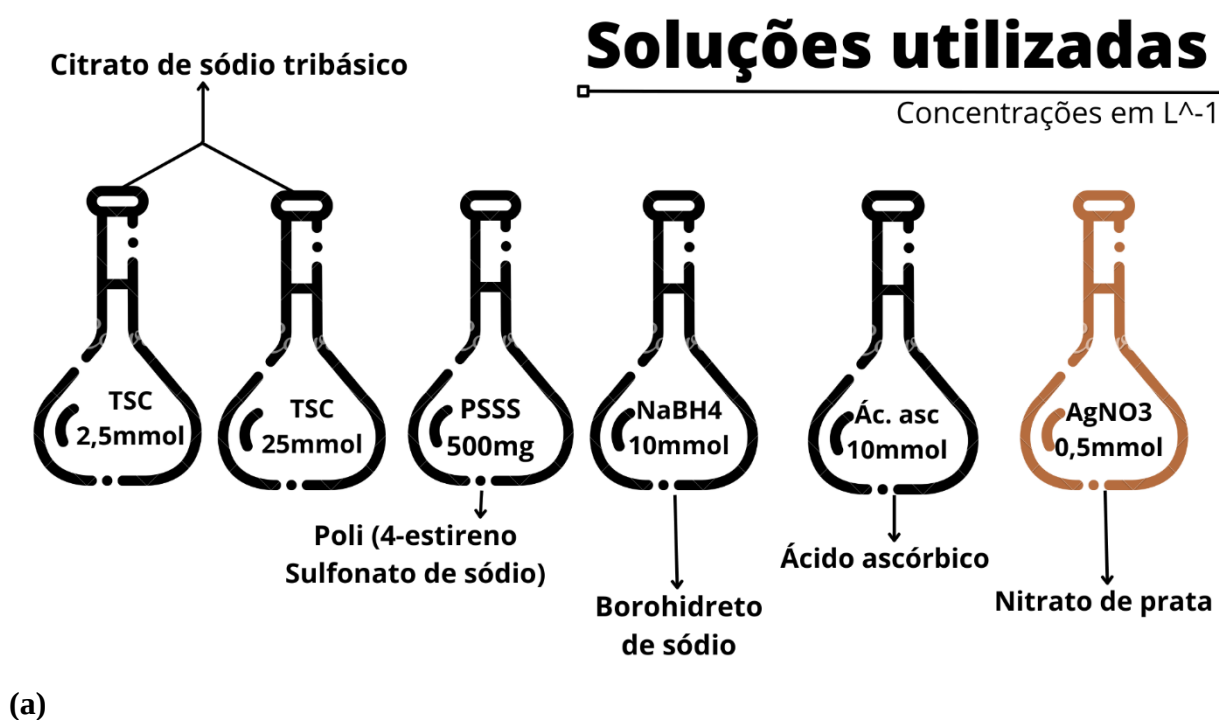
Todos os produtos químicos foram utilizados como recebidos sem purificação adicional. Citrato trissódico (TSC, 98% de pureza), poli(4-estirenosulfonato de sódio) (PSSS, 1000 kDa), borohidreto de sódio (NaBH_4 , 98% de pureza), nitrato de prata (AgNO_3 , 98% de pureza), N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO, 97%), L-Histidina (L-His, 99%), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O azul de metileno (AM, 99%) foi adquirido da Merck. O ácido ascórbico foi adquirido da Neon Comercial (Suzano, São Paulo, Brasil). O ágar Mueller Hinton foi adquirido da Himedia (Kennett Square, Pensilvânia, EUA).

4.4. MÉTODOS

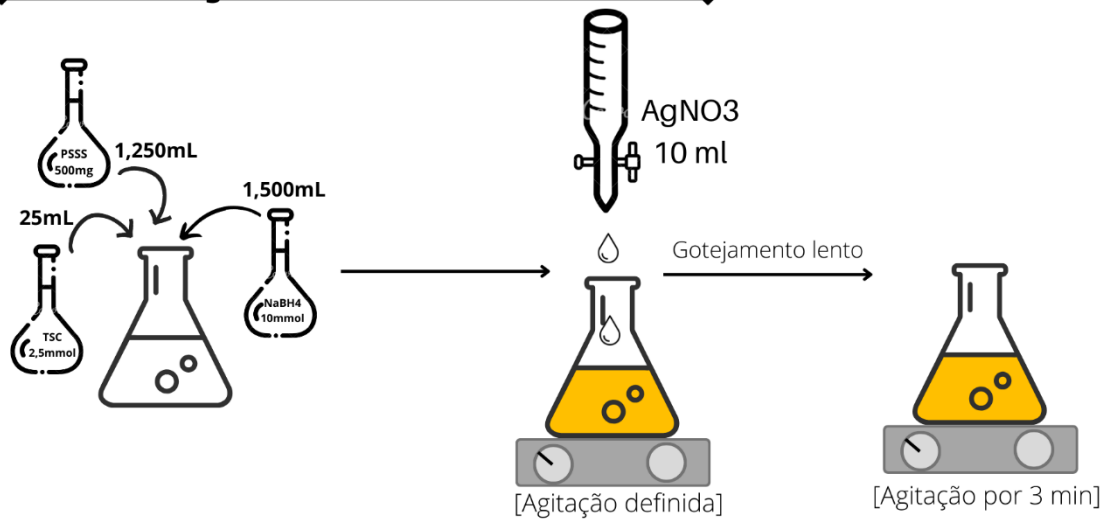
4.4.1. Preparação de AgNPr

A preparação das nanopartículas foi realizada adaptando-se a metodologia de Aherne *et al.*, 2008. Resumidamente, sementes de prata foram produzidas em meio aquoso através da combinação de solução de citrato de sódio (5 mL a $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), solução de PSSS 1.000 kDa (0,25 mL, 500 mg.L^{-1}) e solução de borohidreto de sódio (NaBH_4 0,3 mL, 10 mmol.L^{-1} , recém preparada), seguido pela adição de solução aquosa de AgNO_3 ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, gota a gota). O crescimento foi realizado, sob agitação com frequência variável, com 5 mL de solução de ácido ascórbico ($75 \text{ }\mu\text{L}$, 10 mmol.L^{-1}) e volumes variados da semente, seguido pela adição de solução aquosa de AgNO_3 ($0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) variando volume de AgNO_3 . Após o fim da síntese, foi adicionada uma solução aquosa do agente estabilizante citrato de sódio (0,5 mL a 25 mmol.L^{-1}), para evitar a agregação das partículas. As Figuras 13 e 14 ilustram a esquematização da preparação de nanopartículas de prata através do método semente/crescimento.

Figura 13 – Esquematização da preparação de AgNPr (parte 1). (a) Soluções utilizadas no processo com suas devidas concentrações; (b) Preparação da semente de AgNPr; (c) Preparação para o crescimento de AgNPr, ponto de partida.

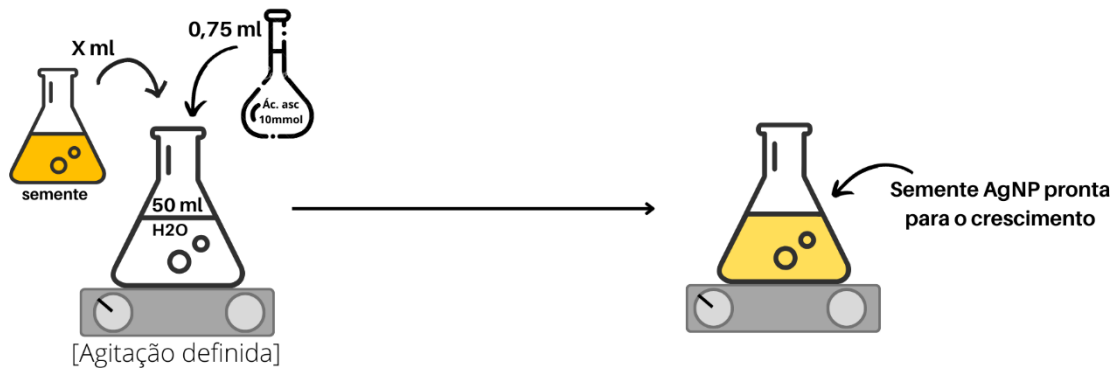


Produção da semente



(b)

Preparação para o crescimento

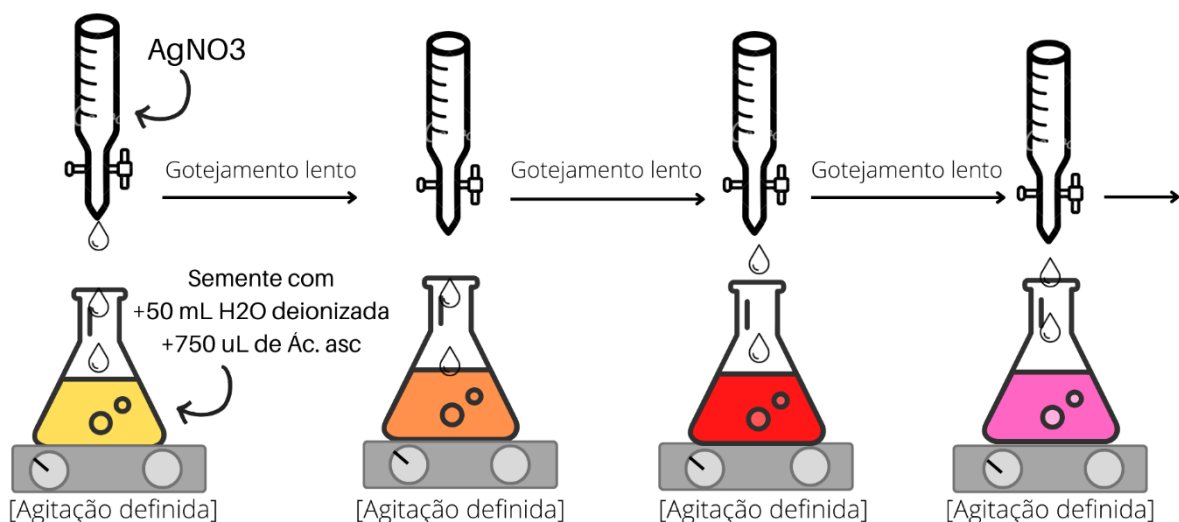


(c)

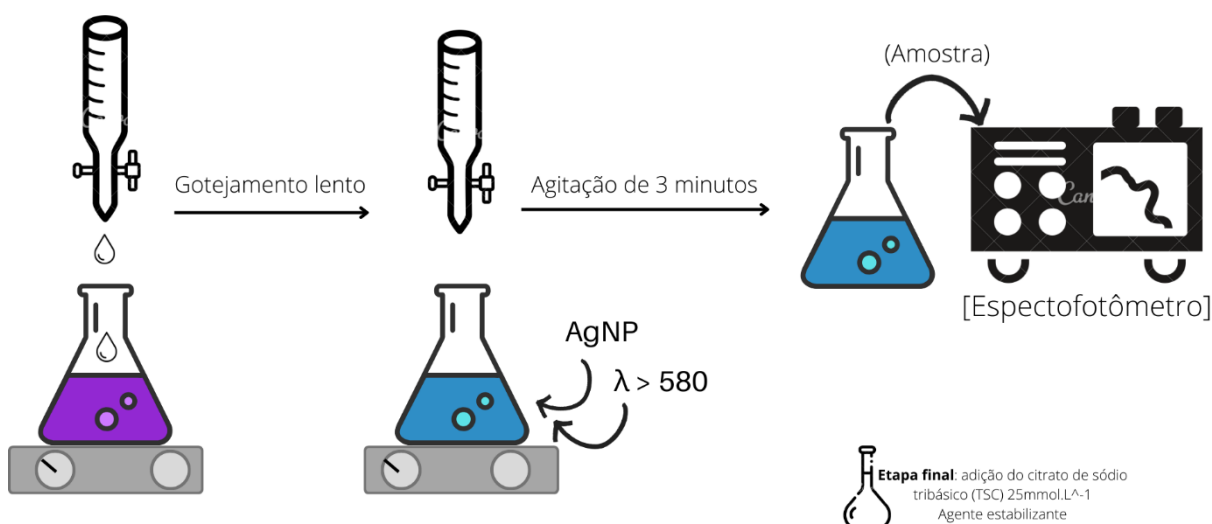
Fonte: Grupo NanoBio/UFPE.

Figura 14 – Esquematisação da preparação de AgNPr (parte 2). (a) Crescimento de AgNPr observado pelas alterações de coloração do meio devido a sua modificação estrutural e seu poder de efeito plasmônico; (b) Finalização do processo de crescimento de AgNPr e caracterização por espectrofotometria UV/Vis identificando a banda de plásmon.

Crescimento da semente



(a)



(b)

Fonte: Grupo NanoBio/UFPE.

4.4.2. Preparação de Sistemas AM/AgNPr

A preparação dos sistemas incorporando AM aos nanoprismas foi realizada por meio de interação eletrostática, sob agitação. Foram realizados estudos para a otimização do processo (p.ex., concentração do AM, tempo de incubação, pH), utilizando nanopartículas em diferentes máximos de extinção. As nanopartículas e conjugados obtidos foram caracterizados por meio de espectroscopia de absorção (Evolution 600 – Thermo Scientific®), emissão, excitação eletrônica (Fluorímetro LS55 – Perkin Elmer®), e de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Também foram realizadas análises de potencial zeta (Zetasizer nano, Malvern Instruments) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

4.4.3. Incorporação de AM/AgNPs em Hidrogéis

A incorporação dos conjugados nos hidrogéis utilizou a metodologia proposta por Lachman, Lieberman e Kanig (2001), com adaptações. O polímero utilizado foi o Carbopol 940®, incorporado aos sistemas AM/AgNPr em diferentes concentrações, por meio de agitação mecânica utilizando um ultraturrax (IKA T18 basic). Hidrogéis contendo apenas azul de metileno foram preparados como controle. Foram também preparados hidrogéis apenas com água deionizada para ser utilizado como branco. Foram utilizadas relações disperso:dispersante de forma que sua viscosidade seja adequada para aplicação tópica. Foram também adicionados agentes permeantes (ureia, etanol, por exemplo) para facilitar sua aplicação tópica em tecidos contaminados contendo células bacterianas patógenas.

Tabela 3 – Componentes dos hidrogéis desenvolvidos para a incorporação do AM/AgNPr testado neste estudo.

HIDROGEL	COMPOSIÇÃO
Carbopol 940®	Polímero 0,5% Trietanolamina qs. PBS qsp. 100%

Fonte: Próprio autor.

4.4.4. Determinação de pH

A medição do pH foi conduzida utilizando um pHmetro de bancada digital Mettler Toledo, modelo S20 SevenEasy, previamente calibrado com soluções padrão fornecidas pelo próprio equipamento. O pH das amostras (solução e hidrogéis) foi determinado diretamente na preparação conforme descrito por Das, Nayak e Nanda (2013).

4.4.5. Determinação de Viscosidade

As medições de viscosidade foram executadas seguindo a metodologia de Borghetti e Knorst (2006), utilizando um viscosímetro Brookfield, modelo DV-I, com spindle 4. As amostras dos géis foram analisadas em triplicata, a uma temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. A velocidade de rotação do spindle foi ajustada para 3,0 rpm, e as leituras foram realizadas com um valor de torque de $100\% \pm 1$.

4.4.6. Determinação de Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Zanin et al. (2001). Uma amostra de 1 mL (medida com uma seringa) foi colocada sobre uma placa de vidro de suporte (20 cm x 20 cm) e sob esta placa foi posicionada uma folha de papel milimetrado. Sobre a amostra foram adicionadas 10 placas de vidro de pesos pré-determinados e, após 1 minuto da inclusão de cada placa, foi calculada a superfície abrangida medindo-se o diâmetro em duas posições opostas, com posterior cálculo do diâmetro médio. A espalhabilidade (E_i) foi então calculada utilizando a Equação 1.

$$E_i = \frac{d^2 \times \pi}{4} \quad (1)$$

Onde:

- E_i = espalhabilidade da amostra para peso i (mm^2);
- d = diâmetro médio (mm);
- $\pi = 3,14$.

Foram sucessivamente acrescentadas 10 placas para o estudo, com pesos variando entre 198,8 g e 210 g, totalizando 2.069,4 g quando usadas todas juntas. Os valores da

espalhabilidade em função do peso das placas foram determinados através de 3 medições, calculando-se a média entre elas. Os resultados são apresentados como curvas de massa adicionada versus área resultante.

4.4.7. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Para detecção da produção de EROs foi utilizado o método químico indireto utilizando-se N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e a L-histidina (KRALJIĆ; MOHSNI, 1967). Em uma placa de 12 poços com um volume total de 6 mL, as seguintes substâncias químicas foram utilizadas: 1 mL de N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO) e 1 mL de L-histidina, com concentrações de $13 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e 15 mmol.L^{-1} , respectivamente. Os fotossensibilizadores foram preparados na concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As amostras foram irradiadas por intervalos de 1 min até um total de 5 min, sendo verificada a absorção em $\lambda = 440 \text{ nm}$, (absorção máxima do RNO). Foi realizado o estudo controle, com apenas os FSs e as nanopartículas, e de todos os conjugados obtidos. O equipamento utilizado foi o Blackbox Smart, acoplado com LEDbox ($\lambda = 660 \text{ nm}$) e Light Chamber (BioLambda®). Espectros de absorção UV-Vis foram registrados entre 350 e 750 nm. Tais medidas foram realizadas em triplicata para assegurar a significância estatística do método. Para as leituras empregou-se o leitor de microplacas de absorbância SPECTROstar® Nano, fabricante BMG Labtech, do Grupo de Pesquisas em Nanotecnologia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco (NanoBio/UFPE).

A produção de ROS equivale à queda na densidade óptica do RNO, dessa forma a quantificação de ROS foi avaliada a partir do coeficiente angular da reta, e percentual de produção de ROS calculado a partir das Equações 2 e 3.

$$RNO_c = \frac{ABS_f \times 100}{ABS_i} \quad (2)$$

$$ROS_p = 100 - RNO_c \quad (3)$$

Onde:

- RNO_c = percentual de RNO consumido;
- ABS_i = absorbância inicial do fotossensibilizador;
- ABS_f = absorbância final do fotossensibilizador;

- ROS_p = percentual de produção de ROS.

4.4.8. Inativação Fotodinâmica de Bactérias Patogênicas

Os inóculos utilizados para o estudo foram cedidos pela Coleção de Cultura de Microorganismos do Laboratório de Análises Microbiológicas/UFPE. MRC *Staphylococcus aureus* NCTC® 12973 (WDCM 00131), Código: MR080, Lote: MRCSA2-03; MRC *Pseudomonas aeruginosa* NCTC® 12903 (WDCM 00025), Código: MR076, Lote: MRCPA1-02; Ambas as cepas produzidas por ControlLab®. Para ativação, uma camada foi subcultivada em ágar Muller Hinton e incubada por 24 horas a 37 °C. Para a preparação da suspensão, a absorbância foi padronizada em 0,234 a 600 nm (correspondente a 10^5 UFC.mL⁻¹) e confirmada com comparação utilizando padrões de McFarland 0,5.

Para inativação de microrganismos, aplicamos a metodologia proposta por Rodrigues *et al.*, (2021). Um LEDBox $\lambda = 660$ nm acoplado com controle inteligente e câmara escura foi utilizado como fonte de luz, aplicando uma irradiância de ca. 22,94 mW.cm⁻². Foi aplicado um tempo de incubação pré-irradiação (PIT) de 15 min. Utilizando uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 μ L da suspensão isolada com a subsequente adição de 100 μ L da suspensão conjugada testada. Após a incubação, cada placa foi exposta a tempos de irradiação de 60, 90 e 120 s (ou seja, doses de luz de cerca de 1,04, 2,00 e 2,08 J.cm⁻², respectivamente). Posteriormente, 10 μ L de cada teste foram colocados verticalmente em uma placa com ágar Muller Hinton. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, foram contadas e convertidas em log₁₀. Um controle seguindo todas as condições descritas acima, foi realizado apenas com o AgNPs, para verificar se o mesmo efeito foi observado para estes sistemas.

4.4.9. Estatística

Os resultados da análise citotóxica foram expressos como média $\pm$ DP, $p < 0,05$ e submetidos à ANOVA seguida de Bonferroni utilizando o programa GraphPad Prisma 7.0. Para a análise de inativação, os resultados foram expressos como média $\pm$ DP, $p < 0,05$, e a estatística ANOVA seguida do teste de Tukey, foi realizada no programa GraphPad Prisma 7.0.

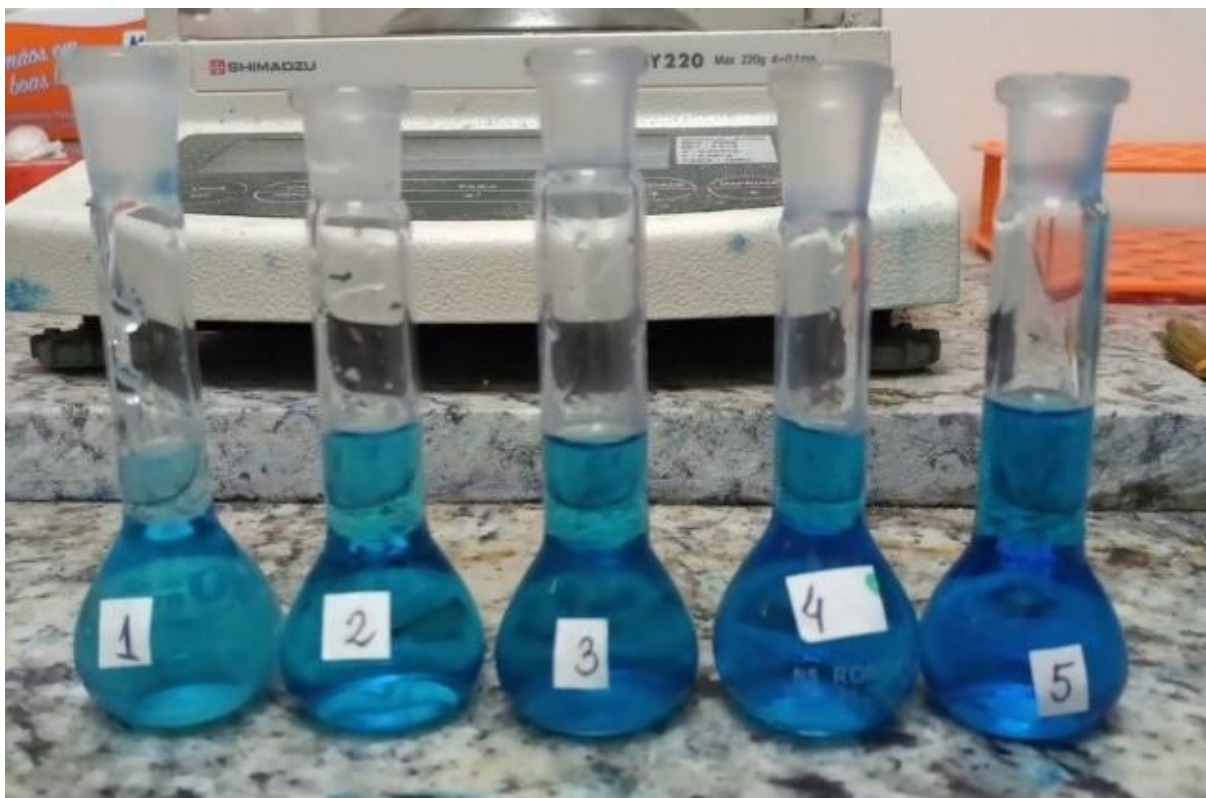
RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DO AM

Foi preparada uma solução padrão de azul de metileno (AM) na concentração molar de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$, partindo de que a massa molar (MM) do AM é $319,85 \text{ g.mol}^{-1}$, foi pesada uma massa de $0,008 \text{ g}$ do AM para o preparo de 250 mL desta solução padrão. Partindo da solução padrão, foram obtidas por meio de diluição cinco amostras, representadas na Figura 15, nas seguintes concentrações molares: 10 ; 20 ; 30 ; 40 e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Estas cinco amostras foram utilizadas para a construção da curva de calibração do azul de metileno, através da leitura dos seus espectros de absorbância foi identificado que o pico máximo de absorbância em todas as amostras foi no comprimento de onda $\lambda = 669 \text{ nm}$. Todo o procedimento foi realizado em triplicata de acordo com a tabela 3.

Figura 15 – Amostras de solução de azul de metileno diluídas partindo da solução padrão. (1) $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (2) $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (3) $30 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (4) $40 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (5) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Próprio Autor.

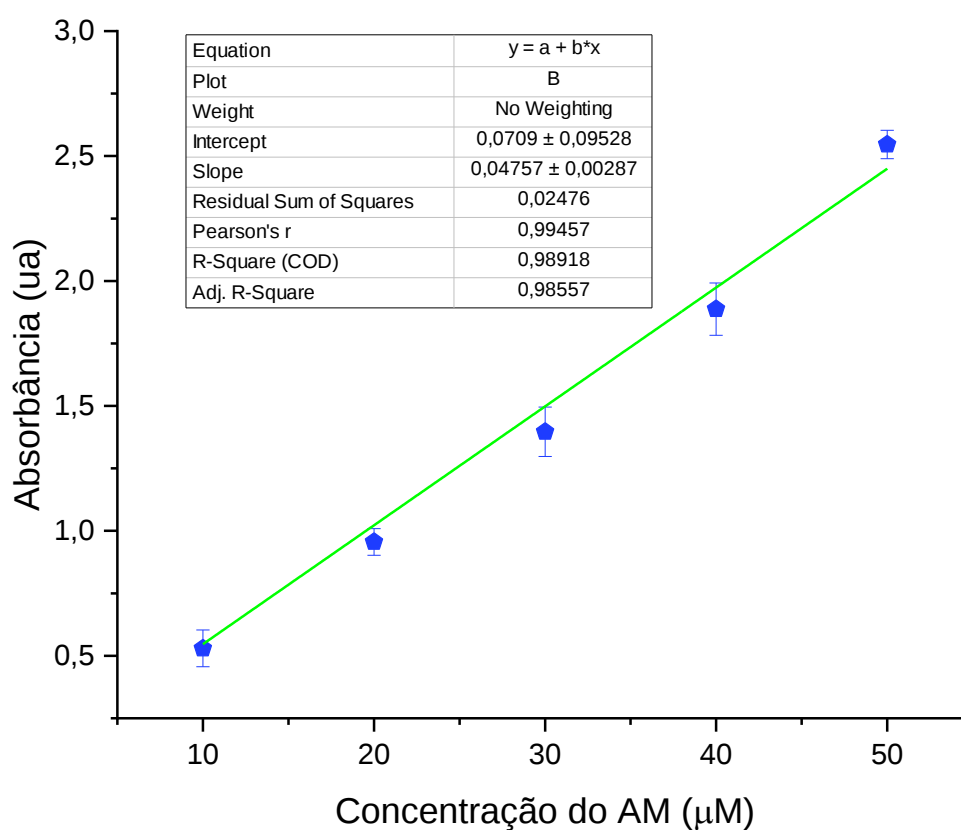
Tabela 4 – Valores das cinco soluções utilizadas na curva de calibração do azul de metileno, partindo de seus espectros de absorbância.

Amostra	Volume da Solução Padrão (mL)	Volume de água destilada (mL)	Concentração ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Absorbância em 669nm Experimento 1	Absorbância em 669nm Experimento 2	Absorbância em 669nm Experimento 3
1	1	9	10	0,613	0,474	0,502
2	2	8	20	1,017	0,925	0,925
3	3	7	30	1,398	1,297	1,495
4	4	6	40	1,924	1,969	1,769
5	5	5	50	2,538	2,494	2,607

Fonte: Próprio Autor.

A partir destes valores obtidos de absorbância, calculando a média das triplicatas, foi possível plotar uma curva de calibração, Figura 16, onde o eixo y é correspondente a absorbância medidas em unidades adimensionais (ua), e o eixo x corresponde as concentrações das amostras utilizadas. Utilizando o método dos mínimos quadrados foi calculado e obtido a equação linear da curva de calibração do azul de metileno.

Figura 16 – Curva Padrão de Azul de Metileno.



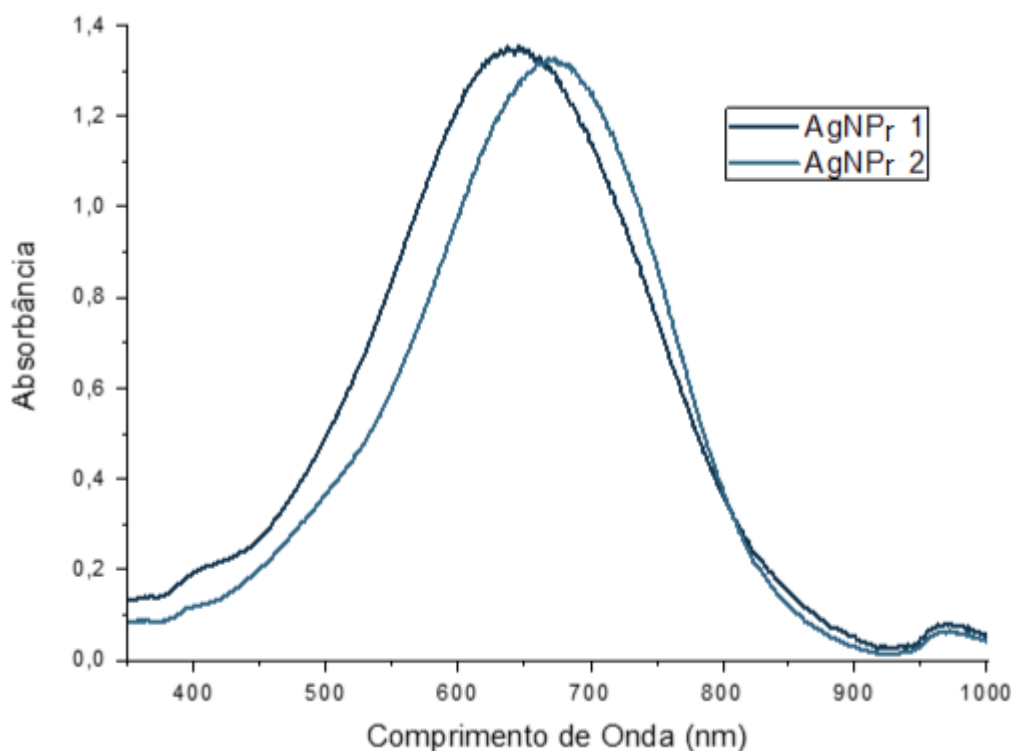
Fonte: Próprio autor.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AgNPs

5.2.1. Espectroscopia de absorção UV-Vis

De acordo com Rodrigues *et al.* (2021) é fundamental que os nanoprismas de prata possuam uma banda de plásmon que se sobreponha à região de absorção do fotossensibilizador azul de metileno, para que assim sejam aprimorados os mecanismos para aplicações fotodinâmicas. Inúmeras partículas foram preparadas a partir das sementes. A ressonância de plásmon de superfície das AgNPr variam conforme seu tamanho/espessura (Millstone et al., 2009). Assim, foram escolhidas duas amostras, com sua banda de plásmon em maior proximidade com o perfil espectral de absorbância do azul de metileno, para realização de todos os experimentos. A amostra AgNPr₁ possui $\lambda_{\text{máx}}$ em 642 nm, e a AgNPr₂ possui $\lambda_{\text{máx}}$ em 671 nm, suas respectivas bandas de plásmon são observadas na Figura 17.

Figura 17 – Banda de plásmon de AgNPr (1) $\lambda_{\text{máx}}$ 642 nm; (2) $\lambda_{\text{máx}}$ 671 nm.

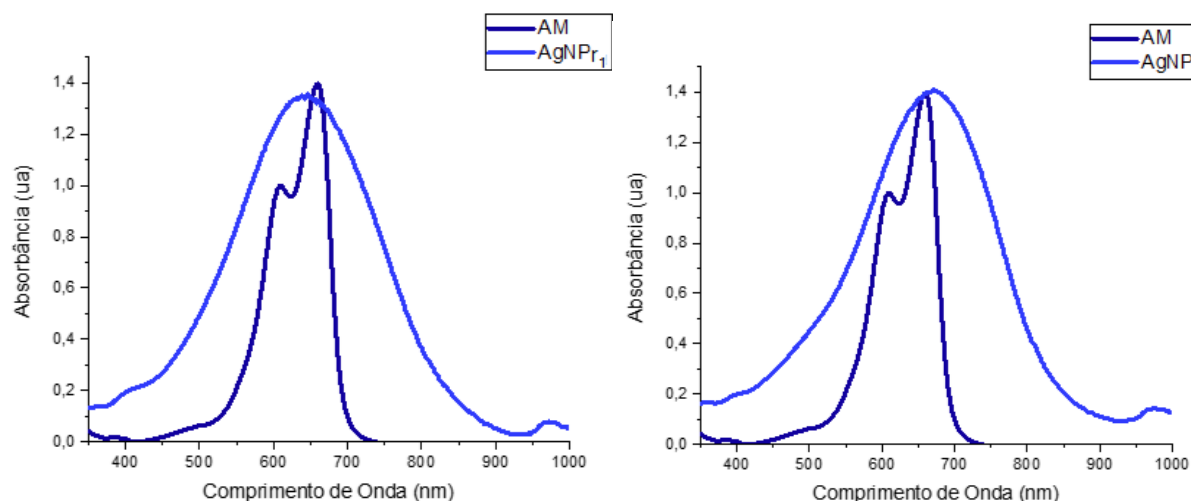


Fonte: Próprio autor.

A sobreposição espectral das AgNPr sobre o AM pode ser observado na Figura 18 que mostra o espectro de absorção do AM e banda de plásmon das AgNPr, exibindo uma sobreposição espectral significativa de ambos os sistemas (a) AgNPr₁; (b) AgNPr₂. Por essa

razão, essas partículas foram escolhidas para testar nossa hipótese de aprimoramento plasmônico em inativação fotodinâmica.

Figura 18 – Sobreposição espectral do azul de metileno a partir das (a) AgNPr₁; e (b) AgNPr₂.



Fonte: Próprio autor.

5.2.2. Potencial Zeta

Foi analisado o potencial zeta em uma das amostras deste estudo (AgNPr₂) realizado em triplicata. Para facilitar a visualização e interpretação dos dados do potencial zeta das amostras de AgNPr₂, os resultados foram organizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores do Potencial Zeta, Condutividade e Áreas dos Picos das Amostras de AgNPr₂.

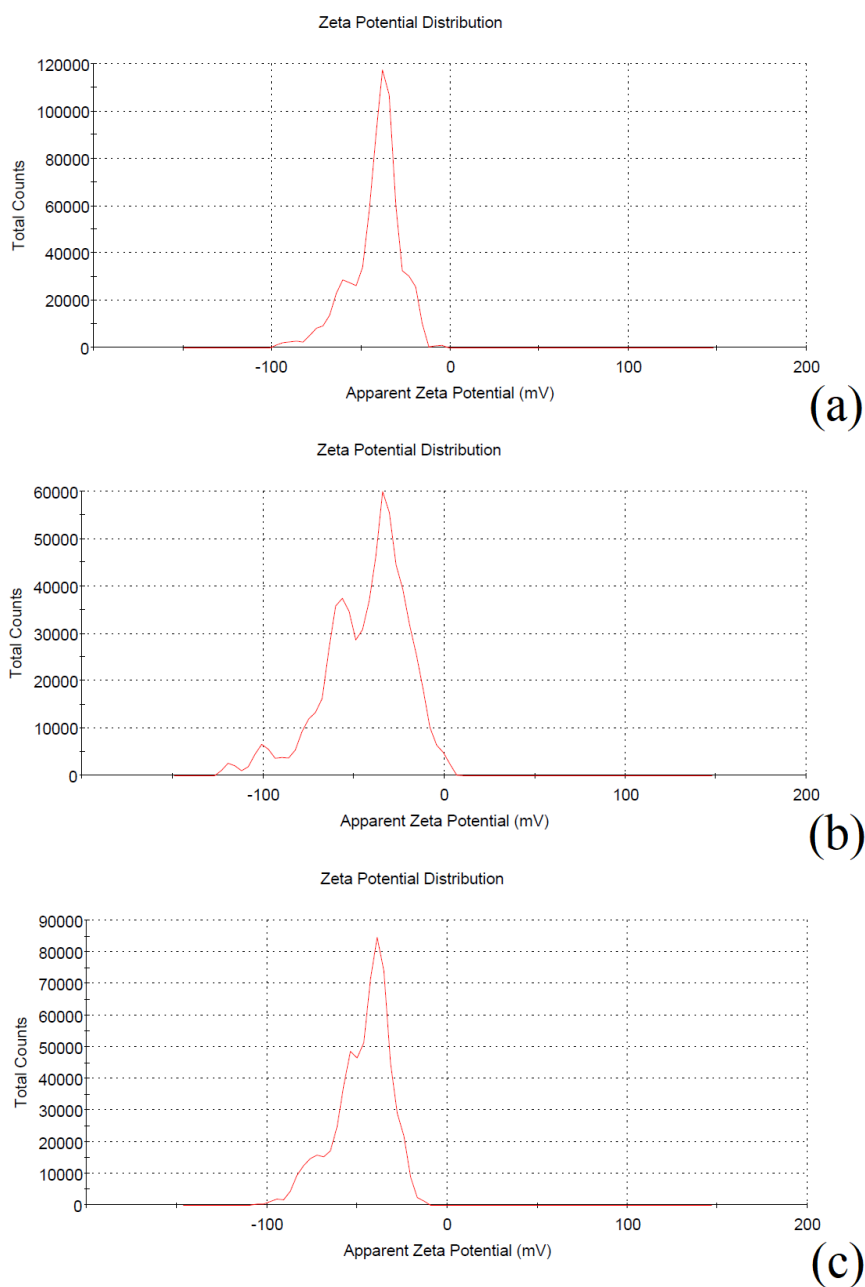
Triplícata	Potencial Zeta (mV)	Condutividade (mS/cm)	Pico 1 (mV)	Área Pico 1 (%)	Pico 2 (mV)	Área Pico 2 (%)	Pico 3 (mV)	Área Pico 3 (%)
1	- 41,7 ± 14	0,0211	- 36,6	79,0	- 62,1	19,3	- 89,9	1,5
2	- 43,0 ± 23	0,0209	- 29,8	62,5	- 60,9	31,6	-100	3,3
3	-46,7 ± 15	0,0211	- 38,0	61,8	- 56,6	26,9	- 76,1	10,5

Fonte: Próprio autor.

A Tabela 5 apresenta os valores médios do potencial zeta, a condutividade e as áreas dos picos observados em cada uma das três triplicatas analisadas. A análise do potencial zeta

das amostras de AgNPr₂ mostrou que todos os valores foram significativamente negativos, o que indica uma boa estabilidade do sistema coloidal, conforme relatado por Rodrigues *et al.* (2021). Os nanoprismas de prata (AgNPr) revestidas com cadeias de PSSS apresentaram três picos distintos em cada triplicata, com variações nos valores dos picos e nas respectivas áreas, refletindo a distribuição e a heterogeneidade das partículas no sistema.

Figura 19 – Distribuição do potencial zeta de AgNPr₂ em triplicata.



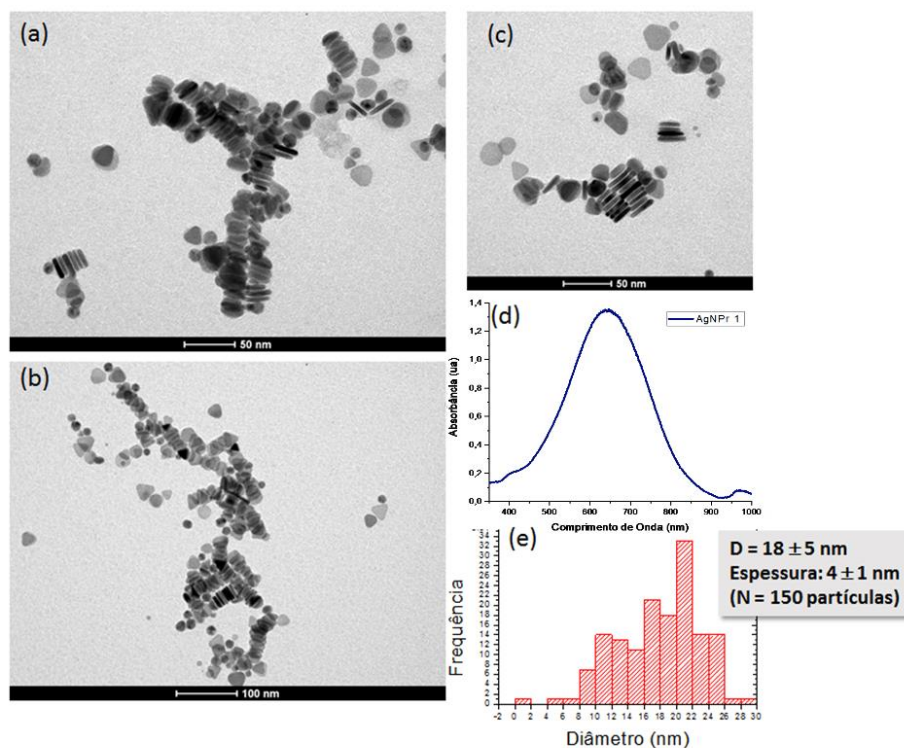
Fonte: Próprio autor.

A Figura 19 mostra a distribuição do potencial zeta de AgNPr2 em triplicata, destacando os picos mencionados na Tabela 1. Esses gráficos fornecem uma visualização clara da distribuição dos potenciais zeta em cada triplicata. Esses resultados indicam que, apesar das variações entre as triplicatas, o sistema manteve-se estável com potenciais zeta negativos consistentes, suportando a conclusão de que as partículas estão efetivamente revestidas por cadeias de PSSS.

5.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Imagens de microscopia de duas amostras estão apresentadas em Figura 20 AgNPr₁ e Figura 21 AgNPr₂. YARAKI *et al.* (2020) fez a microscopia eletrônica de transmissão em três amostras de AgNPr que mostraram uma distribuição uniforme de tamanhos de partículas com um diâmetro médio de 14 ± 3 (14 nm AgNPr), 40 ± 9 nm (40 nm AgNPr) e 80 ± 13 nm (80 nm AgNPr), respectivamente, alcançando valores do diâmetro médio de AgNPr maiores do que no presente estudo, conforme discutido a seguir.

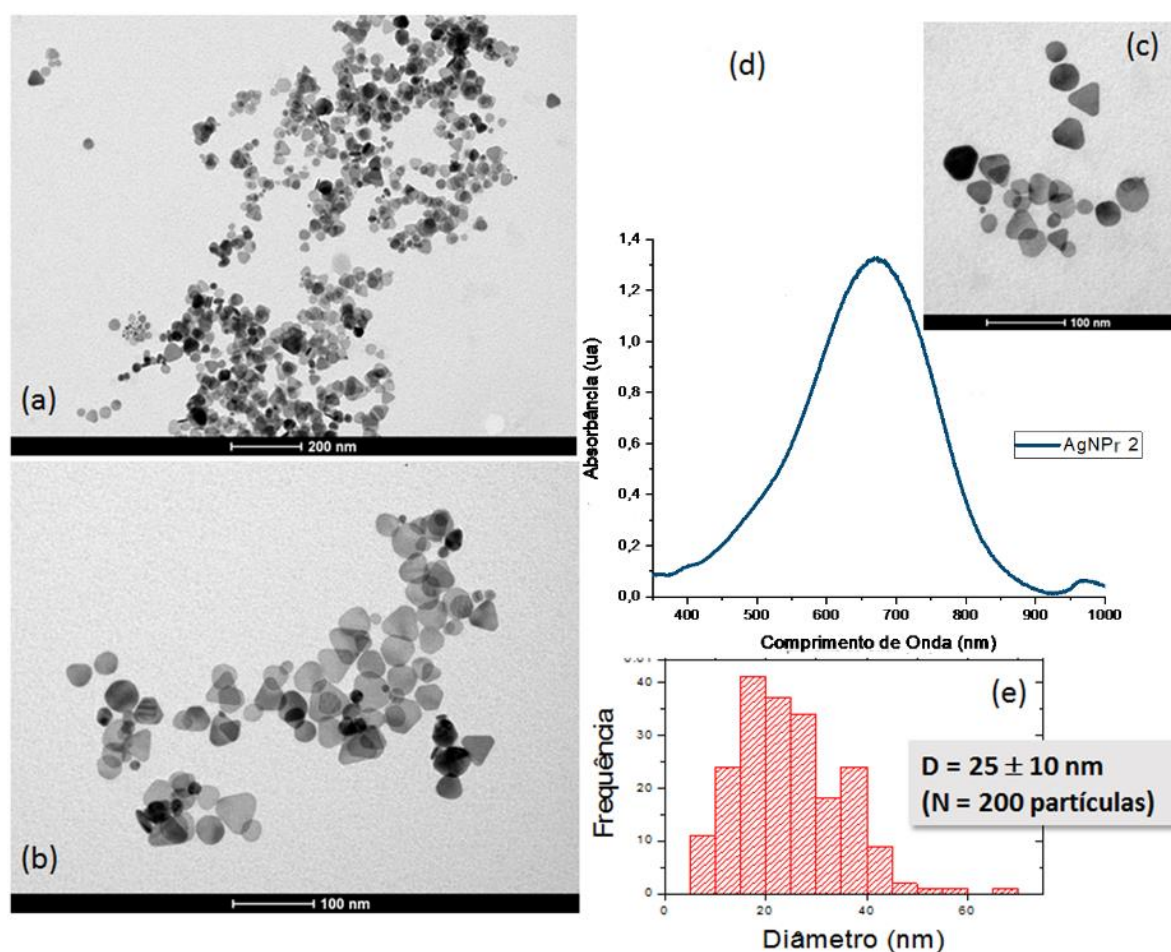
Figura 20 – Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra 1 ($\lambda_{\text{máx}}$ 642 nm): (a,b,c) Imagens de campo claro das partículas de AgNPr₁; (d) Espectro de absorção correspondente da amostra; (e) Histograma de distribuição do tamanho com diâmetro médio.



Fonte: Próprio autor.

Observam-se em todas as imagens partículas de diferentes morfologias (triangulares, semiprismáticas e circulares) porém observa-se que se tratam de partículas de espessura fina. De fato, nas amostras da Figura 20 (a, b, c) e Figura 21 (a, b, c) conseguiu-se observar variadas partículas que secaram mantendo-se associadas umas às outras em sequência possibilitando a estimativa da espessura. Nestas a espessura média ficou em 4 ± 1 nm. Na distribuição das amostras apresentadas na Figura 20 (e) observa-se uma população maior para partículas maiores, comparadas às sementes. Em contraste, na Figura 21 (e) observam-se quase duas populações, condizendo com o perfil espectral, onde se observa a presença de uma expressiva população de sementes, além das outras partículas crescidas.

Figura 21 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão da amostra 2 ($\lambda_{\text{máx}}$ 671 nm). (a,b,c) Imagens de campo claro de AgNPr₂; (d) Perfil espectral de absorção das partículas; (e) Histograma de distribuição do tamanho com diâmetro médio.



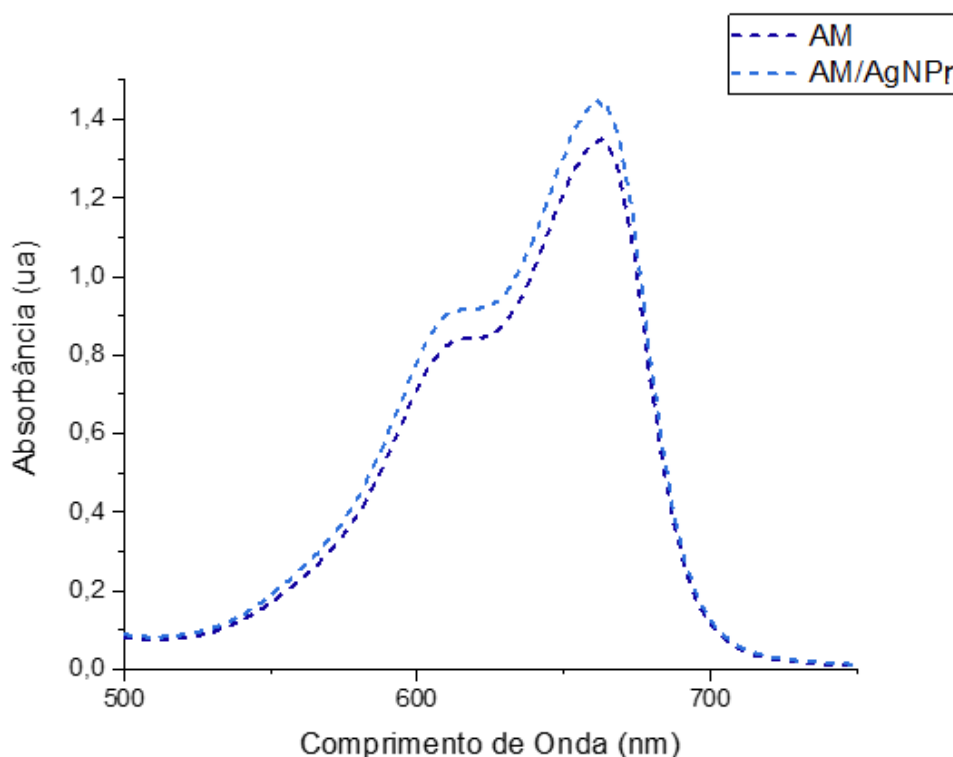
Fonte: Próprio autor.

5.3. CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DOS CONJUGADOS AM/AgNPs

5.3.1. Espectroscopia de Absorção UV-Vis

Os espectros de absorção UV-Vis para o azul de metileno (AM) e o conjugado azul de metileno com nanopartículas de prata (AM/AgNPr), ambos em concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$, foram plotados em um mesmo gráfico para comparação, observado na Figura 22. A análise dos espectros revela que o AM/AgNPr apresenta uma absorbância levemente maior em comparação ao AM isolado.

Figura 22 – Espectros de absorção UV-Vis dos FSs AM e AM/AgNPr, ambos na mesma concentração de $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$.



Fonte: Próprio autor.

O espectro de absorção do AM exibe um pico característico de absorção em torno de 664 nm, que é típico da transição eletrônica do cromóforo presente no azul de metileno. Este pico de absorção é associado à banda de absorção $\pi-\pi^*$ do sistema aromático conjugado do AM (Fernández-Pérez; Marbán, 2020). Quando comparado ao AM isolado, o espectro do AM/AgNPr mostra um aumento na absorbância, mantendo o pico de absorção em uma posição similar. Este aumento na absorbância pode ser atribuído a vários fatores.

A presença das nanopartículas de prata (AgNPr) pode intensificar a absorção do AM devido ao efeito de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) (Hou; Cronin, 2013). As AgNPr possuem uma banda de absorção característica que se sobrepõe podendo interagir com a banda de absorção do AM, resultando em uma maior absorbância (Ribeiro *et al.*, 2018). Este efeito ocorre porque as nanopartículas metálicas, como a prata, podem amplificar o campo eletromagnético local ao redor das moléculas de AM, aumentando a probabilidade de transições eletrônicas (Li *et al.*, 2019).

A maior absorbância observada para o AM/AgNPr em comparação ao AM isolado pode ser explicada por uma combinação de efeitos de ressonância plasmônica de superfície localizada, conjugação molecular, aumento na densidade de estados eletrônicos e possível formação de agregados ou complexos. Estes fatores, em conjunto, resultam em uma maior eficiência de absorção de luz pelas moléculas de AM quando conjugadas com nanopartículas de prata, evidenciando o potencial do sistema AM/AgNPr para aplicações em fotônica e sensores baseados em propriedades ópticas.

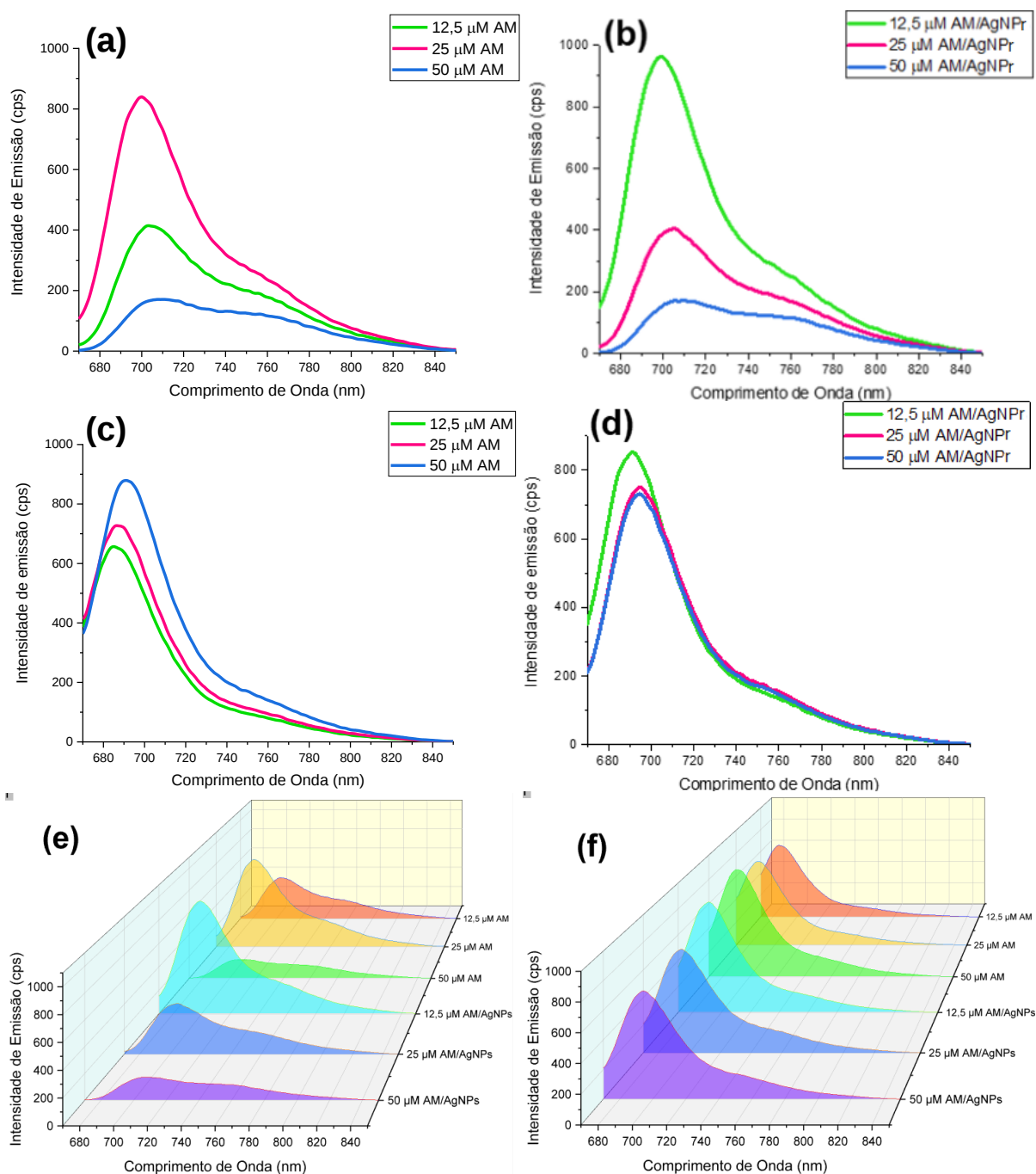
5.3.2. Espectroscopia de Emissão

A concentração do azul de metileno pode afetar o espectro de emissão de várias maneiras. Em baixas concentrações, a intensidade da emissão aumenta proporcionalmente à concentração do corante (Rodrigues *et al.* 2024). Isso ocorre porque há mais moléculas disponíveis para absorver e reemitir a luz. Já em concentrações mais altas, a intensidade da emissão pode não aumentar de forma linear. As moléculas de azul de metileno podem formar agregados (dímeros ou maiores), que têm diferentes propriedades ópticas em comparação com as moléculas individuais (monômeros) (Fernández-Pérez; Marbán, 2020). Em alguns casos, pode até diminuir devido ao efeito de auto-quenching (autoextinção) ou extinção interna, onde as moléculas próximas absorvem a luz emitida por outras moléculas antes que ela possa escapar da solução (“*Optical Properties of Methylene Blue*”, 2023). A Figura 23 (a) e (c) mostra o comportamento da emissão do AM com a variação da concentração.

A Figura 23 (b) e (d) mostra os sistemas AM/AgNPr, seus espectros de emissão foram significativamente alterados sugerindo às interações entre o corante e os nanoprismas. AgNPs podem aumentar a intensidade da emissão do azul de metileno através do efeito de aumento de campo plasmônico (Li *et al.*, 2019), sugerindo que está amplificando o campo

elétrico local ao redor do corante, resultando em uma maior eficiência de excitação e emissão de fluorescência.

Figura 23 – Espectros de emissão de fluorescência dos fotossensibilizadores (a) AM₁; (b) AM/AgNP_{r1}; (c) AM₂; (d) AM/AgNP_{r2}; (e) mapeamento em cascata 3D no eixo Z das amostras AM₁ e AM/AgNP_{r1}; (f) mapeamento em cascata 3D no eixo Z das amostras AM₂ e AM/AgNP_{s2}.



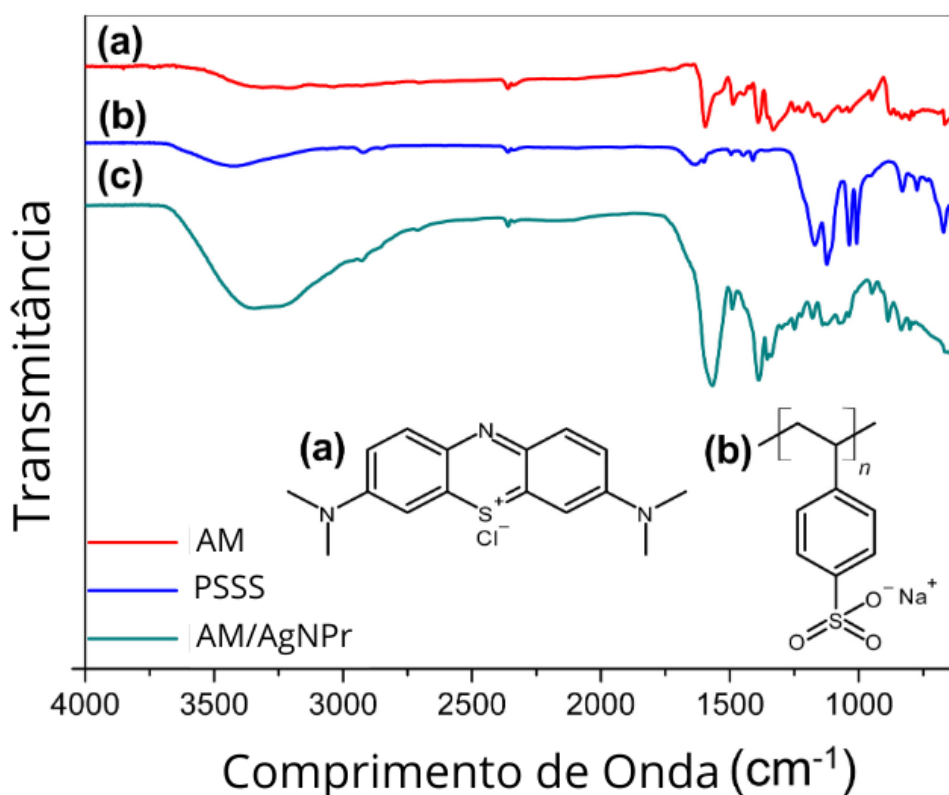
Fonte: Próprio autor.

As AgNPs possuem ressonâncias plasmônicas de superfície, que são oscilações coletivas dos elétrons na superfície das nanopartículas (Ribeiro *et al.*, 2018). Essas ressonâncias podem interagir com o AM e causar um deslocamento no pico de emissão (Rodrigues *et al.*, 2021). Sugere-se também que a presença de AgNPs pode causar quenching da fluorescência ao AM. Isso ocorre quando a energia excitada do corante é transferida não radiativamente para as AgNPs, resultando em uma redução da intensidade de emissão (Pahang; Parvin; Bavali, 2020).

5.3.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados de FTIR apresentados na Figura 24 fornecem uma visão detalhada das interações moleculares entre os componentes dos sistemas (PSSS, AM e AM/AgNPr). A análise dos espectros de infravermelho revela características importantes que ajudam a entender a natureza dessas interações.

Figura 24 – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos sistemas: AM, AgNO₃, PSSS e AM/AgNPr.



Fonte: Grupo NanoBio/UFPE.

No espectro de infravermelho do AM na Figura 24, identificamos as frequências de vibração características da molécula: (1) $\nu = 1594 \text{ cm}^{-1}$, que corresponde à sobreposição das deformações axiais C–C e C–N, indicando a presença de grupos amínicos na estrutura do AM (Ovchinnikov *et al.*, 2016); (2) $\nu = 1546 \text{ cm}^{-1}$, referente à deformação axial dos grupos C–C e C–N do anel heterocíclico, essencial para a estabilidade estrutural do AM (Aoki *et al.*, 2010); (3) $\nu = 1420$ e 1395 cm^{-1} , associadas às deformações simétricas e assimétricas fora do plano dos grupos CH₃, estas bandas indicam a presença de grupos metila (Li; Wang; Jiang, 2010); (4) $\nu = 1491 \text{ cm}^{-1}$, correspondente a uma vibração C=S⁺, confirmando a presença do grupo sulfonio (Ovchinnikov *et al.*, 2016); (5) $\nu = 1357$ e 1338 cm^{-1} , correspondentes à deformação axial C–N e C–S⁺ do anel heterocíclico mostrando a complexidade da estrutura do AM (Zhang *et al.*, 2012); (6) $\nu = 1143$ e 1066 cm^{-1} , correspondentes às vibrações fora do plano dos grupos C–N e C–S–C, indicando ligações entre átomos de carbono, nitrogênio e enxofre (Aoki *et al.*, 2010).

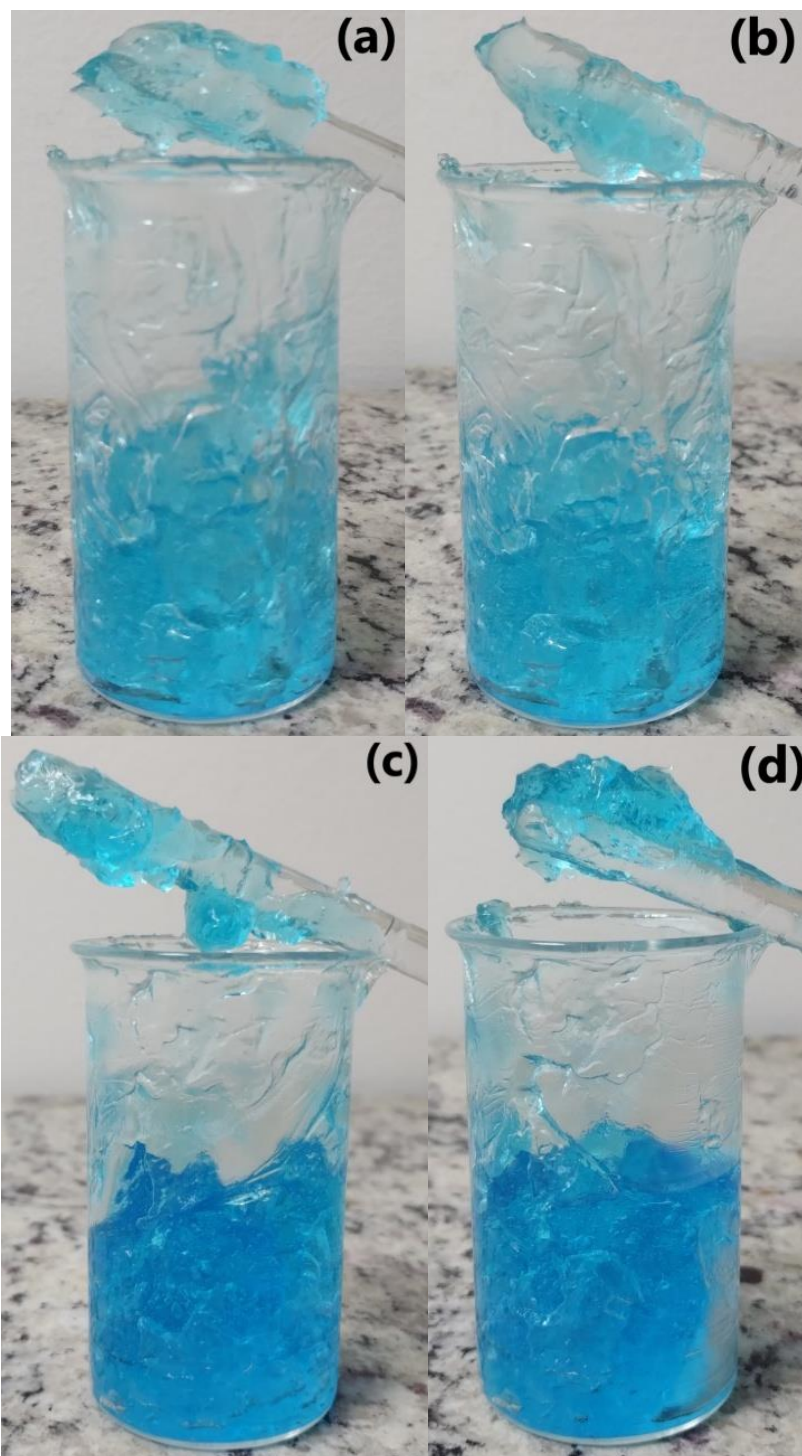
No espectro de absorção infravermelho do polímero PSSS, que reveste os AgNPr, observamos vibrações previstas relacionadas às vibrações de deformação axial -SO₃ em $\nu = 1171, 1124, 1035$ e 1006 cm^{-1} , estas bandas são indicativas dos grupos sulfonato presentes no polímero, essenciais para sua função como agente estabilizante e de associação com outras moléculas (Andrade; Bezerra; Calado, 2019). No espectro de absorção infravermelho dos conjugados AM/AgNPs, identificamos bandas associadas ao AM ($\nu = 1491, 1388, 1357, 1338 \text{ cm}^{-1}$) Estas bandas confirmam a presença de MB nos conjugados, indicando que as moléculas de MB estão efetivamente ligadas às nanopartículas de prata. A vibração esperada em $\nu = 1594 \text{ cm}^{-1}$ é deslocada para $\nu = 1571 \text{ cm}^{-1}$, sugere-se uma interação significativa entre o AM e as cadeias poliméricas do PSSS, resultando em uma diminuição da força de ligação do grupo funcional -C=S⁺. No mesmo espectro, observamos picos vibracionais do PSSS em $\nu = 1176, 1122, 1038$ e 1008 cm^{-1} estas bandas corroboram a presença do PSSS nos conjugados, indicando que o polímero mantém sua estrutura no sistema conjugado (Andrade; Bezerra; Calado, 2019). Esses resultados indicam fortemente a associação eficaz das moléculas de AM aos AgNPr.

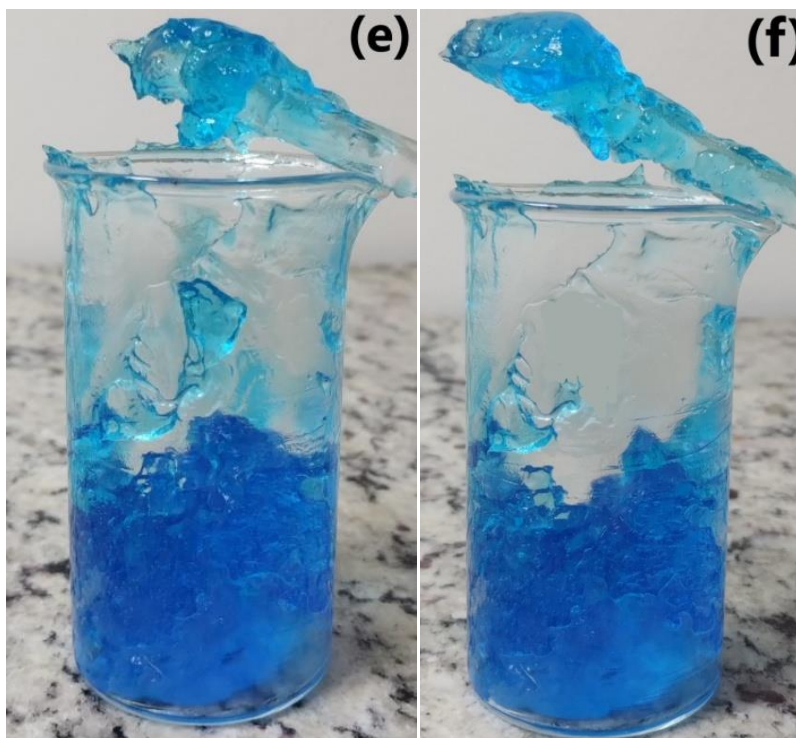
5.4. ASPECTOS MACROSCÓPICOS DOS HIDROGÉIS

As formulações em hidrogel demonstraram uma estabilidade significativa ao longo do tempo, sem ocorrência de separação de fases tanto antes quanto após a incorporação dos fotossensibilizadores. Esse comportamento é indicativo de uma boa compatibilidade entre os

componentes da matriz hidrogel e os fotossensibilizadores. Além disso, a integridade estrutural das formulações foi mantida, preservando as propriedades físicas desejadas do hidrogel.

Figura 25 – Imagem das formulações de hidrogel Carbopol®: contendo (a) $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM; (b) $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr; (c) $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM; (d) $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr; (e) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM; (f) $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Am/AgNPr; sob luz ambiente.





Fonte: Próprio autor.

Os hidrogéis contendo azul de metileno (AM) e a combinação de azul de metileno com nanoprismas de prata (AM/AgNPr) exibiram uma coloração azul intensa e homogênea, que é uma característica distintiva do composto ativo. A presença do azul de metileno é crucial para as propriedades fotodinâmicas desejadas, e a coloração observada sugere uma distribuição uniforme do fotossensibilizador dentro da matriz do hidrogel. A Figura 25 ilustra essa coloração característica, evidenciando a eficiência do processo de incorporação e a estabilidade das formulações resultantes.

5.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS HIDROGÉIS

5.5.1. Determinação de pH e Viscosidade

Os resultados de pH de todas as formulações, soluções e hidrogéis, apresentaram-se na faixa de 5,54 a 6,24. Essa faixa de pH indica uma boa proximidade ao pH normal da pele, que é levemente ácido, situando-se entre 4,6 e 5,8 e produtos tópicos devem ser acidificados e possuir pH na faixa de 4 a 6 (Lukić; Pantelić; Savić, 2021). Esse pH levemente ácido é crucial para a manutenção da barreira cutânea e para a proteção contra microorganismos patogênicos, além de favorecer a estabilidade do gel, mantendo-se próximo à neutralidade. A estabilidade

do pH é importante para garantir que as propriedades físicas e químicas do gel permaneçam constantes ao longo do tempo.

Os resultados de viscosidade mostram que as diferenças entre os valores de pH não influenciaram significativamente o comportamento dos géis, sugerindo que as formulações mantêm uma consistência adequada independentemente das pequenas variações de pH. A viscosidade é um parâmetro crucial na formulação de géis, pois afeta diretamente a aplicação tópica e a percepção sensorial do produto (Kumar; Mandal; Mahmood, 2024). A manutenção da viscosidade adequada é essencial para garantir que o gel seja fácil de espalhar e permaneça no local de aplicação por um período prolongado. A Tabela 6 apresenta detalhadamente os valores de pH e viscosidade com seus respectivos desvios padrão, de todas as formulações, evidenciando a consistência dos resultados e a adequação das formulações para uso tópico.

Tabela 6 – pH e viscosidade das soluções e hidrogéis, nas concentrações 12,5, 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com os FS AM e AM/AgNPr.

Amostras	pH	Desvio Padrão ($\pm$)	Viscosidade (cp)	Desvio Padrão ($\pm$)
Solução 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM	5,54	0,12	-	-
Solução 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr	5,61	0,10	-	-
Solução 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM	5,63	0,14	-	-
Solução 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr	5,57	0,11	-	-
Solução 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM	5,59	0,13	-	-
Solução 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr	5,60	0,12	-	-
Hidrogel 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM	6,16	0,06	2×10^6	0,00
Hidrogel 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr	6,21	0,09	2×10^6	0,00
Hidrogel 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM	6,19	0,10	2×10^6	0,00
Hidrogel 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr	6,24	0,07	2×10^6	0,00
Hidrogel 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM	6,17	0,09	2×10^6	0,00
Hidrogel 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr	6,23	0,08	2×10^6	0,00

Fonte: Autor Próprio.

A viscosidade pode ser definida como a medida da resistência de um fluido ao escoamento (Singh *et al.*, 2022). Isso implica que fluidos com alta viscosidade apresentam maior resistência ao movimento. A avaliação desse parâmetro é essencial no desenvolvimento tecnológico, pois a viscosidade pode afetar diretamente a estabilidade física do sistema, influenciar o desempenho do hidrogel, a facilidade de espalhamento, a absorção, as características sensoriais e a finalidade de uso. Os hidrogéis de Carbopol® fornecem o máximo de ativo em meio alcalino devido ao inchaço dependente do pH, com menor inchaço em pH 1,2, aumentando conforme o aumento do pH, sendo maior inchaço em pH 7,4, devido à protonação de grupos $-\text{COO}^-$ em grupos $-\text{COOH}$ em ambiente ácido e à desprotonação de

grupos -COOH em grupos -COO em ambiente básico; em pH ácido, a alta concentração de -COOH aumenta as interações de ligação de hidrogênio e reduz a repulsão eletrostática, resultando em menor inchaço, enquanto em pH básico, a maior concentração de -COO aumenta a repulsão eletrostática e reduz as interações de ligação de hidrogênio, resultando em maior inchaço (Suhail; Wu; Minhas, 2020).

Ao analisar a Tabela 6, fica claro que a viscosidade das formulações permaneceu inalterada após a inclusão dos fotossensibilizadores, mantendo valores em torno de 2×10^6 cp. Esse resultado, aliado aos valores de pH obtidos, confirma a hipótese de que as variações no pH, mesmo refletindo a baixa concentração dos fotossensibilizadores, não afetaram as propriedades reológicas das formulações. Isso sugere que a adição dos fotossensibilizadores não comprometeu a integridade física e funcional dos géis, garantindo sua eficácia e aplicabilidade. A manutenção da viscosidade após a incorporação dos fotossensibilizadores indica que as formulações preservaram suas características físicas desejadas, essenciais para a estabilidade e desempenho do produto. Portanto, pode-se concluir que a preparação dos géis com fotossensibilizadores foi bem-sucedida, mantendo as propriedades reológicas estáveis.

5.5.2. Espalhabilidade

A espalhabilidade é um parâmetro crucial na avaliação da capacidade de um gel se distribuir uniformemente sobre a pele. Uma boa espalhabilidade da formulação tópica não apenas facilita uma aplicação mais eficiente e homogênea, mas também assegura que o produto cubra adequadamente áreas inflamatórias ou lesionadas (Mahdi *et al.*, 2021). Isso é particularmente importante em tratamentos dermatológicos, pois uma distribuição uniforme do gel pode otimizar a absorção dos ingredientes ativos, melhorar a eficácia terapêutica e proporcionar uma experiência de uso mais confortável para o paciente.

A espalhabilidade foi determinada utilizando 10 placas de vidro com massas próximas, aplicando peso ao gel por um intervalo de 1 min cada placa, sendo medido o diâmetro em mm^2 . A determinação dos resultados estão dispostos nas Tabelas 7, 8 e 9, separadas pelas três variações das concentrações dos fotossensibilizadores, $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM (HG₁); $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr (HG₂); $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM (HG₃); $25 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr (HG₄); $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM (HG₅); e $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr (HG₆).

O gráfico da Figura 26 demonstra visualmente a capacidade de extensão das formulações desenvolvidas. Pode ser observado aumento da espalhabilidade quando

comparado os hidrogéis com o aumento da concentração do FS. Sugere-se que o AM e o AM/AgNPr tenham interação físico-química com as cadeias poliméricas do hidrogel. O aumento ou redução da espalhabilidade está relacionada com essas forças intermoleculares. A viscosidade diminui quando aplicada com cisalhamento (pode ser devido ao comportamento pseudoplástico característico do gel), o que confirma a característica de alta espalhabilidade devido à diminuição da viscosidade ao aplicar uma certa força (Mahdi *et al.*, 2021).

Tabela 7 – Determinação de espalhabilidade dos hidrogéis Carbopol® 1% m/v incorporados com 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM (HG₁) e 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr (HG₂).

Placa	Massa da placa (g)	Massa total adicionada (g)	Área média (mm ²) (d ²) HG ₁	Ei (Y) médio (mm ²) HG ₁	Área média (mm ²) (d ²) HG ₂	Ei (Y) médio (mm ²) HG ₁
1	200	0	265	208	329	258
2	207,9	207,9	6.378	5.009	5.578	4.381
3	198,8	406,7	7.823	6.144	6.272	4.926
4	208,2	614,9	8.877	6.972	6.768	5.316
5	209,4	824,3	9.442	7.416	7.251	5.695
6	208,5	1.032,8	9.507	7.467	8.024	6.302
7	210	1.242,8	9.694	7.614	8.653	6.796
8	208,9	1.451,7	9.706	7.623	9.513	7.471
9	209,1	1.660,8	10.144	7.944	10.195	8.007
10	208,6	1.869,4	10.574	8.305	10.712	8.413

Fonte: Próprio autor.

Tabela 8 – Determinação de espalhabilidade dos hidrogéis Carbopol® 1% m/v incorporados com 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM (HG₃) e 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr (HG₄).

Placa	Massa da placa (g)	Massa total adicionada (g)	Área média (mm ²) (d ²) HG ₃	Ei (Y) médio (mm ²) HG ₁	Área média (mm ²) (d ²) HG ₄	Ei (Y) médio (mm ²) HG ₁
1	200	0	374	294	361	284
2	207,9	207,9	5.964	4.684	6.362	4.997
3	198,8	406,7	8.421	6.614	8.441	6.630
4	208,2	614,9	9.667	7.592	10.612	8.335
5	209,4	824,3	10.566	8.299	11.517	9.045
6	208,5	1.032,8	11.568	9.079	12.819	10.068
7	210	1.242,8	12.010	9.433	13.648	10.719
8	208,9	1.451,7	13.536	10.631	14.234	11.180
9	209,1	1.660,8	14.069	11.050	15.055	11.824
10	208,6	1.869,4	14.311	11.240	15.347	12.053

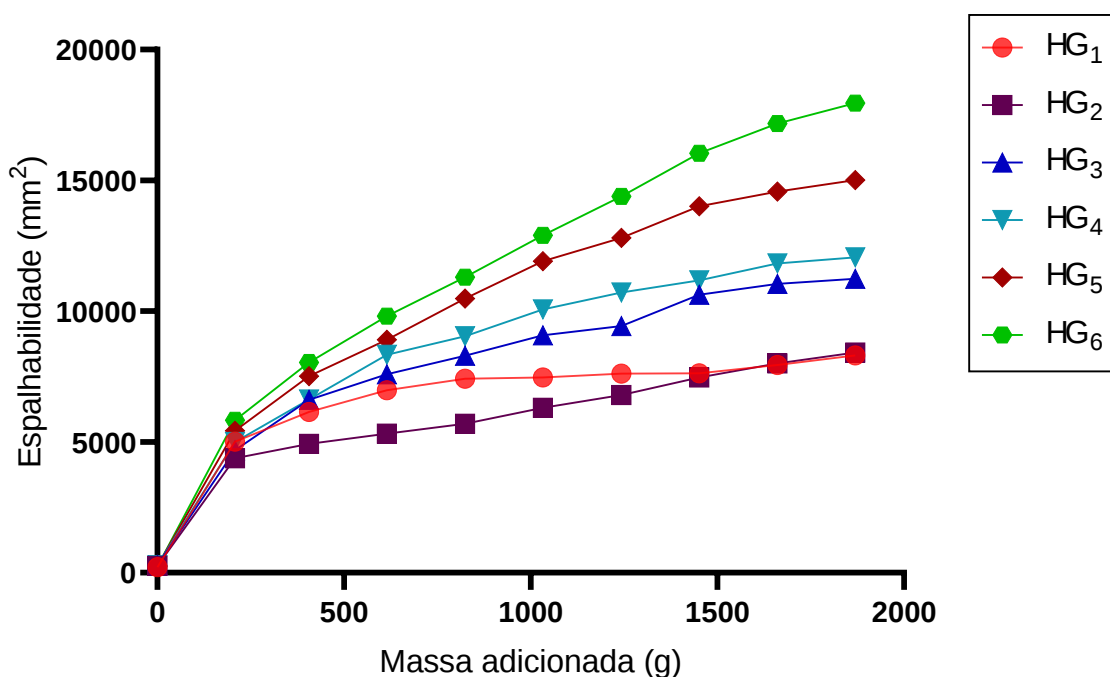
Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 – Determinação de espalhabilidade dos hidrogéis Carbopol® 1% m/v incorporados com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM (HG₅) e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr (HG₆).

Placa	Massa da placa (g)	Massa total adicionada (g)	Área média (mm ²) (d ²) HG ₅	Ei (Y) médio (mm ²) HG ₁	Área média (mm ²) (d ²) HG ₆	Ei (Y) médio (mm ²) HG ₁
1	200	0	336	264	310	244
2	207,9	207,9	6.905	5.423	7.418	5.826
3	198,8	406,7	9.563	7.511	10.231	8.036
4	208,2	614,9	11.340	8.906	12.489	9.809
5	209,4	824,3	13.352	10.487	14.383	11.297
6	208,5	1.032,8	15.172	11.916	16.426	12.901
7	210	1.242,8	16.294	12.798	18.322	14.390
8	208,9	1.451,7	17.842	14.013	20.418	16.036
9	209,1	1.660,8	18.561	14.578	21.870	17.177
10	208,6	1.869,4	19.118	15.015	22.861	17.955

Fonte: Próprio autor.

Figura 26 – Determinação da espalhabilidade dos hidrogéis Carbopol® 1% m/v incorporados aos FSs, os dados representam a média das análises (n=3).

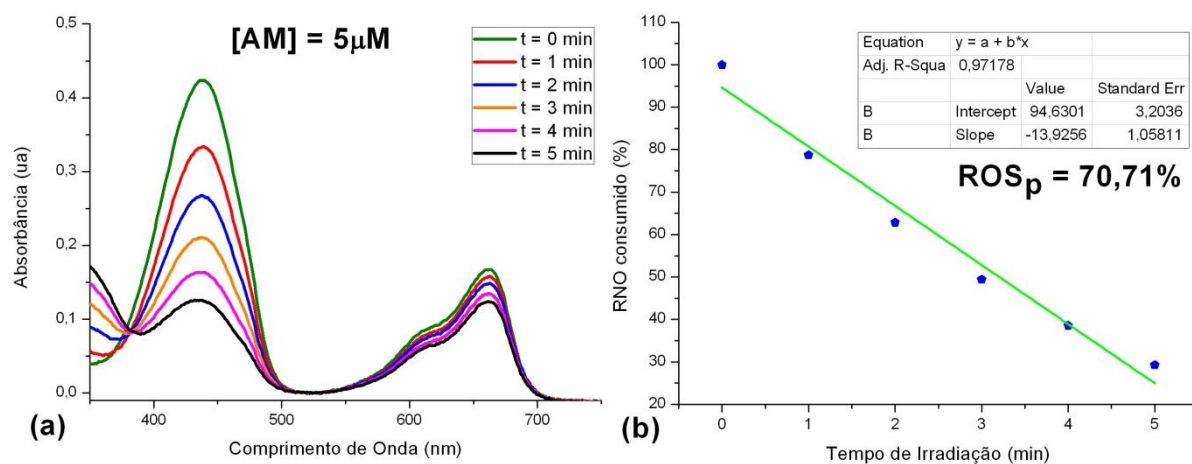


Fonte: Próprio autor.

5.6. PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada através do método indireto utilizando N,N-dimetil-4-nitrosoanilina (RNO). As propriedades ópticas dos fotossensibilizadores estão diretamente relacionadas à sua capacidade de gerar EROs. A Figura 27 ilustra a produção de EROs pelo AM, e pelo AM/AgNPr está ilustrado na Figura 28. Através deste método, observa-se que a formação de radicais livres pelos FSs podem ser estimadas pela diminuição do espectro de absorção característico do RNO, que apresenta um pico máximo em $\lambda = 460$ nm.

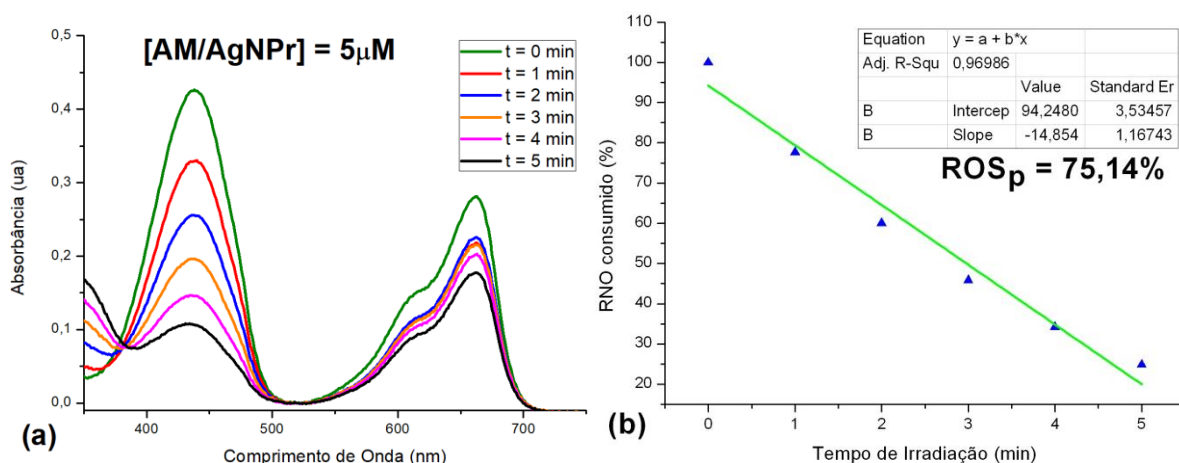
Figura 27 – Percentual de produção de espécies reativas de oxigênio do AM: (a) Espectroscopia de absorção analisando o decaimento do RNO a cada minuto durante 5 minutos de exposição a LED vermelho λ 660 nm, pela ação do AM na concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (b) Percentual de RNO consumido pelo tempo de irradiação em minutos, e percentual de produção de espécies reativas de oxigênio pela ação do FS AM ao RNO.



Fonte: Próprio autor.

Os resultados indicam que o azul de metileno (AM), Figura 27, apresentou uma produção de EROs de 70,71%, enquanto o conjugado de azul de metileno com nanopartículas de prata (AM/AgNPr), Figura 28, apresentou uma produção de EROs de 75,14%. O azul de metileno (AM) é um conhecido fotossensibilizador que, quando irradiado com luz de comprimento de onda apropriado, gera EROs eficientemente (Fabio *et al.*, 2023). A produção de 70,71% de EROs pelo AM indica uma alta eficácia do fotossensibilizador na geração dessas espécies, que são cruciais para aplicações fotodinâmicas. O conjugado AM/AgNPr mostrou uma produção de EROs de 75,14%, um aumento em relação ao AM isolado.

Figura 28 – Percentual de produção de espécies reativas de oxigênio do AM/AgNPr: (a) Espectroscopia de absorção analisando o decaimento do RNO a cada minuto durante 5 minutos de exposição a LED vermelho λ 660 nm, pela ação do AM/AgNPr na concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$; (b) Percentual de RNO consumido pelo tempo de irradiação em minutos, e percentual de produção de espécies reativas de oxigênio pela ação do FS AM/AgNPr ao RNO.



Fonte: Próprio autor.

Os nanoprismas de prata (AgNPr) podem amplificar a geração de EROs através do efeito de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). A presença de AgNPr pode intensificar o campo eletromagnético local ao redor das moléculas de AM (Da Silva *et al.*, 2020). Este efeito ocorre devido à amplificação do campo eletromagnético nas proximidades das nanopartículas metálicas, aumentando a eficiência do processo de transferência de energia e a geração de EROs (Amirjani *et al.*, 2023). A interação entre o AM e as AgNPr pode proporcionar um ambiente mais favorável para a transferência de energia (Da Silva *et al.*, 2020), aumentando a eficiência da fotossensibilização. As nanopartículas podem atuar como doadoras ou receptoras de energia, facilitando a geração de EROs.

Os resultados apresentados, com 75,14% de produção de EROs para o AM/AgNPr em comparação aos 70,71% do AM isolado, sugerem que a conjugação com nanopartículas de prata pode potencializar a eficácia do azul de metileno como fotossensibilizador. Este incremento na produção de EROs é particularmente relevante para aplicações em terapia fotodinâmica (PDT), onde a geração eficiente de espécies reativas de oxigênio é crucial para a inativação de células patogênicas ou cancerígenas. Além disso, é importante notar que a metodologia utilizada, baseada no método indireto do RNO, permite uma avaliação confiável da capacidade dos fotossensibilizadores em gerar EROs. A diferença percentual observada

entre o AM e o AM/AgNPr, embora não muito grande, é significativa e indica que a conjugação com nanopartículas de prata pode ser uma estratégia viável para aumentar a eficiência de fotossensibilizadores em aplicações biomédicas.

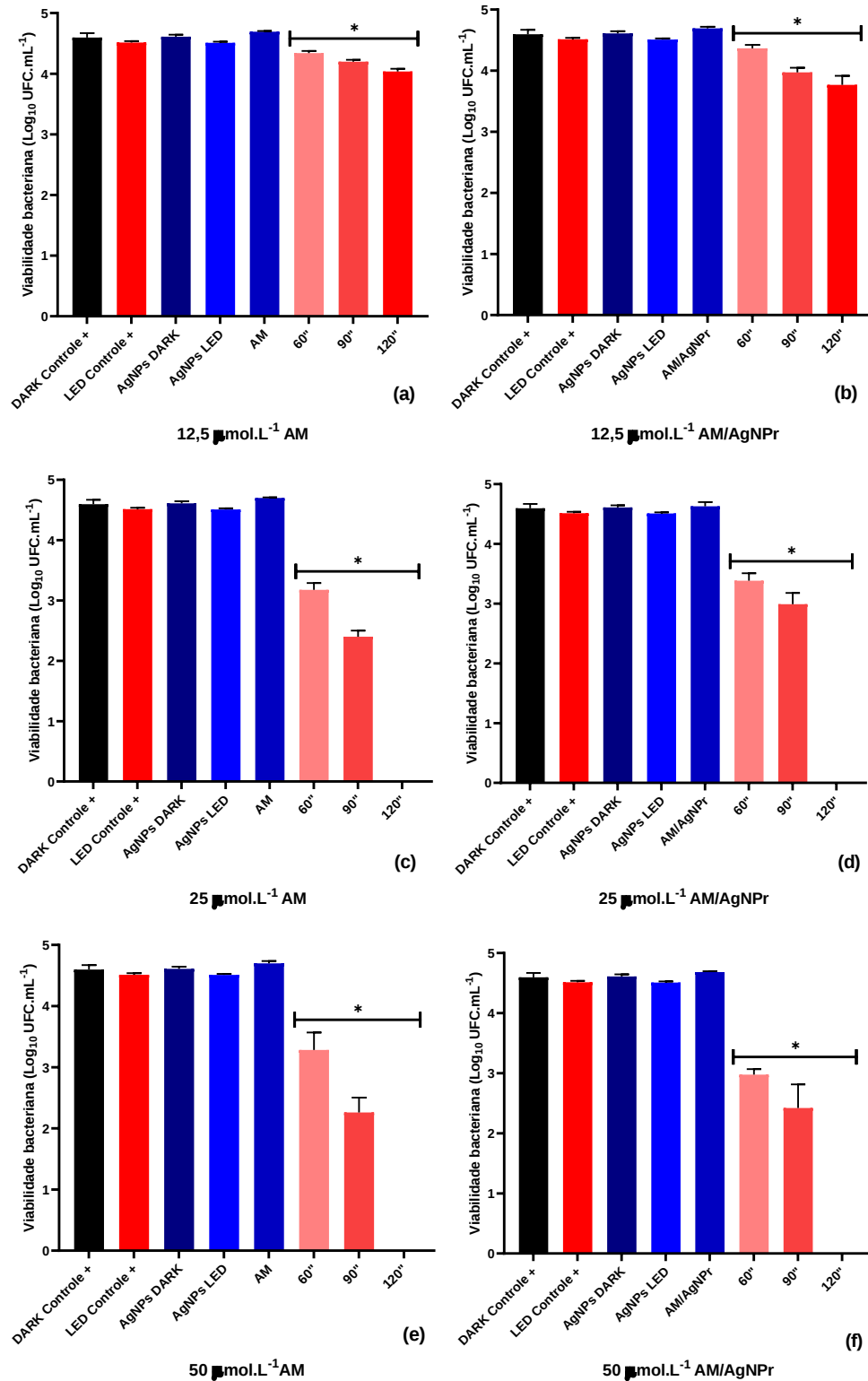
5.7. INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA (IFD)

5.7.1. IFD *Staphylococcus aureus*

A inativação fotodinâmica do *Staphylococcus aureus* foi realizada utilizando dois FS em hidrogel, AM e AM/AgNPr. Cada FS foi aplicado em três concentrações, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A IFD foi então realizada para cada uma das amostras contra o microrganismo em PBS, em períodos de 60, 90 e 120 s. Foi observado que os FSs nas concentrações 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, não foram capazes de inibir totalmente o crescimento das colônias de *S. aureus*. No entanto, nas concentrações 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi observado uma total inibição do crescimento de colônias em 120 s, com 50% da irradiância do LED vermelho em 660 nm, utilizando apenas 2,08 J.cm^{-2} em dose de luz. A Figura 29 mostra o perfil de inativação fotodinâmica de *Staphylococcus aureus* NTCC 12973 utilizando AM em solução e conjugados AM/AgNPr, sob irradiação de luz vermelha (22,94 mW.cm^{-2} - 50% de irradiância) em períodos de 60, 90 e 120 s (dose de luz de 1,04, 2,00 e 2,08 J.cm^{-2} , respectivamente). Os resultados estão dispostos como média $\pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos independentes ($n = 3$) * $p < 0,05$.

Em um estudo de IFD, Rodrigues *et al.* (2021) demonstraram que a aplicação de conjugados de AgNPr–MB resultou em uma redução bacteriana de 2 log após 3 minutos de irradiação, em comparação com o grupo de controle. Além disso, no tratamento de *S. aureus* utilizando os conjugados e 6 minutos de irradiação, foi obtida uma inativação total. Em contraste, ao usar apenas MB, a redução bacteriana foi inferior a 0,5 log, evidenciando a eficácia da combinação de MB e AgNPr3 para a inativação bacteriana (Rodrigues *et al.*, 2021). Em outro estudo Parasuraman *et al.* (2020) investigou a atividade antimicrobiana do AM livre e do AM/AgNPs com irradiação de luz pelo método de contagem de colônias.

Figura 29 – IFD de cepas *Staphylococcus aureus* utilizando diferentes concentrações de azul de metileno (AM) e conjugados (AM/AgNPr) (a) 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM; (b) 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr; (c) 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM; (d) 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr; (e) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM; (f) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr.



Fonte: Próprio autor.

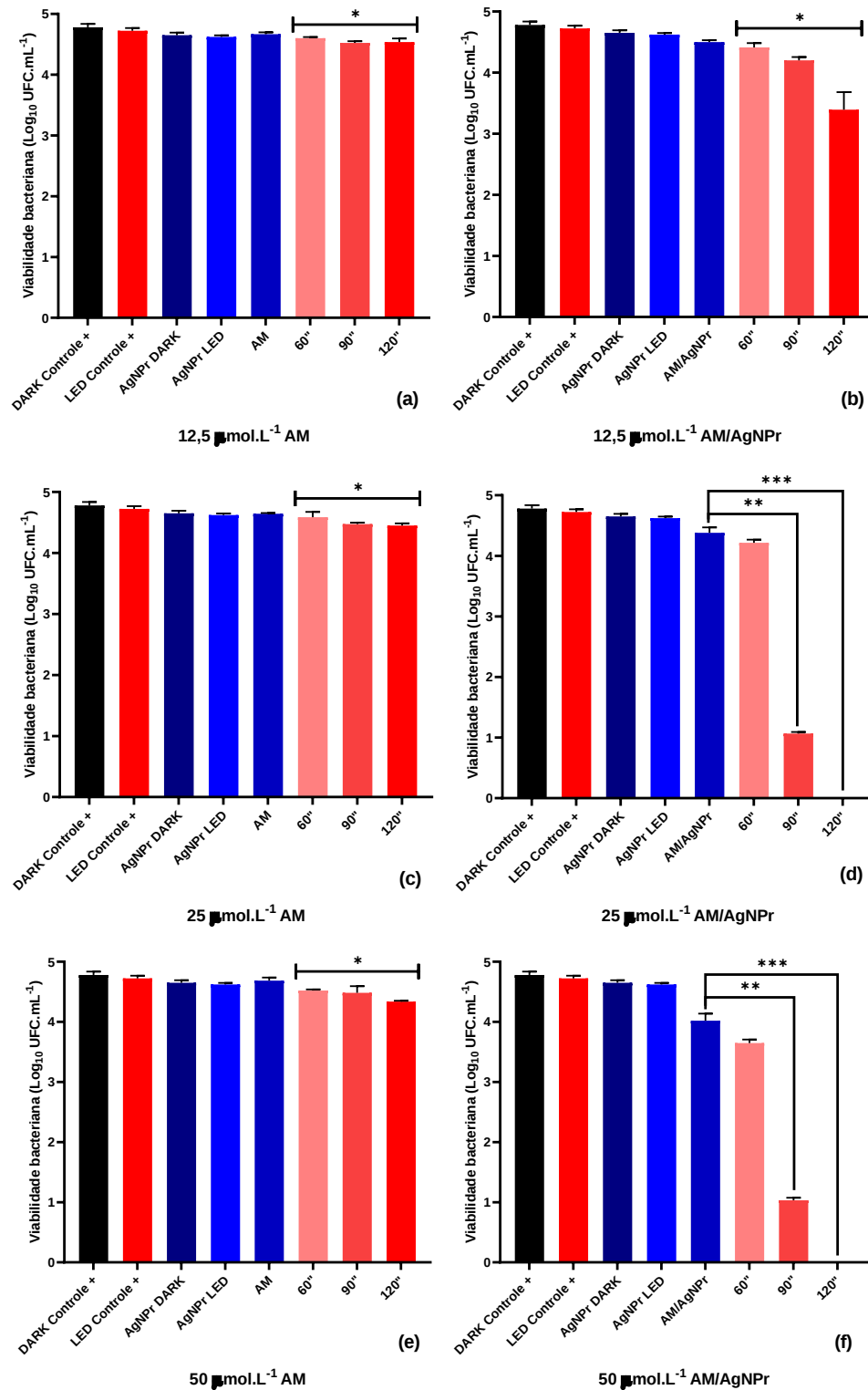
O tratamento com AM/AgNPr mostrou uma redução de 5- $\log_{10}$ nas células de *S. aureus* após a aPDT, enquanto apenas uma redução de 1,2- $\log_{10}$ foi observada com o AM livre. Foi observada atividade antimicrobiana aumentada com AM/AgNPr após fotoativação em comparação com o AM livre (Parasuraman *et al.*, 2020). Um estudo com AM livre e associado ao antibacteriano Gentamicina, mostra atividade bactericida em culturas planctônicas de *S. aureus* (Pérez-Laguna *et al.*, 2020).

5.7.2. IFD *Pseudomonas aeruginosa*

A inativação fotodinâmica da *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada utilizando dois FS em hidrogel, AM e AM/AgNPr. Cada FS foi aplicado em três concentrações, 12,5, 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A IFD foi então realizada para cada uma das amostras contra o microrganismo em PBS, em períodos de 60, 90 e 120 s. Foi observado que ambos FSs nas concentrações 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, não foram capazes de inibir totalmente o crescimento das colônias de *P. aeruginosa*, bem como o FS AM nas demais concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. No entanto, o FS AM/AgNPr nas concentrações 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foi observado uma queda considerável no crescimento das colônias já em 90 s de exposição a luz vermelha e uma total inibição do crescimento de colônias em 120 s, com 50% da irradiância do LED vermelho em 660 nm, utilizando apenas 2,08 J.cm^{-2} em dose de luz. A Figura 30 mostra o perfil de inativação fotodinâmica de *Pseudomonas aeruginosa* NTCC 12903 utilizando AM e conjugados AM/AgNPr, sob irradiação de luz vermelha (22,94 mW.cm^{-2} - 50% de irradiância) em períodos de 60, 90 e 120 s (dose de luz de 1,04, 2,00 e 2,08 J.cm^{-2} , respectivamente). Os resultados estão dispostos como média $\pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos independentes ($n = 3$) * $p < 0,05$ vs. grupo controle. **, $p < 0,05$ vs. irradiação LED por 90 s. ***, $p < 0,05$ vs. irradiação LED por 120 s.

Parasuraman *et al.* (2020) avaliou também a atividade antimicrobiana do AM livre e do AM/AgNPr com irradiação de luz pelo método de contagem de colônias para *P. aeruginosa*. O tratamento com AM/AgNPr exibiu uma redução de 4,3- $\log_{10}$ UFC/mL nas células de *P. aeruginosa* após fotoativação, enquanto as células tratadas com AM livre mostraram uma redução de 1,1- $\log_{10}$. Uma maior atividade antimicrobiana foi observada com AM/AgNPr após fotoativação em comparação com o AM livre (Parasuraman *et al.*, 2020). Outro estudo com AM livre e associado ao antibacteriano Gentamicina mostra atividade bactericida em culturas planctônicas de *P. aeruginosa*, e em biofilmes (Pérez-Laguna *et al.*, 2020).

Figura 30 – IFD de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando diferentes concentrações de azul de metileno (AM) e conjugados (AM/AgNPr) (a) 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM; (b) 12,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr; (c) 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM; (d) 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr; (e) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM; (f) 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ AM/AgNPr.



Fonte: Próprio autor.

Um estudo mostra que a IFD por AM é eficaz, porém é necessário altas doses de luz e longos períodos de exposição. Foi utilizada irradiação com laser de diodo de 635 nm em potências de 300 mW/cm² e 250 mW/cm². A redução foi significativa de *P. aeruginosa* a 250 mW/cm²: 2,15 log₁₀ a 60 J/cm² após 240 s; 2,71 log₁₀ a 75 J/cm² após 300 s; e 3,48 log₁₀ a 90 J/cm² após 360 s de excitação do AM. A diminuição máxima em UFC foi a 300 mW/cm²: 2,54 log₁₀ a 72 J/cm²; 4,32 log₁₀ a 90 J/cm² e 108 J/cm² (Zada *et al.*, 2024). Mostrando a alta eficiência da IFD com AM/AgNPr contra *P. aeruginosa* em comparação ao AM livre.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6. CONCLUSÃO

Os resultados da caracterização dos nanoprismas de prata (AgNPr) demonstram a sua adequação para aplicações fotodinâmicas, especialmente pela sobreposição significativa entre a banda de plásmon dos AgNPr e a região de absorção do fotossensibilizador azul de metileno. A análise espectroscópica UV-Vis revelou que as amostras AgNPr₁ e AgNPr₂ apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ em 642 nm e 671 nm, respectivamente, alinhando-se bem com o perfil de absorbância do azul de metileno. O potencial zeta das amostras, com valores muito negativos, indica uma grande estabilidade coloidal, reforçando a eficácia do revestimento com cadeias PSSS. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram partículas de diferentes morfologias, mas com uma espessura média fina de 4 ± 1 nm, sugerindo uma distribuição uniforme e adequada para as aplicações pretendidas.

Os resultados da caracterização óptica dos sistemas de azul de metileno com nanoprismas de prata (AM/AgNPr) revelam diferenças significativas em comparação ao azul de metileno isolado. Na espectroscopia de absorção UV-Vis, observou-se que o AM/AgNPr apresentou uma absorbância levemente maior, mantendo o pico característico de absorção em torno de 664 nm, atribuída à ressonância plasmônica de superfície localizada das nanoprismas de prata, que intensifica a absorção do AM. Na espectroscopia de emissão, o AM/AgNPr mostrou alterações significativas nos espectros de emissão, sugerindo interações entre o corante e os nanoprismas. A presença de AgNPr pode aumentar a intensidade de emissão do AM através do efeito de aumento de campo plasmônico, mas também pode causar quenching da fluorescência devido à transferência não radiativa de energia para os nanoprismas. Estes achados indicam que os sistemas AM/AgNPr possuem propriedades ópticas aprimoradas, com potencial para aplicações fotodinâmicas.

Os resultados de FTIR demonstram claramente a associação eficaz das moléculas de AM aos nanoprismas de prata (AgNPr). As interações moleculares são evidentes pelo deslocamento das bandas vibracionais e pela presença das bandas características tanto do MB quanto do PSSS nos espectros dos sistemas. Esta associação é crucial para as propriedades funcionais dos sistemas, especialmente para aplicações fotodinâmicas onde a interação entre o fotossensibilizador e os nanoprismas de prata pode potencializar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), aumentando a eficácia do tratamento.

Os hidrogéis desenvolvidos apresentaram estabilidade macroscópica ao longo do tempo, sem separação de fases, mesmo após a incorporação de fotossensibilizadores, indicando uma boa compatibilidade entre os componentes. As formulações contendo azul de metileno e a combinação de azul de metileno com nanoprismas de prata exibiram coloração azul intensa e homogênea, refletindo uma distribuição uniforme dos fotossensibilizadores. A caracterização físico-química revelou que o pH das formulações estava dentro da faixa adequada para uso tópico, garantindo a estabilidade do gel e a manutenção da barreira cutânea. A viscosidade permaneceu consistente após a adição dos fotossensibilizadores, indicando que as propriedades reológicas dos géis foram preservadas. A espalhabilidade dos hidrogéis aumentou com a concentração dos fotossensibilizadores, sugerindo uma interação físico-química favorável com as cadeias poliméricas do hidrogel. Esses resultados confirmam a eficácia e a aplicabilidade das formulações, mantendo suas propriedades físicas e químicas estáveis, essenciais para o desempenho terapêutico.

A produção de EROs pelo AM/AgNPr ser maior que pelo AM isolado destaca a importância da interação entre fotossensibilizadores e nanopartículas metálicas. Esta interação não só melhora a eficiência da produção de EROs, mas também abre novas perspectivas para o desenvolvimento de sistemas fotodinâmicos mais eficazes. A associação com AgNPs potencializa o desempenho do AM, tornando-o uma opção promissora para futuras aplicações em PDT e outras áreas que se beneficiam da geração controlada de EROs.

O uso de fotossensibilizadores em hidrogel, tanto AM quanto AM/AgNPr, é eficaz na inativação de *S. aureus* em concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com uma dose de luz de 2,08 J.cm^{-2} em 120 segundos. Especificamente o conjugado AM/AgNPr, é altamente eficaz na inativação de *P. aeruginosa* nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ com uma dose de luz de 2,08 J.cm^{-2} em 120 segundos. A combinação de AM com nanopartículas de prata oferece uma vantagem significativa, demonstrando um efeito sinérgico que aumenta a produção de EROs e melhora a interação com a bactéria, resultando em uma inativação mais eficiente. Este estudo destaca a importância de otimizar tanto a concentração dos FS quanto os parâmetros de irradiação para maximizar a eficácia da terapia fotodinâmica, especialmente contra patógenos resistentes como *P. aeruginosa*.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos até agora com os conjugados de azul de metileno e nanopartículas de prata (AM/AgNPs) abrem diversas possibilidades para o avanço no tratamento de saúde, especialmente na terapia fotodinâmica (PDT) e outras aplicações médicas. Com base nos achados, podemos delinear várias direções promissoras para futuras pesquisas e desenvolvimentos.

- ✚ Explorar diferentes concentrações de fotossensibilizadores (FS) e doses de luz para maximizar a eficiência terapêutica. Estudos adicionais podem identificar as condições ideais para diversos tipos de patógenos e células cancerígenas, garantindo uma abordagem personalizada e eficaz.
- ✚ Investigação mais aprofundada da eficácia do AM/AgNPr contra outros patógenos multirresistentes além de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Isso inclui testes com uma gama mais ampla de bactérias e outros microrganismos patogênicos, visando desenvolver protocolos de tratamento robustos e abrangentes.
- ✚ Estudar os mecanismos detalhados pelos quais a associação de AM com AgNPr aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Compreender melhor esses processos podem levar à otimização das propriedades dos fotossensibilizadores e à maximização da eficácia da TFD.
- ✚ Continuar a melhorar as formulações de hidrogéis contendo AM e AM/AgNPr, garantindo estabilidade a longo prazo, distribuição uniforme dos fotossensibilizadores e manutenção das propriedades físico-químicas favoráveis.
- ✚ Desenvolver estratégias para a inativação de patógenos em superfícies e instrumentos médicos utilizando AM/AgNPr. Esse enfoque pode ajudar a reduzir infecções hospitalares e melhorar a segurança em ambientes clínicos.
- ✚ Estabelecer protocolos específicos para a utilização de AM/AgNPr em desinfecção de feridas, equipamentos médicos e áreas de alto risco de contaminação.

Os sistemas de azul de metileno com nanoprismas de prata (AM/AgNPr) apresentam um potencial significativo para revolucionar tratamentos fotodinâmicos e outras terapias médicas. Com pesquisas contínuas e desenvolvimento, esses sistemas podem se tornar uma ferramenta vital na luta contra infecções resistentes, câncer e outras condições de saúde.

REFERÊNCIAS

Aherne, D. *et al.* Optical Properties and Growth Aspects of Silver Nanoprisms Produced by a Highly Reproducible and Rapid Synthesis at Room Temperature. **Advanced Functional Materials**, v. 18, n. 14, p. 2005–2016, 23 jul. 2008.

Amirjani, A. *et al.* Plasmon-enhanced nano-photosensitizers: game-changers in photodynamic therapy of cancers. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 11, n. 16, p. 3537–3566, 26 abr. 2023.

Andrade, B. T. N. C.; Bezerra, A. C. Da S.; Calado, C. R. Adding value to polystyrene waste by chemically transforming it into sulfonated polystyrene. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 24, p. e12417, 16 set. 2019.

Aoki, P. H. B. *et al.* Study of the interaction between cardiolipin bilayers and methylene blue in polymer-based Layer-by-Layer and Langmuir films applied as membrane mimetic systems. **Vibrational Spectroscopy**, A Selection of Papers Presented at the 1st Brazilian Meeting on Raman Spectroscopy (BMRS-1). v. 54, n. 2, p. 93–102, 18 nov. 2010.

Aroso, R. T. *et al.* Photodynamic disinfection and its role in controlling infectious diseases. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 20, n. 11, p. 1497–1545, nov. 2021.

Behzadi, P.; Baráth, Z.; Gajdács, M. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antibiotics**, v. 10, n. 1, p. 42, 4 jan. 2021.

Belekov, E. *et al.* Improved antimicrobial properties of methylene blue attached to silver nanoparticles. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, p. 102012, dez. 2020.

Bergmann, K.; O'Konski, C.T. A Spectroscopic Study of Methylene Blue Monomer, Dimer and Complexes With Montmorillonite. Vol. 67. P. 2169-2177. Califórnia, 1963.

Bettanin, F.; Coutinho-Neto, M.D.; Homem-de-Mello, P. Estudo teórico sobre a formação de dímeros de azul de metileno. **34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

Borghetti, G. S.; Knorst, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Rio Grande do Sul, v. 42, n. 4, p.531-537, 2006.

Brongersma, M. L.; Shalaev, V. M. The Case for Plasmonics. **Science Magazine**, v. 328, ed. 5977, p. 440-441, 2010.

Calienni, M. N. *et al.* Rheological and Viscoelastic Analysis of Hybrid Formulations for Topical Application. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 10, p. 2392, 27 set. 2023.

Caruso, G. R. *et al.* Phenothiazinium Photosensitizers Associated with Silver Nanoparticles in Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 569, 12 maio 2021.

Cascone, S.; Lamberti, G. Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 573, p. 118803, 5 jan. 2020.

Clément, S.; Winum, J.-Y. Photodynamic therapy alone or in combination to counteract bacterial infections. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2024.

Corrêa, N. F. Estudo de propriedades ópticas de colóides de nanopartículas de prata dispersa em BMLBF4. 2017. 60 f. **Tese (Doutorado em Materiais) - Centro de Tecnologia**, Universidade Federal de Alagoas, Maceió - AL.

Correia, J. H. *et al.* Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1332, 25 ago. 2021.

Das, B.; Nayak, A. K.; Nanda, U. Topical gels of lidocaine HCl using cashew gum and Carbopol 940: Preparation and in vitro skin permeation. *International Journal of Biological Macromolecules*, India, n. 62, p.514-517, 2013.

Da Silva, R. T. P. *et al.* Excitação de plasmon de luz visível de nanopartículas de prata contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101908, 1 set. 2020.

Demidova, T.N.; Hamblin, M.R. Photodynamic inactivation of *Bacillus* spores, mediated by phenothiazinium dyes. **Appl Environ Microbiol.** 2005;71(11):6918-6925. doi:10.1128/AEM.71.11.6918-6925.2005 72.

Doleżych-Teister, H. *et al.* Photodynamic therapy as alternative therapy for prostate cancer and colorectal carcinoma as well as an antimicrobial treatment – a systematic review. v. 6, n. 1, 2020.

Fabio, G. B. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy and the advances impacted by the association with nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 80, p. 104147, fev. 2023.

Fernández-Pérez, A.; Marbán, G. Visible Light Spectroscopic Analysis of Methylene Blue in Water; What Comes after Dimer? **ACS Omega**, 2020. 5, (46), 29801-29815. DOI: 10.1021/acsomega.0c03830

Florence, N.; Naorem, H. Dimerization of methylene blue in aqueous and mixed aqueous organic solvent: A spectroscopic study. **Journal of Molecular Liquids**, 2014. 198. 255-258. 10.1016/j.molliq.2014.06.030.

Firdhouse, M. J.; Lalitha, P. Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications. **Journal of Nanotechnology**. n.10, p. 18, 2015.

Firlar, I. *et al.* Functional Hydrogels for Treatment of Chronic Wounds. **Gels**, v. 8, n. 2, p. 127, fev. 2022.

Gabrielli, D. *et al.* Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, n. 3, p. 227–232, 2004.

Galo, Í. D. C. *et al.* The ineffectiveness of antimicrobial photodynamic therapy in the absence of preincubation of the microorganisms in the photosensitizer. **Fisioterapia em Movimento**, v. 33, p. e003304, 2020.

Gunaydin, G.; Gedik, M. E.; Ayan, S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, 10 jun. 2021.

Hileuskaya, K. *et al.* Aspects of the interaction of pectin-coated Ag nanoparticles with methylene blue with regard to photodynamic applications. **Materials Today Communications**, v. 35, p. 105597, jun. 2023.

Hou, W.; Cronin, S. B. A Review of Surface Plasmon Resonance-Enhanced Photocatalysis. **Adv Funct Mater.** v. 23, n. 13, p.1612-1619, 2013.

Hu, X. *et al.* Synergistic antibacterial strategy based on photodynamic therapy: Progress and perspectives. **Chemical Engineering Journal**, v. 450, p. 138129, 15 dez. 2022.

Iravani, S. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 9, n. 6, p. 385-406, 2014.

Jesus, V. P. S. *et al.* Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, p. 212–217, set. 2018.

Jin, Y. *et al.* Gold nanorods embedded in a matrix of methylene blue as an improved platform for photodynamic inactivation of cancer cells. **Materials Science and Engineering: C**, v. 124, p. 1-8, 2021.

Kobayashi, H.; Choyke, P. L. Near-Infrared Photoimmunotherapy of Cancer. **Accounts of Chemical Research**, v. 52, n. 8, p. 2332–2339, 20 ago. 2019.

Kumar, M.; Mandal, U. K.; Mahmood, S. Chapter 20 - Dermatological formulations. Em: NAYAK, A. K.; SEN, K. K. (Eds.). **Dosage Forms, Formulation Developments and Regulations**. [s.l.] Academic Press, 2024. p. 613–642.

Labie, H.; Blanzat, M. Hydrogels for dermal and transdermal drug delivery. **Biomaterials Science**, v. 11, n. 12, p. 4073–4093, 13 jun. 2023.

Law, S. K.; Leung, A. W. N.; Xu, C. Photodynamic Action of Curcumin and Methylene Blue against Bacteria and SARS-CoV-2—A Review. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 1, p. 34, 25 dez. 2023.

Leung, W. K. *et al.* Gold nanoparticle–methylene blue conjugates show efficient antibacterial effects against Gram-positive and Gram-negative pathogens. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 24, p. 1-13, 2020.

Li, J. *et al.* Plasmonic metal nanostructures for efficient conversion of solar to chemical energy. **Nature Reviews Materials**, v. 4, n. 8, p. 1-20, 2019.

Li, Z.; Wang, C.-J.; Jiang, W.-T. Intercalation of Methylene Blue in a High-Charge Calcium Montmorillonite — An Indication of Surface Charge Determination. **Adsorption Science & Technology**, v. 28, n. 4, p. 297–312, 1 abr. 2010.

Linger, C.; Lancel, M.; Port, M. Evaluation of relative efficiency of PDT photosensitizers in producing hydroxyl radicals and singlet oxygen in aqueous media using a UV–visible spectroscopy pNDA dosage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 241, p. 112664, 1 abr. 2023.

Lukić, M.; Pantelić, I.; Savić, S. D. Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products. **Cosmetics**, v. 8, n. 3, p. 69, set. 2021.

Mahdi, W. A. *et al.* Formulation and Optimization of Butenafine-Loaded Topical Nano Lipid Carrier-Based Gel: Characterization, Irritation Study, and Anti-Fungal Activity. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 7, p. 1087, jul. 2021.

Menegotto, T. Estudo das Ressonâncias de Plasmon em filmes silicatos com nanopartículas de Ag interagentes. 2011. 127 f. **Tese (Doutorado em Microeletônica)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Meerovich, G. A. *et al.* Photodynamic inactivation of bacteria: Why it is not enough to excite a photosensitizer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 44, p. 103853, 1 dez. 2023.

Mikušová, V. *et al.* Comparative Study of Polysaccharide-Based Hydrogels: Rheological and Texture Properties and Ibuprofen Release. **Gels**, v. 8, n. 3, p. 168, 7 mar. 2022.

Millstone, J. E. *et al.* Colloidal Gold and Silver Triangular Nanoprisms. **Small**, v. 5, n. 6, p. 646–664, 2009.

Miranda, R. R.; Sampaio, I.; Zucolotto, V. Exploring silver nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. Volume 210, 2022.

Monteiro, J. S. C.; Rangel, E. E.; Oliveira, S. C. P. S. Enhancement of Photodynamic Inactivation of Planktonic Cultures of *Staphylococcus aureus* by DMMB-AuNPs. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy**. 2020. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101930 73.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.** 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

M., T. R. *et al.* Hydrogels the three dimensional networks: a review. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, p. 12–17, 15 jan. 2021.

Mulani, M. S. *et al.* Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 539, 1 abr. 2019.

Mustafa, B.-. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and a Multi-Pronged Approach to Combat its Infection in Veterinary Science and Public Health: A Review. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 26, n. 01, p. 1–8, 1 jul. 2021.

Netto-Ferreira, J.C. Reações Catalíticas Empregando o Efeito Plasmônico de Nanopartículas Metálicas Suportadas. **Rev. Virtual Quim.**, v.7, n. 1, p.165-217, 2015.

Niculescu, A.-G.; Grumezescu, A. M. Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review. **Applied Sciences**, v. 11, n. 8, p. 3626, 17 abr. 2021.

Optical Properties of Methylene Blue. Em: Chu, M. (Ed.). **Biomaterials for Modern Cancer Imaging and Therapies**. [s.l.] WORLD SCIENTIFIC, 2023. p. 1–17.

Ovchinnikov, O. V. *et al.* Manifestation of intermolecular interactions in FTIR spectra of methylene blue molecules. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 181–189, 1 set. 2016.

Parasuraman, P. *et al.* Biogenic Silver Nanoparticles Decorated with Methylene Blue Potentiated the Photodynamic Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 709, 29 jul. 2020.

Pérez-Laguna, V. *et al.* Photodynamic therapy using methylene blue, combined or not with gentamicin, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101810, 1 set. 2020.

Pucelik, B.; Dąbrowski, J. M. Photodynamic inactivation (PDI) as a promising alternative to current pharmaceuticals for the treatment of resistant microorganisms. Em: **Advances in Inorganic Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2022. v. 79p. 65–108.

Ribeiro, J. O. *et al.* Nanoparticles as antimicrobial agents: a nanobiotechnological approach. **European Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. 2, p. 89-101, 2018.

Rodrigues, C. H. *et al.* Methylene blue@silver nanoprisms conjugates as a strategy against *Candida albicans* isolated from balanoposthitis using photodynamic inactivation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 46, p. 104066, abr. 2024.

Rodrigues, C. H. *et al.* Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, p. 102315, jun. 2021.

Shleeve, M.; Savitsky, A.; Kaprelyants, A. Photoinactivation of mycobacteria to combat infection diseases: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 10, p. 4099–4109, maio 2021.

Siafaka, P. I. *et al.* **Polymer based Gels: Recent and Future Applications in Drug Delivery Field.** Text. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cdd/2023/00000020/00000009/art00007>>. Acesso em: 4 maio. 2024.

Silva, A. G.; M. Rodrigues, T. S.; Wang, J. The Fault in Their Shapes: Investigating the Surface-Plasmon-Resonance-Mediated Catalytic Activities of Silver Quasi-Spheres, Cubes, Triangular Prisms, and Wires. **Langmuir**. v. 31, n. 37 p. 10272-10278, 2015.

Simões, M. L.; Junqueira, J. C.; Romero, R. S. Microbiologia e Micologia Humana. **Guanabara Koogan**, 2018.

Singh, P. *et al.* A comprehensive review on MEMS-based viscometers. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 338, p. 113456, 1 maio 2022.

Soares, J. M. *et al.* Physicochemical mechanisms of bacterial response in the photodynamic potentiation of antibiotic effects. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 21146, 7 dez. 2022.

Stolik, S. *et al.* Measurement of the penetration depths of red and near infrared light in human “ex vivo” tissues. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 57, n. 2, p. 90–93, 1 set. 2000.

Suhail, M.; Wu, P.-C.; Minhas, M. U. Using Carbomer-Based Hydrogels for Control the Release Rate of Diclofenac Sodium: Preparation and In Vitro Evaluation. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 399, nov. 2020.

Taldaev, A. *et al.* Methylene blue in anticancer photodynamic therapy: systematic review of preclinical studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1264961, 28 set. 2023.

Tong, S. Y. C. *et al.* Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

Tortora, G. J. *et al.* Microbiologia. **Artmed Editora**, 2010.

Usacheva, M. N.; Teichert, M. C.; Biel, M. A. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 2003;71(1-3):87-98. doi:10.1016/j.jphotobiol.2003.06.002

Willis, J. A. *et al.* Photodynamic viral inactivation: Recent advances and potential applications. **Applied Physics Reviews**, v. 8, n. 2, p. 021315, 1 jun. 2021.

Youf, R. *et al.* Antimicrobial Photodynamic Therapy: Latest Developments with a Focus on Combinatory Strategies. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 1995, 24 nov. 2021.

Younis, M. R. *et al.* Inorganic Nanomaterials with Intrinsic Singlet Oxygen Generation for Photodynamic Therapy. **Advanced Science**, v. 8, n. 21, p. 2102587, nov. 2021.

Zanin, S. M. W. *et al.* Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 2, n. 2, p.47-58, 2001.

Zhang, D. *et al.* Preparation, characterization, and application of electrochemically functional graphene nanocomposites by one-step liquid-phase exfoliation of natural flake graphite with methylene blue. **Nano Research**, v. 5, n. 12, p. 875–887, 1 dez. 2012.