

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Departamento de Farmacociências

Curso de Bacharelado em Química Medicinal

Júlia Lazzarini Machado

**Desenvolvimento de filme fotossensibilizador 3D impresso a partir de
nanopartículas de ouro decoradas com porfirina**

Porto Alegre

2024

JÚLIA LAZZARINI MACHADO

Desenvolvimento de filme fotossensibilizador 3D impresso a partir de nanopartículas de ouro decoradas com porfirina

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química Medicinal da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Química Medicinal.

Orientador(a): Profa. Dra. Monique Deon

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Machado, Júlia

Desenvolvimento de filme fotossensibilizador 3D
impresso a partir de nanopartículas de ouro decoradas com
porfirina/ Júlia Machado. --2024.

333 f.

Orientador: Monique Deon.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto
Alegre, Bacharelado em Química Medicinal, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Nanopartículas de ouro 2. Porphirina 3. Terapia
Fotodinâmica 4. Manufatura Aditiva 5. Espécies reativas
de oxigênio. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Não posso começar a agradecer sem me direcionar aos meus pais, Nilvana e Ênio. Sem vocês, eu nada seria. Obrigada por, durante toda a minha vida, acreditarem plenamente em mim, por serem meus maiores incentivadores e minha torcida mais alta, por todo o esforço em me proporcionar uma educação de qualidade e por sempre priorizarem a minha felicidade. Vocês são meus maiores exemplos e minha motivação para sempre continuar. Divido esta e muitas outras conquistas que virão com vocês; sou muito sortuda em fazer parte da nossa família!

À Profa. Monique, minha orientadora não apenas neste trabalho, mas há mais de três anos na iniciação científica: Prof., é imensurável a admiração e gratidão que tenho por ti. Agradeço por todo o conhecimento agregado, todas as oportunidades que me proporcionaste e toda a dedicação e carinho que sempre tiveste comigo. Sou imensamente grata. Obrigada por tanto incentivo, compreensão e ajuda nesse caminho da graduação. Saiba que tu és uma pessoa muito importante na minha caminhada (da graduação e da vida)!

Agradeço à minha nona, que, apesar de hoje não estar mais fisicamente comigo, sempre será uma das pessoas mais especiais da minha vida. Muito do que sou hoje é consequência de quem ela foi. Espero um dia ser um terço da mulher maravilhosa que a Dona Iner foi. Obrigada por todo o amor, nona!

Aos amigos amados que fizeram parte dessa jornada comigo, desde os da escola, da faculdade, da vida: obrigada por sempre me apoiarem e me incentivarem a continuar. Em especial, agradeço aos amigos que fazem parte do meu dia a dia no laboratório; obrigada por tornarem meus dias mais leves e felizes e por fazerem com que minha jornada do TCC fosse tão mais tranquila. Obrigada, Ket, Flavinha, Ritinha, Felipe e Núbia, por todo o apoio científico e operacional, mas também por muito mais que isso. Dividir a jornada da ciência com vocês é sempre uma alegria (até quando não é).

Às amigas que a faculdade me proporcionou, Cami, Giu, Raí e Gi, agradeço a vocês por tornarem esses cinco anos mais leves, por dividirem angústias e compartilharem felicidades. Sorte a minha ter vocês para dividir essa caminhada.

À minha eterna família na capital, Manu e Tess, obrigada por terem sido meu porto seguro e por, durante esses cinco anos, terem sido meu lar na cidade grande. Sou muito feliz com o nosso eterno 504!

À Vidoca, por sempre ser um ombro amigo, por vibrar com as conquistas e por chorar todas as emoções junto; saber que tenho a ti torna a vida mais feliz!

Agradeço a todos os professores e técnicos da UFCSPA que, de uma maneira ou outra, fizeram parte da minha formação. Obrigada por tanto!

RESUMO

Porfirinas são importantes agentes fotossensibilizadores utilizados em terapia fotodinâmica contra o câncer pelas suas propriedades espectroscópicas que favorecem a produção de espécies reativas de oxigênio ativada por luz. Nanopartículas de ouro (AuNP) também possuem características optoeletrônicas únicas e podem ser decoradas com porfirinas, potencializando seus efeitos. Neste trabalho, a porfirina meso-tetra(4-sulfonato-fenil)porfirina-tetraamino (TPPS) foi utilizada para decorar AuNP estabilizada com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), beneficiando-se das interações eletrostáticas entre a nanopartícula carregada positivamente e o caráter aniônico da TPPS. O intuito foi de estudar esta combinação para obter um nanomaterial fotoativo, com propriedades pró-oxidantes para futura avaliação em tratamentos de câncer de pele do tipo melanoma. Este sistema foi analisado quanto às características espectroscópicas dos componentes, à carga superficial da AuNP e AuNP@TPPS e medidas indiretas de capacidade oxidante por ensaio adaptado de inibição da capacidade antioxidante do ácido ascórbico pelo método DPPH. A dispersão de AuNP@TPPS foi incorporada a uma matriz polimérica de quitosana e goma guar para produção de uma tinta biocompatível para uso em impressão 3D pela técnica de extrusão de semissólidos. Os ensaios possibilitaram demonstrar as interações ocorridas entre as AuNP e TPPS, por meio de deslocamento de bandas características e mudanças do potencial zeta da AuNP na presença da TPPS. Um efeito de inibição da capacidade antioxidante do ácido ascórbico foi observado na presença de AuNP@TPPS no método DPPH, sugerindo possível atividade pró-oxidante. Embora preliminares, estes resultados sugerem a potencialidade de conjugar nanopartículas metálicas com porfirinas e explorar a impressão 3D na obtenção de filmes fotossensibilizadores para aplicação cutânea.

Palavras-chave: nanopartícula de ouro, porfirina, terapia fotodinâmica, manufatura aditiva, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Porphyrins are important photosensitizing agents used in photodynamic therapy against cancer due to their spectroscopic properties that favor the production of reactive oxygen species activated by light. Gold nanoparticles (AuNPs) also possess unique optoelectronic characteristics and can be decorated with porphyrins, enhancing their effects. In this study, the porphyrin *meso*-tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin-tetraamino (TPPS) was used to decorate AuNPs stabilized with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), taking advantage of the electrostatic interactions between the positively charged nanoparticle and the anionic nature of TPPS. The aim was to study this combination in order to obtain a photoactive nanomaterial with pro-oxidant properties for future evaluation in treatments for melanoma-type skin cancer. This system was analyzed in terms of the spectroscopic characteristics of its components, the surface charge of AuNP and AuNP@TPPS, and indirect measurements of oxidizing capacity through a modified assay for inhibition of the antioxidant capacity of ascorbic acid using the DPPH method. The AuNP@TPPS dispersion was incorporated into a chitosan and guar gum polymeric matrix to produce a biocompatible ink for use in 3D printing via semi-solid extrusion technique. The assays enabled the demonstration of interactions between AuNPs and TPPS through shifts in characteristic bands and changes in the zeta potential of AuNPs in the presence of TPPS. An inhibitory effect on the antioxidant capacity of ascorbic acid was observed in the presence of AuNP@TPPS in the DPPH method, suggesting possible pro-oxidant activity. Although preliminary, these results suggest the potential of combining metallic nanoparticles with porphyrins and exploring 3D printing for the development of photosensitizing films for cutaneous application.

Keywords: gold nanoparticle, porphyrin, photodynamic therapy, additive manufacturing, reactive oxygen species.

LISTA DE SIGLAS

AuNP: nanopartículas de ouro

TPPS: porfirina meso-tetra(4-sulfonato-fenil)porfirina-tetraamino

CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio

ERO: espécies reativas de oxigênio

SSE: extrusão de semissólidos, do inglês *Semisolid Extrusion*

AuNP@TPPS: nanopartículas de ouro decoradas com porfirina meso- tetra(4-sulfonato-fenil)porfirina-tetraamino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1. Câncer de pele tipo melanoma.....	6
2.2. Nanopartículas de ouro	7
2.3. Porfirinas	12
2.4. Impressão 3D.....	13
3. OBJETIVOS	15
3.1. Objetivos gerais	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. Materiais	16
4.2. Procedimentos experimentais.....	16
4.2.1. Síntese e caracterização de AuNP	16
4.2.2. Preparo e caracterização de AuNP decoradas com TPPS	17
4.2.3. Determinação do potencial oxidante de AuNP decoradas com TPPS.....	18
4.2.4. Impressão 3D e caracterização de filmes biopoliméricos contendo AuNP decoradas com TPPS	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5.1. Caracterização das AuNP	21
5.2. Estudo das interações de AuNP decoradas com TPPS	22
5.3. Avaliação do potencial oxidante de AuNP decoradas com TPPS	25
5.4. Filmes 3D-impressos de hidrogéis contendo AuNP decoradas com TPPS.....	26
6. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	30
ANEXO I.....	35

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele do tipo melanoma agrava-se anualmente em número de mortes pela doença no Brasil, registrando em 2020 2,2 mil mortes no país. A Organização Mundial da Saúde, em um levantamento feito pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Oncológica, aponta que em 2040 os casos de mortes pela doença podem chegar a 80% a mais que em comparação com 2020. São apontados diferentes fatores para justificar o aumento de mortalidade, dentre eles destaca-se a crescente resistência das células cancerígenas aos antineoplásicos. (1)

Atendo-se especialmente ao câncer do tipo melanoma, níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) são naturalmente elevados no ambiente intracelular.(2) Assim, como a expressão de antioxidantes é também aumentada nestas células para manter a homeostase, uma estratégia terapêutica interessante é expor às células a uma maior quantidade de ERO para que ocorra o processo de estresse oxidativo, com o desequilíbrio entre a produção e eliminação de ERO na célula, ocasionando uma deterioração no DNA e RNA celular e, conseqüentemente, levando a uma apoptose induzida. (1) Porém, os antineoplásicos disponíveis no mercado que possuem um nível maior de ERO tendem a apresentar toxicidade sistêmica elevada, além de muitas vezes não serem capazes de gerar ERO suficiente para morte celular. (1)

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica é uma importante estratégia de tratamento. Seu mecanismo envolve a produção de ERO a partir de agentes fotossensibilizantes e oxigênio molecular, que quando ativados por luz geram ERO, em especial oxigênio singlete, que são altamente reativos e causam graves danos aos componentes celulares, levando à destruição celular. Como a produção de ERO ocorre de forma centralizada, por ação localizada dos fotossensibilizadores com afinidade ao alvo, o dano celular é direcionado para os tecidos malignos, diminuindo os danos celulares a tecidos saudáveis. (3)

Moléculas como as porfirinas são amplamente utilizadas como fotossensibilizadores, inclusive com produto aprovado para uso clínico em 1993 sob a marca de Photofrin[®]. (4) As porfirinas são quimicamente caracterizadas por serem uma classe de compostos macrocíclicos, com quatro anéis heterocíclicos pirrólicos, sendo possível haver uma inúmera combinação de substituintes acoplados a estes anéis. Esta característica permite modular características como reatividade, carga, bem como sua solubilidade. (4) Quando a porfirina atua como fotossensibilizador, na

presença de luz há a reação com o oxigênio molecular e a produção de ERO. (4)

Nanopartículas metálicas podem ser aliadas para a terapia fotodinâmica, dadas as suas características físico-químicas e optoeletrônicas únicas, em especial das nanopartículas de ouro (AuNP). Além da boa compatibilidade e baixa toxicidade, as AuNP tem capacidade de biodistribuição, circulação e internalização celular elevada, sendo reportadas como agentes de *delivery* de fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica contra o câncer. Alguns fatores são importantes a serem considerados na interface biológica, como tamanho da nanopartícula, o seu formato e suas cargas de superfície.(4) Nanopartículas de tamanho 2-100 nm tem demonstrado melhor permeabilidade celular, além de que as AuNP devem superar a resistência e força da membrana celular, para serem capazes de penetrar a célula. (5)

A combinação das AuNP com fotossensibilizadores, como porfirinas, pode ocorrer por uma interação eletrostática. Neste caso, a superfície da nanopartícula pode apresentar carga em consequência do agente estabilizante escolhido, assim como a estrutura da porfirina, que pode ser carregada em decorrência dos grupos funcionais ligados ao macrociclo principal.

Por fim, ao vislumbrar a apoptose celular pela produção de ERO, este trabalho buscou desenvolver AuNP decoradas com porfirinas para a obtenção de um agente fotossensibilizador pró-oxidante. Como prova de conceito, um filme customizado por impressão 3D contendo as espécies foi obtido para viabilizar uma futura aplicação cutânea em lesões por melanoma.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Câncer de pele tipo melanoma

O câncer é considerado uma doença multifatorial que parte de um processo de divisão celular descontrolado promovido por inúmeros fatores fisiológicos e ambientais, causando uma mutação no DNA de uma determinada célula e a tornando maléfica ao meio. Para o câncer de pele, a Organização Mundial da Saúde destaca que o fato de a pele ser um órgão em constante exposição direta a danos ambientais há uma maior incidência desta doença em países de maiores altitudes e climas tropicais. Especificamente se atendo ao câncer de pele do tipo melanoma, ainda não é totalmente esclarecido qual a relação do excesso de incidência de raios UV com o aparecimento da doença, porém fortes evidências indicam que esta seja a causa principal de alteração de uma célula saudável para uma cancerígena, neste caso. (6)

Cânceres de pele não-melanomas demonstram maiores índices de ocorrência, sendo diagnosticados por ano cerca de 3 milhões de pacientes acometidos ao redor do mundo. Por outro lado, o câncer do tipo melanoma acomete cerca de 132 mil pessoas, porém com elevados índices de mortes, sendo uma doença que desafia os tratamentos já existentes. (6)

O fato de as células de melanoma naturalmente produzirem um alto índice de ERO no seu interior faz com que os quimioterápicos utilizados nos tratamentos sejam muito agressivos, pelo nível de resistência ao colapso que este tipo de célula apresenta. Nesse sentido, as estratégias de ação destes quimioterápicos comumente envolvem a metilação de guanina, a reticulação de DNA ou microtúbulos prejudiciais até a apoptose celular. Ocasionar o dano do DNA nas células de melanoma induz a ativação do fator de transcrição p53, que desencadeia o processo de apoptose induzida (Figura 1).(7,8)

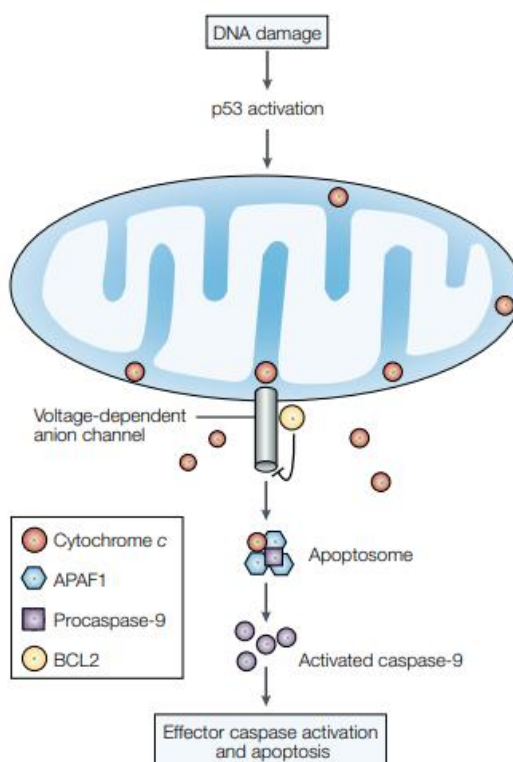


Figura 1: Processo celular de apoptose induzida, reproduzido de referência (8) .

Uma das maneiras de promover esse dano no DNA da célula é reduzindo a atividade metabólica celular, que leva ao estresse oxidativo excessivo e, ao colapsar da célula, a barreira protetora do DNA é comprometida e as fitas de DNA são danificadas. Estudos demonstram que aumentar a disponibilidade de ERO no meio celular é uma maneira de desencadear esses eventos. Assim, desenvolver novas estratégias terapêuticas capazes penetrar a barreira celular e/ou promover estresse oxidativo excessivo pode ser uma alternativa para o tratamento da doença e diminuição dos índices de mortes ao redor do globo.(8,9)

2.2. Nanopartículas de ouro

O progresso da nanotecnologia em controlar estruturas a nível atômico, molecular e supramolecular expandiu fronteiras nas mais variadas áreas da ciência e tecnologia, inclusive na Química Medicinal. A nanomedicina, campo que se dedica a estudar os efeitos dos nanomateriais em sistemas biológicos para fins de saúde, tem tomado cada vez mais espaço visto que as nanopartículas possuem características físico-químicas únicas, tamanho-dependentes, que podem ser controladas e

adaptadas a depender do meio reacional e da estratégia de síntese. O controle de características como tamanho e formato da nanopartícula, sua carga de superfície, e a natureza dos átomos que a constituem se tornou um atrativo para muitos pesquisadores pela diversidade de desfechos terapêuticos que podem ser obtidos. (10) Neste cenário, destacam-se as nanopartículas metálicas, que possuem atividade biológica intrínseca e podem ser utilizadas em uma abordagem multifuncional em detecção e diagnóstico (11), em terapias inovadoras (12), em implantes e materiais biomédicos (13), inclusive de forma simultânea (teranósticos). (14)

A síntese das nanopartículas metálicas é uma etapa determinante no controle das suas propriedades e as inúmeras metodologias reportadas dividem-se em abordagens *top-down* (de cima para baixo) e a *bottom-up* (de baixo para cima). A primeira se caracteriza por ter como matéria-prima partículas maiores que sofrem fragmentação, normalmente por estímulos físicos, até a formação das nanopartículas. Exemplos desta abordagem são os métodos de moagem de alta energia, ablação a laser, sputtering e nanolitografia. (15) Já a abordagem *bottom-up* parte de estruturas menores, como átomos, que de forma aditiva combinam-se construindo as nanopartículas. Estímulos químicos *i.e.* reações químicas são a base das estratégias *bottom-up* para nanopartículas metálicas, que costumam partir de um sal metálico como precursor e, durante a síntese, com a participação de um agente redutor, ocorre a redução dos íons a átomos no seu estado metálico (carga zero), que ligam-se para posterior formação das nanopartículas. Átomos de elementos nobres, como ouro, são candidatos promissores na nanomedicina por apresentarem maior estabilidade química. Dentre os redutores químicos, o borohidreto de sódio está entre os mais utilizados. Adicionalmente, participa da reação um agente estabilizador que irá manter o metal na sua forma reduzida e garantirá a estabilização coloidal do sistema. (10)(16) Um fator importante é que os agentes estabilizantes influenciam ativamente no formato, tamanho e carga da nanopartícula, sendo esta uma área ainda em estudo. (16,17) A estabilização pode ocorrer por mecanismos de impedimento estérico, repulsão eletrostática ou ambos (16) Nesse sentido, os surfactantes iônicos detêm um importante papel como agentes estabilizantes na nanomedicina pela possibilidade de exercer ambos os mecanismos. O brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), representante da classe dos surfactantes iônicos, é reportado em combinação com borohidreto de sódio como agente redutor para a obtenção de AuNP esféricas, com tamanho podendo variar de 10 a 50 nm, e superfície positivamente carregada. (18)

A cor apresentada por uma AuNP, tipicamente vermelha para nanoesferas, está relacionada com o efeito de ressonância de plasmon de superfície, que gera um perfil de absorção em comprimentos de onda específicos e, ao olho nu, dá origem a uma cor. A componente elétrica da radiação eletromagnética interage e excita os elétrons da banda de condução da nanopartícula metálica, promovendo uma oscilação coletiva (Figura 2a). Para o caso das AuNP esféricas, o perfil de absorção característico centraliza-se na região próxima a 525 nm, correspondendo às energias da cor verde, além de uma absorção na região do azul (Figura 2b). Consequentemente, a maior componente dentre as cores transmitidas é a região do vermelho, que dá a sua cor característica (Figura 2c).

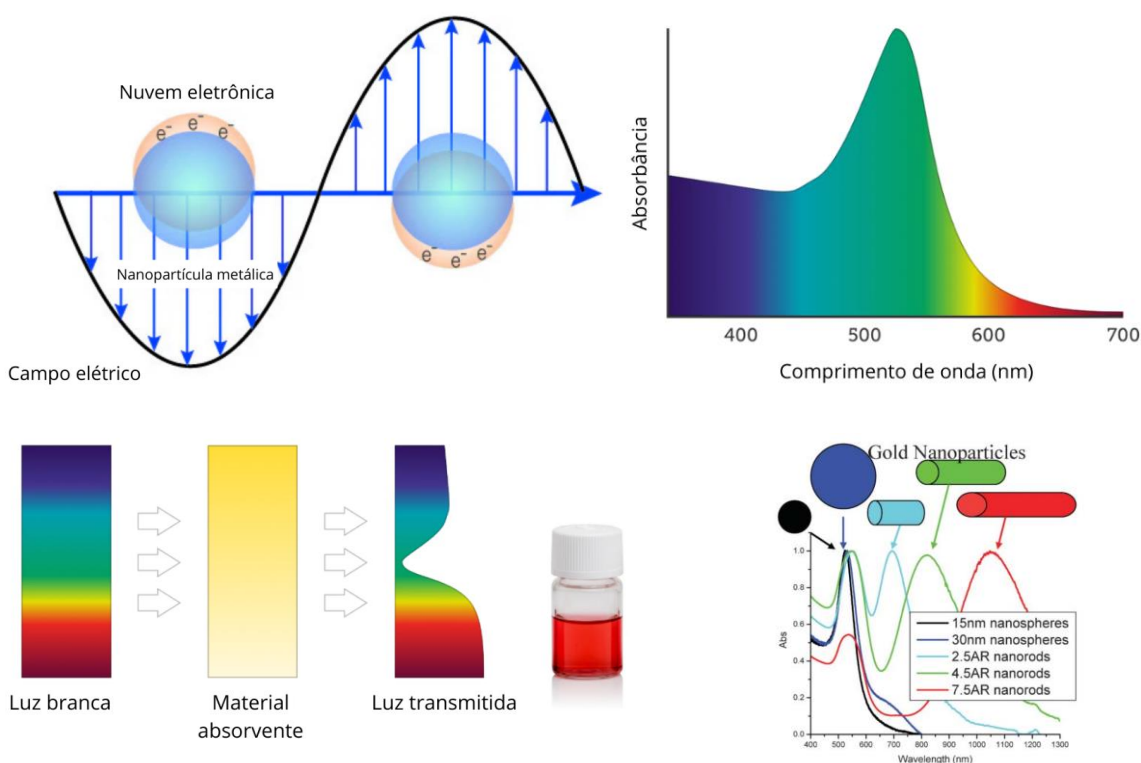


Figura 2: a) Efeito de ressonância de plasmon de superfície em uma nanopartícula metálica (adaptado de (19)); b) perfil de absorção de uma nanopartícula de ouro esférica (adaptado de (19)); c) relação entre cor absorvida e transmitida para nanopartículas de ouro (adaptado de (19)); e variação de cor em função do tamanho de nanopartículas de ouro (reproduzido de Chem. Soc. Rev., 2006, 35, 209–217 .(20)

A energia absorvida no efeito de ressonância de plasmon de superfície pode variar de acordo com o tamanho e formato da nanopartícula, e pequenas variações de tamanho representam variações consideráveis de cor, o que possibilita uma

predição qualitativa sobre as características da nanopartícula sintetizada a partir do seu espectro de absorção e cor transmitida, como demonstrado na Figura 2d. (20) Os fenômenos que exploram as propriedades ópticas das nanopartículas dependendo do seu tamanho foi motivo da láurea dos pesquisadores Mounji G. Bawendi, Louis E. Brus e Alexei I. Ekimov com o Prêmio Nobel de Química de 2023, tamanho seu impacto na ciência e tecnologia contemporâneas.

Para AuNP, além de sua cor, sua interação com a radiação eletromagnética é também explorada em terapia fotodinâmica, que faz o uso de luz em comprimentos de onda específicos para promover transferência de energia e/ou elétrons e gerar ERO capazes de induzir a morte celular, sendo vastamente utilizado em tratamentos oncológicos (21). Nesse contexto, é importante ressaltar que o desfecho biológico na terapia é também dependente da nanobiointerface e da interação da nanopartícula com o alvo biológico, este último sendo uma relação de cooperação, pois depende tanto das características da nanopartícula quanto das do alvo. Assim, características químicas de uma célula (grupos funcionais da membrana, pH, potencial elétrico, dentre outros) são determinantes no planejamento da superfície da nanopartícula, que pode ser funcionalizada com vetores para permitir uma interação mais efetiva ou até mesmo a transposição da membrana e internalização celular da nanopartícula. Uma relação eletrostática, onde uma superfície é negativamente carregada e outra positivamente carregada, tende a demonstrar maior afinidade de interação (Figura 3), porém o meio em que a célula está situada e seus grupos proteicos podem influenciar na relação com a nanopartícula e fazer com que a interação eletrostática não seja sempre a mais favorecida. (22,23)

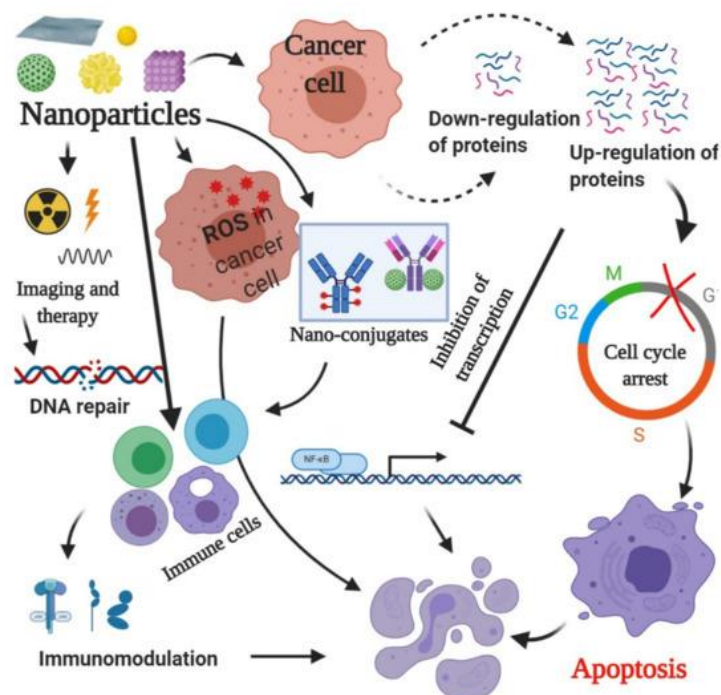


Figura 3: Relação de interação nanopartículas metálicas e célula, retirado de referência (24).

Quando internalizadas, as nanopartículas metálicas também têm a capacidade de reduzir a atividade metabólica celular ao bloquear canais de transporte, causando um quadro de estresse oxidativo no meio, que resulta em dano no DNA da célula cancerígena por danificar o sistema de transcrição, podendo ocasionar posteriormente em apoptose celular. (22,23,25)

Para potencializar as interações e a atividade biológica de AuNP, elas podem ser decoradas com outras moléculas que atuem sinergicamente e/ou contribuam com novas funções. Estudos demonstram que nanopartículas decoradas têm maior facilidade de internalização nas células e conseguem melhor concentrar sua atividade no alvo. A síntese de AuNP decoradas pode partir de uma dispersão convencional de nanopartículas que, após estabilização, sofre a funcionalização de sua superfície com a estrutura/molécula de interesse. A funcionalização pode ser realizada de forma covalente ou eletrostática, este último sendo comumente realizado por troca iônica quando o agente estabilizante tem natureza iônica. A adição deste agente não deve interferir nas estabilidade química e coloidal da nanopartículas, mantendo forma e carga intactas, mas pode causar leve variação no tamanho hidrodinâmico da nanopartícula. (23,24) No contexto de terapia fotodinâmica, as nanopartículas podem ser decoradas com fotossensibilizadores orgânicos, onde destaca-se os derivados porfirínicos que predominam como escolha de agente fototerapêutico.

2.3. Porfirinas

As porfirinas são caracterizadas como moléculas orgânicas que possuem quatro anéis heterocíclicos, podendo ou não ter um centro metálico e substituintes periféricos. Há a ocorrência natural de porfirinas em sistemas da natureza, como no caso do grupo heme (hemoglobina, mioglobina, citocromos) e da molécula da clorofila, que participa ativamente da função fotossensibilizante das plantas em seus processos de produção de energia por meio da fotossíntese. (26) A origem de suas propriedades fotofísicas únicas vem da sua estrutura química (Figura 4) onde o sistema de elétrons π altamente conjugado resulta em intensas absorções na região do ultravioleta e visível. As propriedades fotofísicas destas moléculas podem ser moduladas em função do grau de conjugação, seja modificando o número de heteroátomos, a presença e natureza do centro metálico e substituintes periféricos, bem como interagindo com outras espécies e ambientes que favoreçam processos de transferência eletrônica. (26, 21)

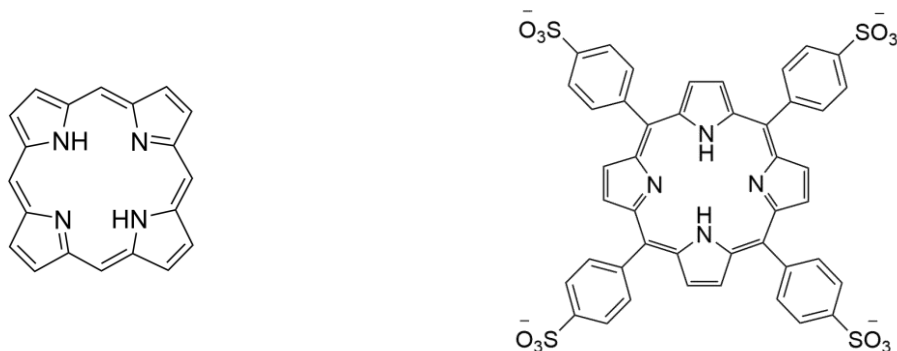


Figura 4: Estrutura esqueleto de uma porfirina e estrutura da porfirina tetrassulfonada.

As transições eletrônicas das porfirinas ocorrem em duas principais bandas características, sendo elas a Soret e a banda Q (Figura 5). As bandas de excitação de Soret tem início em ~ 400 nm, enquanto a banda Q pode ocorrer em dois pontos característicos variando entre 550 nm a 710 nm. (21,27) Tais transições eletrônicas podem ser exploradas em terapia fotodinâmica. Neste caso, há a excitação da porfirina do seu estado fundamental (S_0) para um estado singlete excitado (S_1), que pode, então, relaxar até o estado fundamental S_0 através de um processo de emissão de fluorescência ou converter-se ao estado triplete excitado (T_1) por mecanismo de

cruzamento intersistema. A partir deste estado excitado tripleto, sua interação com espécies de oxigênio molecular leva à transferência de energia ou elétrons e consequente produção de ERO, como peróxido, superóxido, radicais hidroxila e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), que apresentam elevada capacidade oxidativa em sistemas biológicos, podendo causar severos danos (20). A utilização destes agentes fotossensibilizadores pode ser de amplo interesse para área da saúde no tratamento de patologias em que o estresse oxidativo leva a apoptose celular, como o câncer. (21,27,28)

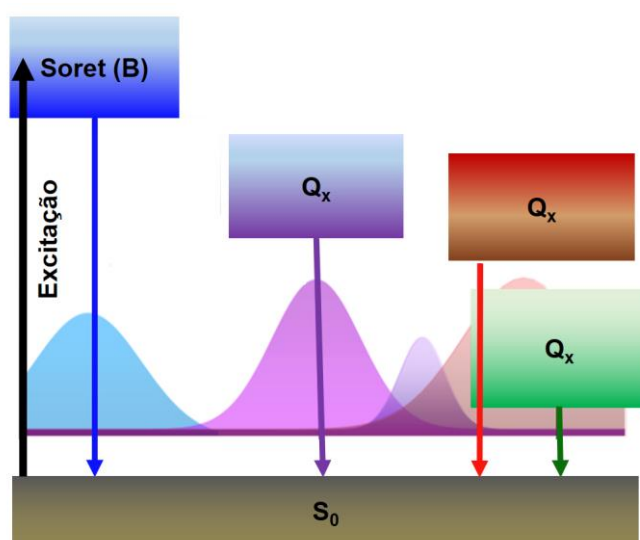


Figura 5: Espectro com as bandas características de porfirinas, adaptado de referência (26).

A interação de porfirinas com outras espécies podem causar o deslocamento dessas bandas características, sendo um indicativo de aumento ou diminuição da energia necessária para excitação dos elétrons. Estudos demonstram que a relação entre porfirinas e AuNP podem gerar um efeito sinérgico que ocasionam uma grande formação de oxigênios singletos, por uma rápida transferência de energia. (28)

2.4. Impressão 3D

Dada a inerente irregularidade e assimetria de lesões caracterizadas como melanoma, bem como a variabilidade de locais de incidência na pele e as características individuais de cada paciente, terapias personalizadas podem aumentar a eficácia e minimizar efeitos colaterais, atingindo as células cancerígenas de forma precisa e seletiva, e preservando as células saudáveis. Dentro de estratégias

inovadoras de terapias personalizadas, a manufatura aditiva vem ganhando espaço em virtude de sua adaptabilidade e versatilidade. Na produção de medicamentos, ganha destaque pela possibilidade de personalização da forma farmacêutica e da dose, atendendo com maior precisão as necessidades de pacientes e populações específicas. (29)

Dentre as técnicas de impressão 3D utilizadas na produção de medicamentos, uma das mais versáteis é impressão 3D baseada em extrusão de semissólidos, ou SSE, do inglês *Semisolid Extrusion*. Essa técnica tornou-se uma importante alternativa na produção de formas farmacêuticas e materiais biomédicos devido ao uso de matérias primas em forma de pasta ou gel, que apresentam maior potencial de modificação com ingredientes biologicamente ativos. (29,30) A técnica utiliza uma seringa contendo a tinta semissólida, que é extrudida por uma ponteira pela aplicação de pressão ao êmbolo e depositada sob uma mesa de impressão. Os polímeros são materiais de escolha como tinta, especialmente na forma de hidrogéis, por proporcionarem a consistência adequada para a printabilidade. Outra vantagem é que não há necessidade de aquecimento do material para a impressão, diferente da técnica FDM que utiliza de aquecimento para a extrusão, impossibilitando o processamento de ingredientes termolábeis. (29,30)

Nesse sentido, este trabalho buscou desenvolver uma tinta polimérica fotossensibilizadora processável por SSE, utilizando AuNP decoradas com porfirina como agentes fotossensibilizadores, e quitosana e goma guar como tinta de biomaterial, devido à sua origem natural, excelente biocompatibilidade e bioadesão para uso tópico. (29,30)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Desenvolver um filme impresso em 3D contendo AuNP decoradas com porfirina meso-tetra(4-sulfonato-fenil)porfirina-tetraamino (TPPS) com potencial pró-oxidante para terapia fotodinâmica contra melanoma.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar AuNP com superfície catiônica, através da utilização de CTAB como agente estabilizante, visando obter uma dispersão estável de nanopartículas esféricas.
- Analisar as interações de AuNP quando decoradas com TPPS, visando observar mudanças no comportamento espectroscópico de ambos os componentes e na carga superficial da nanopartícula quando decorada.
- Estudar a capacidade oxidante de AuNP@TPPS por medida indireta utilizando um ensaio adaptado de capacidade antioxidante do ácido ascórbico pelo método DPPH.
- Formular tinta de biopolímero contendo AuNP@TPPS, que tenha característica de printabilidade para impressão 3D por técnica de extrusão de semissólidos.
- Obter filmes 3D-impressos contendo AuNP@TPPS como prova de conceito da versatilidade da técnica de extrusão de semissólidos na modificação de tintas e na customização de formas impressas para aplicação cutânea.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A síntese desenvolvida neste trabalho foi realizada nas dependências do Laboratório de Farmacociências (Laboratório 405) e do Laboratório Multiusuário Central Analítica, localizados nos prédios 3 e 1, respectivamente, da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), nos períodos de março a novembro de 2024.

4.1. Materiais

Para a síntese das AuNP, foram utilizados: solução do precursor metálico ácido cloroáurico (HAuCl_4) na concentração de $5,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparada pela dissolução de ouro metálico (Sigma-Aldrich, 99,99%) em água régia; agente redutor borohidreto de sódio (NaBH_4 , Neon, 98,55%); agente estabilizante, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB, Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$). A porfirina aniônica utilizada foi a meso-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirina contendo amônio como contra-íon (TPPS, $\text{C}_{44}\text{H}_{42}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}_4$, massa molar $1001,83 \text{ g mol}^{-1}$), cedida pelo grupo de pesquisa do Prof. Bernardo Almeida Iglesias, da Universidade Federal de Santa Maria. Para preparo das tintas de hidrogéis para impressão 3D, foram utilizados: quitosana de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich, grau de desacetilação: $\geq 75\%$), goma guar (Espaço Sabor Natural, grau alimentício) e glicerol (Synth, 99,5%). Para os ensaios de atividade oxidante, foram utilizados: ácido ascórbico (Reagen, 99%), etanol (Êxodo Científica, P. A.) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH, Sigma-Aldrich, 95%).

4.2. Procedimentos experimentais

4.2.1. Síntese e caracterização de AuNP

Para obtenção de uma dispersão estável de AuNP, alguns parâmetros foram sendo otimizados ao longo do processo, sendo eles: quantidade de Au, de CTAB e de NaBH_4 . Dois fatores foram levados em consideração para análise qualitativa: a coloração e a sua permanência, sendo que o desejado seria um tom de vermelho rubi que se mantém com o tempo. Os testes feitos estão apresentados na Tabela 1, no Anexo I. A partir de tais ensaios, a composição escolhida para sequência do trabalho

foi a concentração de ouro na dispersão de $1,87 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e de CTAB de $8,65 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

A dispersão de AuNP sintetizada foi analisada por espectroscopia UV-Visível com auxílio do Espectrofotômetro UV-Vis modelo UV-1800 feixe duplo, da marca Shimadzu. A faixa espectral analisada foi de 200 nm a 800 nm, água ultrapura foi utilizada como referência e a amostra de AuNP foi diluída 2× em água ultrapura. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas no Centro de Microscopia e Microanálise BR-Sul, localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no microscópio JEOL JEM 14000 Flash, sob uma tensão de 120 kV. Para o preparo da amostra, uma gota da dispersão de nanopartículas de ouro foi adicionada na superfície de uma grid de cobre recoberta com filme de carbono. As imagens foram obtidas na magnificação de 100 e 200 k×.

4.2.2. Preparo e caracterização de AuNP decoradas com TPPS

Com o objetivo de avaliar a interação entre a TPPS e as AuNP foram investigados: a mudança da carga superficial da AuNP com adições sequenciais de TPPS através da medição do potencial zeta; e alterações nas propriedades espectroscópicas da TPPS com adições sequenciais de AuNP através do monitoramento da banda Soret da TPPS no espectro na região do UV-Vis.

A mudança de potencial zeta das AuNP com adições sequenciais de TPPS também foi acompanhada pelas medidas de mobilidade eletroforética no equipamento ZetaSizer Ultra, da marca Malvern. Foram preparadas soluções aquosas com concentração fixa de AuNP/CTAB pela adição de 50 µL de AuNP a balões volumétricos de 5,0 mL, onde a concentração final de CTAB foi de $8,65 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, correspondendo à quantidade de $4,33 \times 10^{-7} \text{ mol}$ de CTAB no balão. A seguir, foram adicionados volumes de 20, 25, 33, 50, 100, 200 e 400 µL de solução de TPPS, o que resultou nas razões de CTAB:TPPS de ~3:1, 2,5:1, 2:1, 1,3:1, 0,6:1, 0,3:1. O volume foi ajustado ao menisco com água ultrapura. Mais detalhes experimentais estão apresentados na Tabela 2, no Anexo I.

Para o experimento de adição de AuNP em TPPS, uma solução mãe de TPPS de concentração $8,47 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 1,7 mg de TPPS em 2 mL de água ultrapura. A seguir, foi realizada uma diluição de 111× com o objetivo de fixar a absorbância da banda Soret em $A \cong 1,5$, onde a concentração final desta

solução de trabalho de TPPS foi de $7,63 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O volume de 1,5 mL foi adicionado em cubeta de quartzo, correspondendo a quantidade de $11,4 \times 10^{-9}$ mol de TPPS na cubeta. A dispersão de AuNP, pré-diluída 2× (concentração de CTAB = $4,33 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) foi adicionada à cubeta nos volumes de 50, 100, 150, 200 e 250 µL, correspondendo à adição sequencial de $0,216 \times 10^{-6}$ mol de CTAB, o que resultou nas razões de CTAB:TPPS de ~ 20:1, 40:1; 60:1, 80:1 e 100:1. Um experimento controle foi realizado adicionando os mesmos volumes de água ultrapura à solução de TPPS e seus espectros registrados. Mais detalhes experimentais estão apresentados na Tabela 3, no Anexo I.

4.2.3. Determinação do potencial oxidante de AuNP decoradas com TPPS

A avaliação da capacidade oxidante de AuNP decoradas com TPPS foi realizada por uma medida indireta utilizando um ensaio adaptado de capacidade antioxidante do ácido ascórbico pelo método DPPH. O DPPH quando dissolvido em etanol é um radical livre estável (DPPH•), de cor púrpura, com absorção no comprimento de onda de 515 a 520 nm. O ácido ascórbico, um antioxidante clássico, pode doar um átomo de hidrogênio ou transferir um elétron para a molécula de DPPH•, originando a forma reduzida DPPH-H com a perda da cor púrpura, que pode ser monitorada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 517 nm. Desta forma, o potencial oxidante de AuNP decoradas com TPPS foi avaliado pela inibição da atividade antioxidante do ácido ascórbico frente ao ensaio de DPPH.

Uma solução de trabalho de DPPH em etanol foi preparada na concentração 0,20 mmol L⁻¹, de forma a obter-se durante os ensaios uma absorbância inicial da sua banda principal de $A \cong 1,0$. Inicialmente, foi realizado um ensaio para avaliação da atividade antioxidante de uma solução de ácido ascórbico (AA) em etanol, de concentração 0,50 mmol L⁻¹. Em microtubos, foram adicionados 1,0 mL da solução de DPPH (concentração no microtubo de 100 µmol L⁻¹) e 1,0 mL de soluções de concentração crescente de AA (concentração no microtubo de 0 a 150 µmol L⁻¹); Após 12 min, foram adquiridos espectros das amostras no Espectrofotômetro UV-Vis, modelo UV-1800, da marca Shimadzu. O mesmo experimento foi realizado com uma solução de AA previamente incubada por 1 h com AuNP decoradas com TPPS, na proporção de 1 CTAB : 2 TPPS : 1 AA. Um experimento controle foi realizado com as

mesmas quantidades de AuNP decoradas com TPPS, porém sem a presença de AA, com o objetivo de descartar sua interferência na medida espectrofotométrica.

A % de inibição do radical DPPH• foi calculada a partir das absorbâncias (A) no comprimento de onda de 517 nm, seguindo a equação abaixo:

$$\text{inibição DPPH} \bullet (\%) = [(A_{\text{DPPH}+\text{solvente}} - A_{\text{DPPH}+\text{amostra}})/A_{\text{DPPH}+\text{solvente}}] \times 100$$

4.2.4. Impressão 3D e caracterização de filmes biopoliméricos contendo AuNP decoradas com TPPS

Uma tinta base de biopolímero na forma de hidrogel foi desenvolvida com capacidade de processamento por impressão 3D pela técnica de extrusão de semissólidos. Inicialmente, 0,300 g de quitosana de baixo peso molecular foi solubilizada em 10 mL de AuNP, com a adição de 1,0 mL de ácido acético glacial. Após, com o auxílio de um gral e pistilo, 0,300 g de goma guar foram incorporados em 1,0 mL de glicerol. A quitosana solubilizada foi incorporada a composição presente no gral e, após a homogeneização, o hidrogel (HG-AuNP) formado foi armazenado em uma seringa com capacidade de 10 mL para posterior impressão. A mesma versão da formulação foi preparada com a presença de TPPS na composição (HG-AuNP@TPPS) em uma versão reduzida, sendo que 0,00156 g da mesma foram adicionadas no volume de AuNP de 6 mL, tais medidas foram utilizadas devido a falta de maiores quantidades de TPPS disponíveis.

A impressão para obtenção de filmes customizados foi realizada na impressora 3D do grupo de pesquisa NanoBio Interfaces UFCSPA, pela técnica de extrusão de semissólidos. Os tamanhos e parâmetros de impressão dos filmes foram ajustados pelos softwares PrusaSlicer e Pronterface, sendo: diâmetro da ponteira (0,41 mm, 21 G), velocidade de impressão de 6 mm s⁻¹, preenchimento da forma de 50%, dimensões de 15 mm × 15 mm e 1,5 mm de altura. Todos os filmes tiveram suas massas medidas logo após a impressão e após secagem a temperatura ambiente, para avaliar a perda de massa de água em decorrência da secagem. A presença de AuNP nos filmes impressos foi avaliada através da análise de espectroscopia na região do UV-Vis para amostras sólidas em um Espectrofotômetro CARY 5000 (faixa espectral de 300 a 800 nm), em colaboração com o Prof. Marcelo Barbalho Pereira

(Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Para aquisição dos espectros foi empregada a configuração de transmissão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das AuNP

Embora a obtenção de uma nanopartícula seja definida pela síntese de partículas com dimensões entre 1 e 100 nm, para nanopartículas metálicas entende-se que o tamanho crítico para que novas propriedades sejam observadas, distintas do *bulk* e características da nanoescala, é abaixo de 30 nm. (31, 32) Nesse sentido, os parâmetros da síntese, e em especial a escolha do agente estabilizante, estão diretamente ligados com os fatores de tamanho, formato e estabilidade da nanopartícula. Neste trabalho, o CTAB foi utilizado como agente estabilizante e a Figura 6 a seguir apresenta o espectro na região do UV-Vis da dispersão aquosa de AuNP obtida na concentração otimizada.

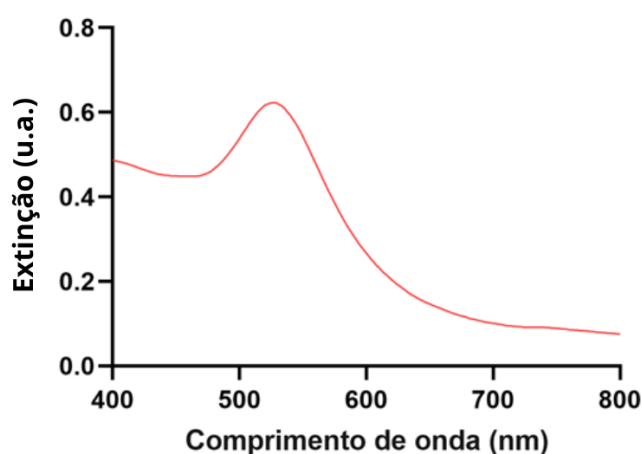


Figura 6: Espectro na região do UV-Vis da dispersão aquosa de AuNP.

Conforme observado, o espectro apresentou uma banda centrada no comprimento de onda de ca. 525 nm, que está relacionada ao efeito de ressonância plasmônica de AuNP com formato esférico e tamanho menor que 30 nm. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão, apresentadas na Figura 7 possibilitam a observação de nanopartículas esféricas com tamanho médio de $2,4 \text{ nm} \pm 1,0 \text{ nm}$ ($n = 43$), dispersas em uma matriz de CTAB, confirmando o sucesso da síntese.

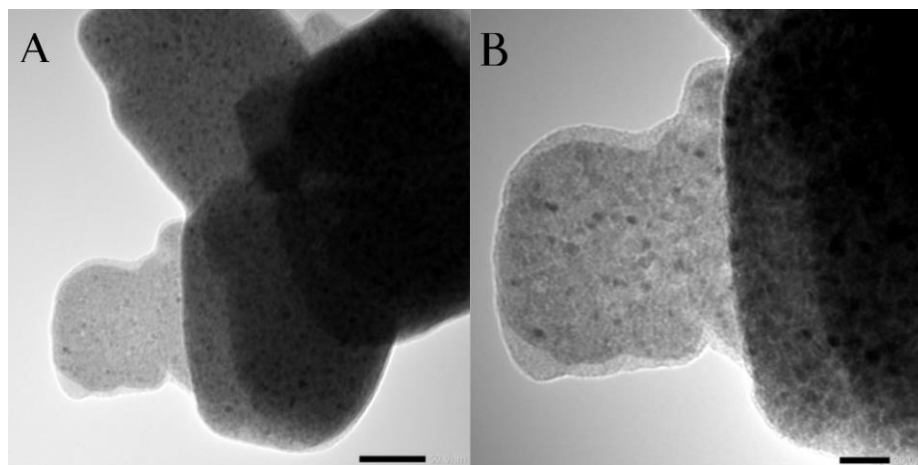


Figura 7: Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de AuNP (tensão de aceleração de 120 kV e magnificações de (A) 100k $\times$ e (B) 200 k $\times$). As barras correspondem aos tamanhos de (A) 50 nm e (B) 20 nm.

5.2. Estudo das interações de AuNP decoradas com TPPS

Com o intuito de analisar as interações das AuNP quando decoradas com a porfirina TPPS, foram realizados estudos variando concentrações de ambos os componentes e utilizando das técnicas de espectroscopia na região do UV-Vis e medidas de mobilidade eletroforética para obtenção do potencial zeta. Nos ensaios de espectroscopia, inicialmente, foram analisados os impactos causados nas propriedades espectroscópicas da TPPS quando exposta a diferentes concentrações de AuNP (Figura 8). As transições eletrônicas da TPPS ocorrem em duas regiões principais: nos comprimentos de onda de 500 a 650 nm localizam-se as bandas Q enquanto de 400 nm a 450 nm localiza-se a banda Soret (33), e mudanças de intensidade ou posição da banda podem indicar alterações estruturais da molécula.(34)

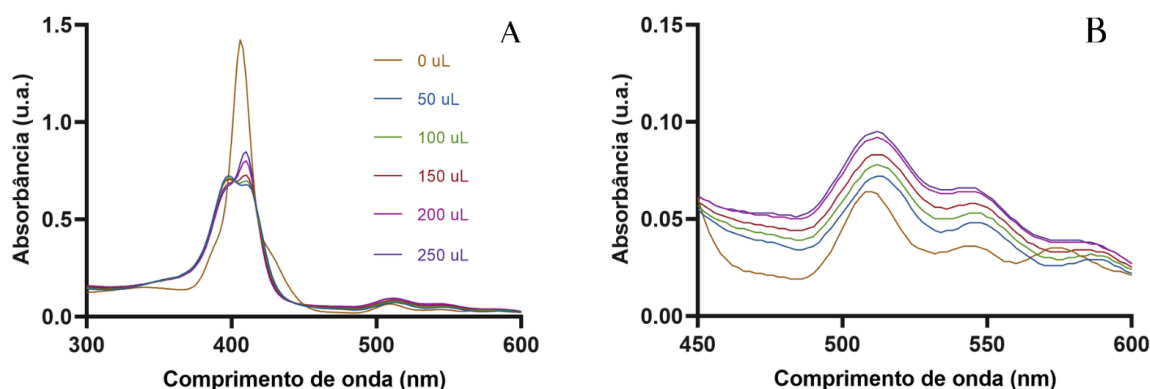


Figura 8: a) Espectros na região do UV-Vis de TPPS com adições subsequentes de AuNP estabilizadas

por CTAB, b) recorte do espectro na região das bandas Q.

Observa-se que na ausência de AuNP, a TPPS em solução aquosa ($7,63 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) apresenta a banda Soret centrada no comprimento de onda de 406 nm. Com a primeira adição de AuNP ($V = 50 \mu\text{L}$) houve uma mudança no perfil da banda, deslocando-se para 397 nm com um ombro em 410 nm. Com as subsequentes adições de AuNP, o ombro apresentado em 410 nm tem um aumento na intensidade até o ponto de adição de $V = 150 \mu\text{L}$ de AuNP, onde evidencia-se um ponto isobéstico, em que as bandas presentes em 397 nm e 410 nm apresentam intensidades equivalentes. Com adição de volumes de AuNP, a banda apresentada em 410 nm se torna majoritária e a banda visualizada em 397 nm diminui de intensidade até tornar-se um ombro, indicando a retomada do comportamento observado antes da inserção de qualquer volume de AuNP.

Gonçalves *et al.* observaram um comportamento similar de desdobramento da banda Soret com a adição de albumina e atribuíram tal mudança no comportamento da banda como relacionada inicialmente a uma agregação das próprias espécies de TPPS. Com o aumento da concentração de albumina, houve uma conversão dos agregados de TPPS para uma forma da TPPS associada à albumina, retornando ao perfil inicial da banda e comprovando a interação entre as espécies.(35) Nesse contexto, pode-se inferir que há uma interação entre AuNP estabilizadas por CTAB e a TPPS, visto que um aumento na concentração de AuNP ocasionou mudanças significativas no espectro eletrônico característico da porfirina estudada e análogas a dados já reportados. Porém, não é possível determinar se estas mudanças foram ocasionadas por uma interação entre CTAB/TPPS ou Au/TPPS, sendo necessário medidas de fluorescência para maiores esclarecimentos. Estudos demonstram que a presença de polímeros moleculares pode estimular uma agregação das porfirinas, com a formação de dímeros a partir dos monômeros de TPPS. Como apenas as formas monoméricas apresentam característica de fluorescência, seria possível distinguir se o produto da interação de AuNP com a TPPS leva prioritariamente a formação de AuNP@TPPS ou dímeros de TPPS induzidos pela presença do CTAB. (36)

A interação da TPPS com a superfície do ouro também é reportada na literatura, visto que porfirinas apresentam grupos -NH no centro do anel porfirínico que podem ligar-se fortemente a AuNP pelo par de elétrons livres do nitrogênio com a superfície do ouro. Também sugere-se que monômeros da porfirina se adsorvem na

superfície de AuNP por interações de coordenação do ouro com os átomos de nitrogênio pirrólicos e subsequente formação de cadeias lineares pela interação π - π entre os monômeros da porfirina. (37)

Por outro lado, não descarta-se a interação eletrostática da TPPS com o CTAB. As formas protonadas e desprotonadas das TPPS apresentam diferentes comportamentos das bandas Soret e Q dependendo da protonação dos nitrogênios pirrólicos do centro do anel porfirínico. A forma protonada (todos os nitrogênios do ciclo protonados) apresenta banda característica em 434 nm e duas bandas na região Q, enquanto a forma desprotonada (dois nitrogênios protonados e dois desprotonados) possui banda Soret em 410 nm e quatro bandas Q no espectro. Isso indica que a TPPS quando em interação com as AuNP se encontra na sua forma desprotonada, dada a posição da banda Soret e as quatro bandas na região Q observadas neste trabalho. A estabilização do estado desprotonado pode ser explicada em consequência de uma distribuição de carga no anel frente à interação eletrostática que ocorre do CTAB (catiônico) com a TPPS (aniônica), como já demonstrado na literatura. (38)

Medidas de mobilidade eletroforética foram realizadas para estudar o potencial zeta e acompanhar a mudança da carga superficial da AuNP com adições sequenciais de TPPS. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 9.

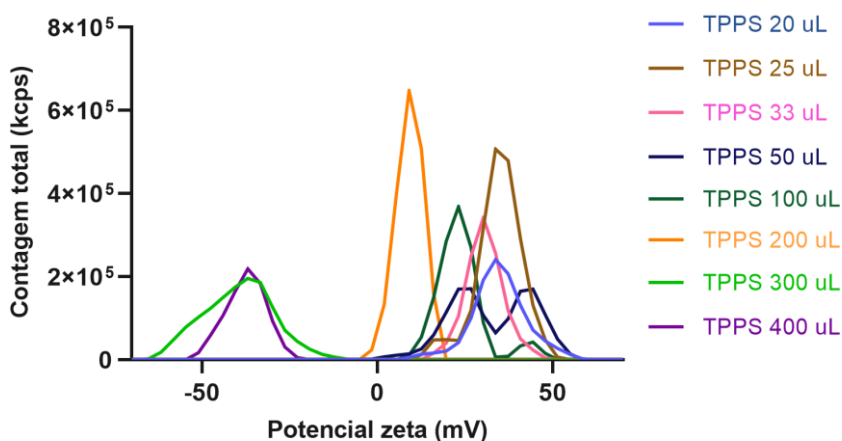


Figura 9: Medidas de potencial zeta de AuNP estabilizadas por CTAB com adições subsequentes de TPPS.

A superfície das AuNP é positivamente carregada em consequência do agente estabilizante CTAB, enquanto a TPPS é negativamente carregada, possibilitando que

ocorra uma interação eletrostática entre a AuNP e a TPPS. As AuNP demonstraram um potencial zeta positivo em ordem superior a + 30 mV, o que sugere uma boa estabilidade coloidal do sistema. Com a adição de TPPS, é possível observar o início da inversão de valores de potencial zeta, indicando uma interação entre as AuNP estabilizadas por CTAB e a TPPS. Observa-se que no ponto de adição de TPPS de $V = 50 \mu\text{L}$ há duas populações com cargas distintas, indicando uma transição de espécies na superfície da nanopartícula. Neste ponto, há aproximadamente 1 CTAB : 1 TPPS (CTAB/TPPS = 1,26). Na adição seguinte de TPPS houve significativa redução do valor positivo de potencial zeta ($\zeta = +10 \text{ mV}$). Com o aumento das concentrações de TPPS, houve a total conversão da carga superficial para um potencial zeta negativo ($\zeta = -36 \text{ mV}$ em $V = 300 \mu\text{L}$, quando $\sim 5 \text{ TPPS} : 1 \text{ CTAB}$), em uma única população, sugerindo a interação eletrostática entre a nanopartícula e a TPPS.

5.3. Avaliação do potencial oxidante de AuNP decoradas com TPPS

As análises de avaliação do potencial pró-oxidante das AuNP decoradas com TPPS se deram por uma medida indireta, pela inibição da ação antioxidante do ácido ascórbico frente ao radical DPPH. As medidas diretas baseiam-se na capacidade do ácido ascórbico de doar um átomo de hidrogênio ou transferir um elétron para o radical de DPPH•, caracterizando sua ação antioxidante. Este efeito é observado pela perda da cor púrpura do DPPH• e consequente diminuição da absorbância no comprimento de onda de 517 nm. Na Figura 10 está apresentada a curva de inibição do radical DPPH• em função da concentração de ácido ascórbico, onde observa-se que 100% do DPPH• foi convertido em DPPH-H na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$.

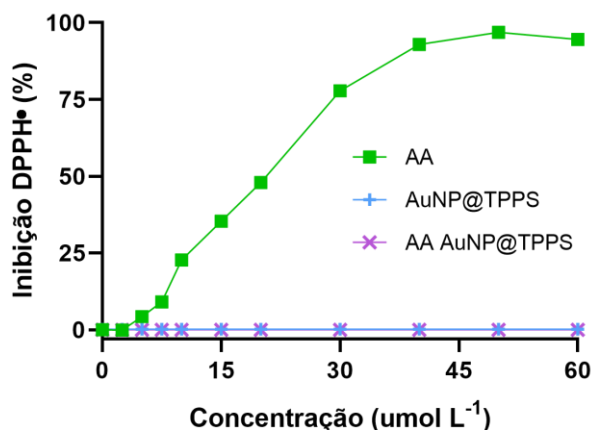


Figura 10: Medidas de atividade antioxidante frente ao DPPH.

Porém, ao expor a mesma solução de ácido ascórbico à presença de AuNP@TPPS na proporção de 1 CTAB : 2 TPPS : 1 AA e repetir as medidas da capacidade antioxidante do ácido ascórbico frente ao DPPH•, percebe-se que o ácido ascórbico não reagiu com o DPPH• em nenhuma concentração avaliada, o que sugere que o ácido ascórbico pode ter sido previamente oxidado por influência das AuNP@TPPS. Assim, quando em contato com o radical de DPPH•, o ácido ascórbico não teve mais sua ação antioxidante por não mais dispor de átomos de hidrogênio disponíveis ou elétrons livres para doação. Também foi realizado um ensaio controle (branco), sem o ácido ascórbico, somente utilizando as AuNP decoradas com TPPS frente ao DPPH, para comprovar que as bandas visualizadas no espectro eram características do DPPH, sem interferência das AuNP ou TPPS, onde observou-se que o radical DPPH• não reage com as AuNP@TPPS. Tal efeito sugere, de maneira indireta, um potencial pró-oxidante das AuNP decoradas com TPPS. Porém, é necessário ampliar os estudos avaliando diferentes concentrações de ácido ascórbico e também comparativos com e sem TPPS. Adicionalmente, medidas diretas de produção de ERO devem contribuir na elucidação do comportamento das espécies.

5.4. Filmes 3D-impressos de hidrogéis contendo AuNP decoradas com TPPS

A impressão 3D dos filmes foi realizada com o intuito de confeccionar uma forma de aplicação cutânea, visto que as AuNP decoradas com TPPS se encontram em forma de dispersão líquida. A técnica de extrusão de semissólidos, utilizada para impressão dos filmes, possibilita a impressão de um hidrogel contendo a dispersão de AuNP@TPPS na matriz polimérica e tem como resultado um filme 3D-impresso customizado, maleável e resistente para futuras aplicações cutâneas.

Os filmes impressos (Figura 12) tiveram uma massa média de $0,193 \text{ g} \pm 0,051$ ($n = 3$) após secos, com dimensões de $15 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$ e altura de $1,5 \text{ mm}$. Para análise da presença das AuNP e AuNP@TPPS na matriz polimérica, os espectros na região do UV-Vis para amostras sólidas estão apresentados na Figura 11. É possível observar que a banda de ressonância plasmônica das AuNP está presente na mesma região do espectro obtido para a dispersão aquosa mesmo após um processo de adição a um sistema mais complexo e semissólido, demonstrando que a incorporação na rede polimérica foi bem sucedida e sem coalescência aparente, sendo possível

também observar as bandas Soret e Q da porfirina.

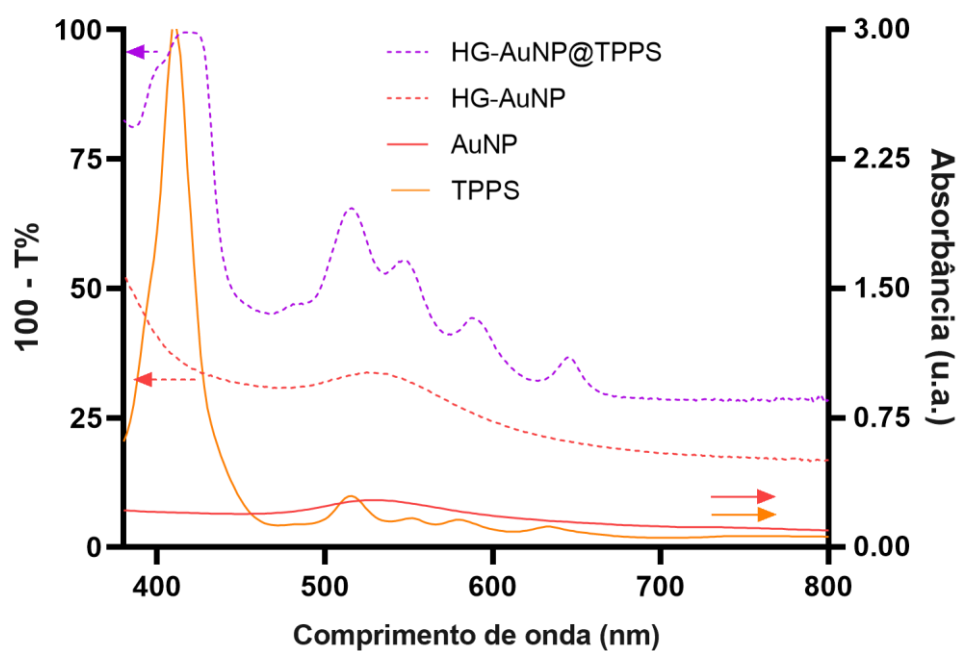


Figura 11: Espectro na região do UV-Vis para amostras sólidas e líquidas.

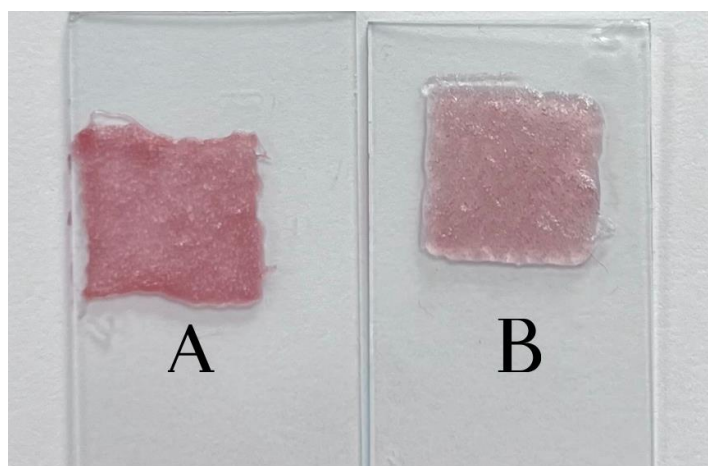


Figura 12: Fotografia dos filmes após impressão, sendo A contendo AuNP@TPPS e B contendo AuNP.

6. CONCLUSÕES

A síntese de uma dispersão de nanopartículas de ouro com a utilização de CTAB como agente estabilizante ocorreu de forma bem sucedida como comprovado pelos ensaios de espectro na região do UV-Vis, com banda centrada no comprimento de onda de ca. 525 nm, e pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão, que possibilitaram a comprovação da síntese de nanopartículas esféricas de $2,4 \text{ nm} \pm 1,0 \text{ nm}$ ($n = 43$).

Com as análises de interações de AuNP quando decoradas com TPPS foi possível observar as mudanças espectroscópicas das bandas Soret e Q características da porfirina TPPS quando em combinação com as AuNP, e com base em dados da literatura concluiu-se que a TPPS encontrava-se em sua forma desprotonada (dois nitrogênios protonados e dois desprotonados) quando combinada a AuNP. Porém, necessita-se de análises de fluorescência para um maior esclarecimento se as interações são do tipo Au/TPPS ou CTAB/TPPS. A capacidade oxidante da formulação de AuNP@TPPS foi estudada por medida indireta utilizando um ensaio adaptado de capacidade antioxidante do ácido ascórbico pelo método DPPH e possibilitou identificar um efeito de inibição da atividade antioxidante do ácido ascórbico pela pré-incubação com AuNP@TPPS, sugerindo uma oxidação prévia do ácido ascórbico promovida pela AuNP@TPPS.

Por fim, ocorreu a formulação de uma tinta dos biopolímeros quitosana e goma guar contendo AuNP@TPPS, realizando a posterior impressão 3D por técnica de extrusão de semissólidos dos filmes. O trabalho conclui-se com a obtenção bem sucedida de AuNP decoradas com a porfirina meso-tetra(4-sulfonato-fenil)porfirina-tetraamino, com estudos da interação e da atividade pró-oxidante das espécies combinadas, bem como da possibilidade de obtenção de filmes 3D-impressos, com potencial para estudos futuros no tratamento de câncer de pele do tipo melanoma.

PERSPECTIVAS

Este trabalho de conclusão de curso abriu perspectivas de estudos como:

- Para maiores esclarecimentos do comportamento da porfirina TPPS frente as AuNP seria importante realizar ensaios de fluorescência, para distinguir os comportamentos atrelados a interação CTAB/TPPS e Au/TPPS e elucidar o comportamento espectroscópico observado;
- Há a necessidade de ampliar a gama de concentrações de TPPS em diluição com as AuNP, para analisar mais pontos nas medidas de potencial zeta e observar as relações de trocas de carga de superfície da nanopartícula que ocorrem.
- A metodologia desenvolvida para as medidas de atividade oxidante utilizando um ensaio indireto de DPPH• frente ao ácido ascórbico necessita de aprimoramentos e maior gama de ensaios para validação do método, como medidas com ácido ascórbico e TPPS sem a presença de AuNP para avaliar diferenças, diferentes concentrações de ácido ascórbico frente à AuNP@TPPS e também estudar qual o efeito que a presença/ausência de luz poderia acarretar. Além de necessitar de medidas diretas de produção de espécies reativas de oxigênio, até com o intuito de comparação de métodos.
- Após a impressão, um estudo importante seria a avaliação da liberação das nanopartículas decoradas com porfirina em diferentes meios para avaliação de como ocorreria a difusão/liberação de ERO através da matriz polimérica.

REFERÊNCIAS

- [1] DAKUBO, G. D. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer. Em: **Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects**. Nova Science Publishers, Inc., 2010. p. 99–116.
- [2] KARAMPINIS, E. et al. **Systemic oxidative stress parameters in skin cancer patients and patients with benign lesions**. *Stresses*, v. 3, n. 4, p. 785–812, 2023.
- [3] CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. **Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization**. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.
- [4] KOU, J.; DOU, D.; YANG, L. **Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications**. *Oncotarget*, v. 8, n. 46, p. 81591–81603, 2017.
- [5] **Indicadores de oncologia em geral**. Disponível em: <https://observatoriodeoncologia.com.br/indicadores/2024/indicadores-de-oncologia-em-geral/>. Acesso em: 10 abr. 2024.
- [6]] DISNER, E. **Mortes por melanoma no Brasil podem aumentar 80% em duas décadas, aponta Cancer Tomorrow, da OMS**. Disponível em: <https://sbco.org.br/atualizacoes-cientificas/mortes-por-melanoma-no-brasil-podem-aumentar-80-em-duas-decadas-aponta-cancer-tomorrow-da-oms/>. Acesso em: 28 maio. 2024.
- [7] HENDRIX, M. J. C. et al. **Molecular plasticity of human melanoma cells**. *Oncogene*, v. 22, n. 20, p. 3070–3075, 2003.
- [8] HERSEY, P.; ZHANG, X. D. **How melanoma cells evade trail-induced apoptosis**. *Nature reviews. Cancer*, v. 1, n. 2, p. 142–150, 2001.

- [9] KHAN, F. U. et al. **Visible light inactivation of E. coli, Cytotoxicity and ROS determination of biochemically capped gold nanoparticles.** Microbial pathogenesis, v. 107, p. 419–424, 2017b.
- [10] BAPTISTA, P. et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 3, p. 943–950, 2008.
- [11] KARNWAL, A. et al. **Gold nanoparticles in nanobiotechnology: From synthesis to biosensing applications.** ACS omega, v. 9, n. 28, p. 29966–29982, 2024.
- [12] ZHAO, M. et al. **Suicide gene therapy using nanoparticles carrying the HSVtk gene and prodrug.** Nature Medicine, v. 7, n. 11, p. 1241–1245, 2001.
- [13] KULKARNI ARANYA, A. et al. Antibacterial and bioactive coatings on titanium implant surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 105, n. 8, p. 2218–2227, 1 ago. 2017.
- [14] XIE, J.; LEE, S.; CHEN, X. **Nanoparticle-based theranostic agents.** Advanced drug delivery reviews, v. 62, n. 11, p. 1064–1079, 2010.
- [15] TORRES, C. S.; SHAEFFER, L. **Efeito da moagem de alta energia na morfologia e compressibilidade do compósito WC-Ni.** Matéria (Rio de Janeiro), v. 15, n. 1, p. 88– 95, 2010.
- [16] JOSHI, N.; RAWAT, K.; BOHIDAR, H. B. **Characterization of microstructure, viscoelasticity, heterogeneity and ergodicity in pectin-laponite-CTAB-calcium nanocomposite hydrogels.** Carbohydrate Polymers, v. 136, p. 242–249, 20 jan. 2016.
- [17] MUNDEKKAD, D.; CHO, W. C. **Nanoparticles in clinical translation for cancer therapy.** International journal of molecular sciences, v. 23, n. 3, p. 1685, 2022.

- [18] KHAN, Z. et al. Effects of shape-controlling cationic and anionic surfactants on the morphology and surface resonance plasmon intensity of silver@copper bimetallic nanoparticles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 275, p. 354–363, 1 fev. 2019.
- [19] **Plasmonic color engineering.** Disponível em: <https://nanocomposix.com/pages/color-engineering>. Acesso em: 7 nov. 2024.
- [20] EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. **Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes.** Chemical Society Reviews, v. 35, n. 3, p. 209–217, 28 fev. 2006.
- [21] HE, Y.-P.; TAN, Y.-X.; ZHANG, J. **Functional metal–organic frameworks constructed from triphenylamine-based polycarboxylate ligands.** Coordination chemistry reviews, v. 420, n. 213354, p. 213354, 2020.
- [22] WANG, X. et al. **Phenylboronic acid-mediated tumor targeting of chitosan nanoparticles.** Theranostics, v. 6, n. 9, p. 1378–1392, 2016.
- [23] MAMMARI, N. et al. **Current knowledge on the oxidative-stress-mediated antimicrobial properties of metal-based nanoparticles.** Microorganisms, v. 10, n. 2, p. 437, 2022.
- [24] OKOAMPAH, E. et al. **Gold nanoparticles–biomembrane interactions: From fundamental to simulation.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Elsevier B.V., 1 dez. 2020.
- [25] GUTERRES, K. B. et al. **Metal center ion effects on photoinactivating rapidly growing mycobacteria using water-soluble tetra-cationic porphyrins.** BioMetals, v. 33, n. 4–5, p. 269–282, 1 out. 2020.
- [26] VENKATESH, Y. et al. **Ultrafast Time-Resolved Emission and Absorption Spectra of meso-Pyridyl Porphyrins upon Soret Band Excitation Studied**

- by Fluorescence Up-Conversion and Transient Absorption Spectroscopy.** Journal of Physical Chemistry B, v. 120, n. 35, p. 9410–9421, 8 set. 2016.
- [27] BASSO, G. et al. **Photodynamic inactivation of selected bovine viruses by isomeric cationic tetra-platinated porphyrins.** Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, v. 23, n. 9, p. 1041–1046, 1 set. 2019.
- [28] MACHADO, A. E. DA H. **Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas.** Quimica nova, v. 23, n. 2, p. 237–243, 2000.
- [29] DOS SANTOS, J. et al. **3D printing and nanotechnology: A multiscale alliance in personalized medicine.** Advanced functional materials, v. 31, n. 16, p. 2009691, 2021.
- [30] GOPINATHAN, J.; NOH, I. **Recent trends in bioinks for 3D printing.** Biomaterials research, v. 22, n. 1, p. 11, 2018.
- [31] AUFFAN, M. et al. **Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective.** Nature nanotechnology, v. 4, n. 10, p. 634–641, 2009.
- [32] PANIGRAHI, S. et al. **Synthesis and size-selective catalysis by supported gold nanoparticles: Study on heterogeneous and homogeneous catalytic process.** Journal of Physical Chemistry C, v. 111, n. 12, p. 4596–4605, 29 mar. 2007.
- [33] KALYANASUNDARAM, K. **Photophysics, photochemistry and solar energy conversion with porphyrin-type compounds.** Coordination Chemistry Reviews, v. 46, p. 159–244, 1982.
- [34] NASRI, H. **Porphyrins and Metalloporphyrins : An Overview.** 2020 IEEE International Conference on Design & Test of Integrated Micro & Nano-Systems (DTS). **Anais...IEEE**, 2020.

- [35] GONÇALVES, J. L. S.; DEDA, D. K.; TOMINAGA, T. T. **Agregação da porfirina aquo-solúvel meso-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirina na presença da albumina de soro bovino.** Revista Ciências Exatas e Naturais, Guarapuava, v. 11, n. 2, p. 192-208, 2009.
- [36] YANG, A. et al. **One-pot synthesis of ternary hybrid nanomaterial composed of a porphyrin-functionalized graphene, tin oxide, and gold nanoparticles, and its application to the simultaneous determination of epinephrine and uric acid.** Microchimica Acta, v. 182, n. 1–2, p. 341–349, 1 jan. 2015.
- [37] BERA, K. et al. **Porphyrin-Gold Nanomaterial for Efficient Drug Delivery to Cancerous Cells.** ACS Omega, v. 3, n. 4, p. 4602–4619, 30 abr. 2018.
- [38] TOMINAGA, T. T.; DEDA, D. K.; BORGES, C. P. F. **Estudos espectroscópicos da porfirina aniônica hidrossolúvel meso-tetrakis (p-fenilsulfonato) em meio micelar.** Revista Ciências Exatas e Naturais, Guarapuava, v. 9, n. 1, p. 10-21, 2007.

ANEXO I

Tabela 1: Otimização da composição para síntese de nanopartículas de ouro (* $[\text{NaBH}_4] = 1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$).

Amostra	[Au] (mol L ⁻¹)	V _{Au} (mL)	n _{Au} (μmol)	m _{CTAB} (g)	n _{CTAB} (μmol)	V _{solvente} (mL)	V _{NaBH₄*} (mL)	n _{NaBH₄} (mol)	V _{total} (mL)	Coloração	Estabilidade
1	5,6×10 ⁻⁴	5	2,8	0,0473	130	5	1	10	11	vermelho alaranjado	instável
2	5,6×10 ⁻⁴	5	2,8	0,0473	130	5	3	30	13	laranja	instável
3	5,6×10 ⁻⁴	5	2,8	0,0473	130	5	5	50	15	vermelho rubi	estável
4	2,0×10 ⁻²	1	20	0,0946	260	10	5	50	16	castanho	instável
5	2,0×10 ⁻²	1	20	0,0946	260	5	3	30	9	castanho	instável
6	2,0×10 ⁻²	1	20	0,0364	100	5	3	30	9	castanho alaranjado	instável
7	2,0×10 ⁻²	2,5	50	0,450	123	20	10	100	32,5	vermelho rosado	instável
8	5,6×10 ⁻⁴	1	0,56	0,0364	100	50	5	50	56	alaranjado	instável
9	2,0×10 ⁻²	1	20	0,0623	170	50	5	50	56	alaranjado	instável
10	2,0×10 ⁻²	5	100	0,0364	100	50	5	50	60	castanho	instável
11	5,6×10 ⁻⁴	5	2,8	0,0501	137	5	5	50	15	castanho escuro	instável

Tabela 2: Análise do potencial zeta de AuNP/CTAB ($[\text{CTAB}] = 8,65 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com diferentes volumes de TPPS ($[\text{TPPS}] = 6,88 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

Amostra	$n_{\text{TPPS}} / n_{\text{CTAB}}$	$V_{\text{AuNP}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{TPPS}} (\mu\text{L})$	$V_{\text{final}} (\text{mL})$	Potencial zeta (mV)
A	0,32	50	20	5,0	+34,66
B	0,40	50	25	5,0	+35,86
C	0,52	50	33	5,0	+33,05
D	0,80	50	50	5,0	+33,20
E	1,59	50	100	5,0	+26,97
F	3,18	50	200	5,0	+10,30
G	4,77	50	300	5,0	-35,84
H	6,36	50	400	5,0	-36,16

Tabela 3: Titulação espectroscópica de TPPS ($[\text{TPPS}] = 7,63 \text{ umol L}^{-1}$) com variação de volumes de AuNP.

$V_{\text{AuNP}} (\mu\text{L})$	$n_{\text{TPPS}} (\text{nmol})$	$n_{\text{CTAB}} (\text{nmol})$	$n_{\text{TPPS}} / n_{\text{CTAB}}$	$N_{\text{CTAB}} / n_{\text{TPPS}}$
50	11,4	216	0,053	~ 20
100	11,4	432	0,026	~ 40
150	11,4	648	0,018	~ 60
200	11,4	864	0,013	~ 80
250	11,4	1080	0,010	~ 100

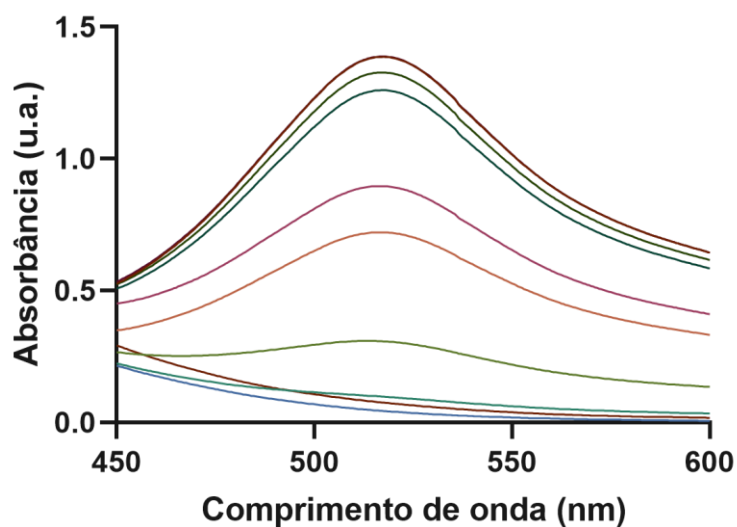


Figura A1: Espectros obtidos na região de absorção do radical DPPH para o ensaio com concentrações crescentes de ácido ascórbico (0 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

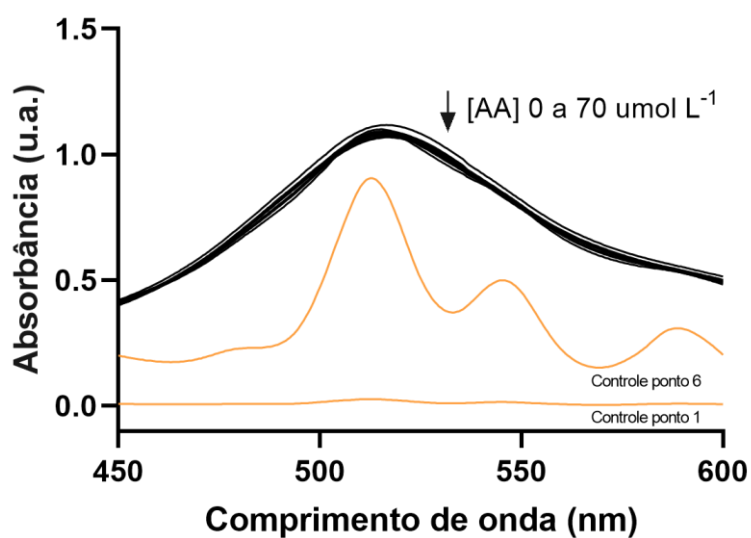


Figura A2: Espectros obtidos na região de absorção do radical DPPH para o ensaio com concentrações crescentes de ácido ascórbico (0 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$) previamente incubado com AuNP@TPPS por 60 min. Uma curva contendo ácido ascórbico e AuNP@TPPS em concentrações equivalentes ao ponto 1 e ponto 6 na ausência de DPPH está apresentada como controle.