



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL INJETÁVEL CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA PARA LIBERAÇÃO SIMULTÂNEA DE
DOXORRUBICINA E QUERCETINA

SANIERLLY DA PAZ DO NASCIMENTO

SAPIENTIA ÆDIFICAT

João Pessoa – PB – Brasil

Dezembro/2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL INJETÁVEL CONTENDO
NANOPARTÍCULAS DE ZEÍNA PARA LIBERAÇÃO SIMULTÂNEA DE
DOXORRUBICINA E QUERCETINA

SANIERLLY DA PAZ DO NASCIMENTO*, **

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Antonia Lucia de Souza
2º orientador: Michael J. Serpe

*Bolsista CAPES

**Bolsista CAPES/Print na University of Alberta, Edmonton, AL, CA.

João Pessoa - PB – Brasil

Dezembro/2024

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

N244d Nascimento, Sanierlly da Paz do.
Desenvolvimento de hidrogel injetável contendo nanopartículas de zeína para liberação simultânea de doxorrubicina e quercetina / Sanierlly da Paz do Nascimento. - João Pessoa, 2024.
132 f. : il.

Orientação: Antônia Lúcia de Souza.
Coorientação: Michael J. Serpe.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

1. Hidrogéis injetáveis. 2. Fármacos - liberação simultânea. 3. Nanopartículas de zeína. 4. Doxorrubicina. 5. Quercetina. 6. Câncer - tratamento.
I. Souza, Antônia Lúcia de. II. Serpe, Michael J. III.
Título.

UFPB/BC

CDU 544.773.432(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Ata da Sessão Pública para avaliar a Defesa do Trabalho de Tese de Doutorado da discente **Sanierly da Paz do Nascimento**, submetida à obtenção do grau de Doutora em Ciências, na **Área de Concentração em QUÍMICA ORGÂNICA**, do Curso de Doutorado deste Programa de Pós-Graduação em Química, do CCEN/UFPB, realizada no dia 18 de dezembro de 2024.

Aos dezoito dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e quatro, a partir das quatorze horas da tarde em modelo de webconferência no endereço eletrônico **Link: https://meet.google.com/dtf-etdn bfm**, divulgado amplamente por e-mail e no SIGAA/UFPB, reuniram-se em cerimônia pública os membros da Banca Examinadora de Defesa de Tese de Doutorado constituída na forma e termos do Artigo 82º do Regulamento Geral dos Programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Federal da Paraíba, composta pelos professores: **Dra. Antonia Lúcia de Souza**, Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza do Departamento de Química, João Pessoa-PB, Orientadora e Presidente da Banca Examinadora; **Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão**, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Recife-PE. (Examinadora externa); **Dr. Fábio Correia Sampaio**, Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde - Campus I, Departamento de Odontologia Clínica e Social, João Pessoa-PB. (Examinador externo); **Dr. Claudio Gabriel Lima Junior**, Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza do Departamento de Química, João Pessoa-PB (Examinador interno) e **Dr. Júlio Santos Rebouças**, Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza do Departamento de Química, João Pessoa-PB (Examinador interno) a fim de examinarem a discente **Sanierly da Paz do Nascimento** ao grau de Doutora em Ciências, com área de concentração em **QUÍMICA ORGÂNICA**. Além dos examinadores e da examinada, compareceram remotamente na webconferência, representantes do corpo docente e do corpo discente. Iniciando a sessão, a professora **Dra. Antonia Lúcia de Souza**, na qualidade de Presidente da referida banca examinadora, comunicou aos presentes qual o fim da reunião e os procedimentos de encaminhamentos da mesma. A seguir, concedeu à palavra a discente para que fizesse oralmente a apresentação do seu trabalho de Tese de Doutorado, sob o título **“Desenvolvimento de hidrogel injetável contendo nanopartículas de zeína para liberação simultânea de doxorrubicina e quer cetina”**. Concluída a sua apresentação, a senhora presidente solicitou que fosse feita a arguição por cada um dos membros examinadores. Após o que, foi concedida a palavra a discente para que respondesse e esclarecesse as questões levantadas. Terminadas as arguições a Banca Examinadora, passou-se a proceder à avaliação e julgamento da discente. Em seguida, a senhora presidente declarou que a Banca Examinadora considerou, segundo o Artigo 83º do Regulamento Geral dos Programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, da Universidade Federal da Paraíba, **Aprovado** o trabalho de Tese de Doutorado apresentada e defendida pela discente **Sanierly da Paz do Nascimento**, concedendo-lhe, assim, o grau de **Doutora em Ciências**, com área de concentração em **QUÍMICA ORGÂNICA**. Logo após a avaliação da banca examinadora, a orientadora preencherá um formulário juntamente com o Relatório Final do Trabalho de Tese de Doutorado, a fim de que o mesmo seja homologado pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química. Este trabalho teve como 2º orientador Dr. Michael Joseph Serpe, University of Alberta – Canadá, que não pode participar da cerimônia de defesa por motivos técnicos. E, para constar, eu, **Dr. Marcos Antonio Gomes Pequeno**, secretário, lavrei a presente Ata, que assino junto com os membros da Comissão Examinadora. João Pessoa, 18 de dezembro de 2024. Segue a ata com as assinaturas de:

Documento assinado digitalmente

gov.br

ANTONIA LUCIA DE SOUZA

Data: 05/02/2025 19:54:25-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Marcos Antonio Gomes Pequeno
Secretário do PPGQ

Documento assinado digitalmente

gov.br

GARDENIA CARMEN GADELHA MILITAO

Data: 09/02/2025 09:03:50-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Gardenia Carmem Gadelha Militão
Examinadora externa

Documento assinado digitalmente

gov.br

JULIO SANTOS REBOUCAS

Data: 09/02/2025 17:14:43-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças
Examinador interno

Profa. Dra. Antonia Lucia de Souza
Orientadora

Documento assinado digitalmente

gov.br

FABIO CORREIA SAMPAIO

Data: 15/02/2025 22:57:04-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Examinador externo

Documento assinado digitalmente

gov.br

CLAUDIO GABRIEL LIMA JUNIOR

Data: 09/02/2025 17:48:07-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Claudio Gabriel Lima Junior
Examinador interno

Dedico este trabalho a todos que enfrentam o câncer e aos que buscam, na ciência, formas de tornar os tratamentos mais eficazes e menos cruéis.

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, a **Deus** pela oportunidade, força, esperança, saúde e vida.

À mainha, **Cida Paz**: sem a senhora e sua contínua contribuição, essa jornada não seria possível; e à minha irmã, **Sandy Paz**, por sempre acreditar em mim. E a painho, **Basto**, por celebrar comigo essa conquista. Amo vocês!

Ao meu grande companheiro de vida, meu esposo **Pablo Diego**. Obrigada por extrair e querer o melhor de mim. Obrigada por me ouvir, aconselhar e partilhar os melhores e piores momentos da minha vida. Te amo! *We're a beautiful thing together.*

Aos demais colaboradores diretos e indiretos desta tese durante minha vivência como pesquisadora em formação:

À **Dra. Antonia Lucia de Souza**, minha orientadora, por ter acreditado no meu potencial e por me ajudar a chegar até aqui. Obrigada pela parceria que criamos durante esses anos. Não foi nada fácil, mas quem disse que seria?

I would like to thank **Dr. Michael Serpe**, my second Ph.D. Supervisor. Mike is an extraordinarily kind, wise, and practical human being. Thank you for accepting to supervise me when in Canada and for your support after my return to Brazil. I have learned so much from you. It's been such an honor having you by my side.

To the 2020 Serpe group: **Haley, Varalika, Nick, Yu, Alyssa, Changhao, Faisal, Qiming, Katrina, Yingnang, Keith, and Clay**. Haley and Nick were the most amazingly helpful people I met during my stay in Canada. To **my Canadian family, the Koehns**, for making Pablo and me part of their family during our stay in Canada and for visiting us in Brazil last year. I miss you guys!

To the NMR personnel: **Dr. Ryann McKay, Mark Miskolzie, and Nupur**, for all the knowledge shared and patience. Also, to UofA analytical facilities personnel for the analyses. Bem como aos técnicos **Marcelo e Evandro (LMCA)**, por todo o apoio nas análises de RMN aqui na UFPB e principalmente na obtenção de nitrogênio líquido, bem como à **Natasha Diniz (LTSAN)** pelas análises de textura e reometria, ao pessoal do **LABFILM (CEAR)** e **LSCP (CT)** pelas análises térmicas. Agradeço também a **Saulo e Ginetton (LACOM)** pela paciência e parceria no dia a dia das análises no Lacom, e a Ginetton especialmente pela confiança de ter me instruído na espectroscopia de absorção atômica. A chegada de vocês fez a diferença! E a querida **Adna**, que com sua presença acolhedora torna os dias de todos os melhores.

Aos meus conterrâneos brasileiros, que tornaram meu intercâmbio (em meio a uma pandemia) mais leve: **Drs. Dan, Lívia, Mayara e Ivana**. Muito obrigada pela ajuda antes, durante e depois do intercâmbio. Vocês são pessoas iluminadas!

Ao **Dr. Elizeu**, que sempre acolheu minhas dúvidas, inquietações e questionamentos no Lacom. Você merece realizar todos os seus sonhos!

À **Dra. Dayene Lírio**, que se tornou uma querida aliada e amiga para leituras, filmes, séries, comidas, discussões filosóficas e científicas. Que surpresa maravilhosa ter tido sua

companhia nesse fim de ciclo! Uma amizade inesperada para a qual eu não sabia que estava preparada. Sucesso é pouco perto do que desejo a ti!

Às Dras. **Erica Monção e Sabrina Duarte**, que conheci na finaleira, mas que vieram para acrescentar, inspirar e não me deixar desistir. Estenderam nossa parceria em seus trabalhos e vidas. Dra. **Laís Chantelle**, pela paciência e gentileza de instruir na espectroscopia de infravermelho. Dra. **Cris Grisi**, te admiro e adoro nossas conversas. Obrigada por todo o suporte. Torço muito pelo seu sucesso!

Aos meus companheiros de laboratório e de pós-graduação: **Layanny, Fernanda, Carlos, Renata, Sarah Inglid, Juliana Montenegro, Túlio, Priscila, Lucas, Lidiane, Wanderson, Jhonatas, Janailda, Luan, Lanna, Nayara, Marcella, Fabrícia, Jéssica Santana, Jéssica Alves, Thiago, Cybelle, Pedro, Adriana Nunes, Flaviana, Clebson, Kiko, Willyan, Igor, Paloma Abrantes, Kataryne e Carlos (UFC)**, pelas trocas, aprendizados compartilhados, momentos de desabafo e almoços divertidos.

Ao meu colega da engenharia química que se tornou um parceiro de pesquisa, **Luzidelson Baracho**, que me deu a oportunidade de coorientar seus alunos do IFPB Santa Rita, a **Jessy**, a **Marina** e o **Igor**. Foi gratificante demais trabalhar com vocês!

À **Bruna Alves**, pela amizade e pelos momentos de estudo e perrengues compartilhados. A colérica aqui ficou muito feliz de encontrar outra, podendo contribuir e aprender tanto contigo. Agradeço também às mais recém-chegadas, mas que já conquistaram seu espaço, **Sara Brito e Rita Andrade**. Obrigada pelas pequenas gentilezas ofertadas em meio a rotina de experimentos. Aprendo muito com vocês!

Agradeço, em especial, às minhas companheiras de graduação e pós-graduação. **Elaine Pereira**, minha irmã de orientação desde o mestrado, obrigada pelas trocas sobre Deus, a vida e a jornada acadêmica. E **Renata Magalhães**, que, com seu exemplo, sempre me impulsionou a estudar e a dar o meu melhor.

To **Kyla Louise**, for being the wonderfully encouraging person that you are. Working with you has allowed me to step up and fully experience this journey. You are the best! Thanks for all the love, patience, and support!

À **minha terapeuta**, por me ajudar a enfrentar os desafios e organizar as ideias nesta jornada contínua de autoconhecimento e crescimento.

Aos professores do Lacom com quem tive contato em algum momento: **Ieda**, a senhora é uma referência desde a graduação, suas aulas são espetaculares; obrigada por seu trabalho como coordenadora do Lacom na maior parte do tempo em que fiz meus experimentos. **Ary e Gardênia**, pelas aulas, respostas aos meus questionamentos e contribuição com matérias-primas. Professoras **Ana Paula**, por sua história inspiradora; **Ângela e Nataly**, pelo exemplo de colaboração, e, em especial, pelo auxílio na realização de experimentos essenciais, como a reologia com a técnica Natasha. Meu muito obrigada!

Aos professores do PPGQ, representados por **Júlio Rebouças e Cláudio Jr.**, professores e pesquisadores fantásticos que compuseram a banca da minha tese desde a qualificação. Muito obrigada pelas contribuições e pelo auxílio com os aparelhos experimentais.

Aos professores **Fausthon** por sua contribuição no artigo dessa tese e **Dayse** por ter aceitado o convite de suplente desde a qualificação, além disso, por também contribuíram para minha formação e por terem trazido um sopro de jovialidade para as aulas do corpo docente. Agradeço também ao professor **Sávio** pelas discussões e contribuições teóricas e práticas sobre a docência que pude experimentar em um semestre de aulas online. Ao professor **Cosme**, pelo apoio técnico e estrutural na realização dos experimentos mais cruciais desta tese, da mesma forma ao professor **Wagner** pela confiança na operação do Zetasizer; ao professor **Petrônio**, pelo auxílio com matérias-primas e pelas conexões importantíssimas para a conclusão dos experimentos. Professoras **Neide Queiroz** e **Claudia Cristiano**, pelas contribuições em meu seminário geral.

Agradeço também a **Ramon Marques** (meu braço direito na farmácia) e aos professores **Humberto Xavier** e **Marianna Sobral** pela colaboração crucial com as análises farmacológicas e de liberação já na reta final deste trabalho, bem como aos professores **Marcos Vinícius** (UFBA) e **Marcelo Viana** (UFMG) pelas micrografias. O trabalho de cada um de vocês foi essencial para o sucesso da publicação internacional.

Aos professores **Fábio Sampaio (UFPB)** e **Gardenia Militão (UFPE)** por terem aceitado contribuir com o trabalho compondo banca avaliadora externa, bem como à Professora **Josivanda Palmeira Gomes (UFPE)** pelo aceite do convite de suplente.

Agradeço ao secretário do PPGQ, **Marcos Pequeno**, por cuidar dos meus papéis e, mais que isso, dos papéis de todos do PPGQ. Haja papel! À **Dona Jô, Fernando e Luana**, pelos momentos compartilhados no dia a dia no Lacom. Vocês são demais!

À agência de fomento **CAPES e ao Programa Institucional de Internalização da UFPB (CAPES/PrInt – UFPB)**, por oportunizarem minha pesquisa e minha vivência em outra cultura. Além da **FINEP, FAPESQ-PB, INCT-CiMol** e do **CNPq**, que fomentam atividades e infraestrutura do Lacom, do DQ e do PPGQ-UFPB.

Embora essa jornada de experimentos e escrita tenha sido por muitas vezes de esforço solitário, não cheguei até aqui sozinha. A cada um de vocês, meu muito obrigada!

*“Some opportunities are usually disguised as hard work,
so most people don’t recognize them”.*

Ann Landers

*“What you get by achieving your goal is not as important as
what you become by achieving your goal.”*

Zig Ziglar

Prefácio

A jornada que culmina nesta tese é o resultado de anos de aprendizado, desafios e descobertas, tanto acadêmicas quanto pessoais. Sou conhecida como Sani, e minha trajetória começou com a graduação e o mestrado em engenharia química. Desde o início, senti um chamado à docência, a ponto de ponderar trocar para licenciatura em química. No entanto, minha natureza engenhosa e a inspiração de um orientador que conectava com maestria todas as disciplinas do curso, me impulsionaram a seguir em frente e concluir o curso. Colei grau em separado para ingressar o quanto antes na pós-graduação com uma sede de conhecimento que se tornou o alicerce da minha trajetória acadêmica.

Durante o mestrado, decidi explorar o trabalho experimental, e tive a oportunidade de ser orientada pela esposa do meu orientador do TCC, o que resultou no pedido de uma patente para um método de secagem de polpa de noni (*Morinda citrifolia*) por camada de espuma. Entretanto, a jornada não foi linear: a falta de bolsas no programa me levou a dar aulas de inglês por um ano, enquanto conciliava trabalho e estudo. Foi também o noni que despertou em mim o desejo de compreender a química responsável por suas propriedades medicinais, motivando-me a ingressar no PPGQ.

O doutorado, eu sabia que seria desafiador por estar em uma nova área, sem um PIBIC se quer de experiência e ter tampouco trabalhado com as técnicas que agora compõem esta tese. Ao ingressar no PPGQ, fui direcionada ao grupo da professora Antonia, onde juntas aprimoramos meu projeto inicial e conquistei uma bolsa, o que me permitiu me dedicar integralmente à pesquisa. Com a vivência de um mestrado sem bolsa, eu sabia o quanto essa oportunidade era preciosa.

Minha jornada tomou rumos ainda mais novos e desafiadores em 2020, quando fui contemplada com uma bolsa CAPES/PrInt-UFPB para desenvolver parte do projeto no Canadá. Lá, trabalhei no laboratório do professor Serpe, na Universidade de Alberta. Contudo, logo na minha primeira noite no país, veio a notícia que mudaria o mundo: a pandemia da Covid-19 havia sido decretada. Os meses seguintes foram marcados por quarentenas, lockdowns e incertezas, que transformaram minha experiência em uma prova de adaptabilidade e resiliência. Apesar das restrições, aproveitei o isolamento para estudar intensamente, planejar experimentos e engajar virtualmente com o grupo de pesquisa canadense. Mesmo com horários reduzidos no laboratório e interrupções frequentes, avancei nos experimentos e redigi capítulos da tese. Com a impossibilidade de explorar turisticamente o Canadá devido às restrições, foquei em conhecer técnicas, como o RMN, e fortaleci laços com o grupo e vizinhos que me acolheram tão bem.

De volta ao Brasil, os desafios continuaram e se intensificaram: faltavam reagentes, a infraestrutura apresentava problemas frequentes, havia atrasos nas entregas de materiais, e o laboratório superlotado, ainda sob protocolo de escala, dificultava o acesso aos equipamentos. Muitos experimentos foram interrompidos, refeitos ou mesmo adiados, ampliando a sensação de desânimo e solidão, especialmente por ser a única no departamento a realizar esse tipo de pesquisa. A mudança do projeto durante o período no Canadá trouxe novos desafios logísticos e experimentais, como a alteração da matriz polimérica, aumentando as dúvidas sobre estar no caminho certo. Apesar disso, o trabalho avançou. Concluí a etapa de preparação do sistema polimérico em 2023 e, em colaboração com pesquisadores da farmacologia, finalizamos os testes biológicos este ano, além de incluir análises microscópicas realizadas em parceria com outros pesquisadores. Entre prorrogações, ajustes e até rejeições de artigos por periódicos, mantive o foco, reestruturando o trabalho sempre que necessário. No meio desse percurso, enfrentei mais um período sem bolsa, o que me levou a retornar à escola de inglês e a prestar consultoria científica para uma empresa americana. Embora desafiador, esse período abriu novas possibilidades no *dry-lab*, onde tenho encontrado novas formas de crescer profissionalmente.

Apesar dos obstáculos, sou grata pelas oportunidades: trabalhar em laboratórios equipados, interagir com diversas culturas, aprimorar meu inglês e conduzir uma pesquisa interdisciplinar. Essa trajetória representou não só uma jornada acadêmica, mas um profundo crescimento pessoal e profissional.

O trabalho que apresento aqui reflete não apenas minha dedicação, mas também os muitos aprendizados e superações que me trouxeram até este momento. Espero que esse meu relato e, principalmente, esta tese inspire outros a trilhar suas próprias jornadas acadêmicas com curiosidade e determinação. E agora, ao final deste caminho, pergunto-me se finalmente poderei me apropriar das palavras de Flávio José e dizer: "Não sabe tu que eu já tirei leite de pedra?"



RESUMO

A toxicidade sistêmica representa um dos principais desafios da quimioterapia. A doxorrubicina (DOX), fármaco de primeira linha no tratamento do câncer de mama, tem seu uso restrito devido a efeitos adversos graves. A administração combinada de quimioterápicos, associada a sistemas de liberação local, pode reduzir essa toxicidade. Neste estudo, desenvolveu-se um hidrogel injetável de alginato de sódio oxidado (OSA) e gelatina (GEL) contendo nanopartículas de zeína para liberação simultânea de DOX e queracetina (QUE), encapsulada em nanopartículas (QNP). O estudo foi dividido em cinco etapas: (1) funcionalização do OSA por oxidação com periodato de sódio, caracterizada por espectroscopia de infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H); (2) obtenção de nanopartículas ocas de zeína revestidas com quitosana (HNPs), utilizando carbonato de sódio como template sacrificial, seguida do encapsulamento de QUE. As HNPs foram caracterizadas quanto ao tamanho, potencial zeta, difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (AFM), enquanto o encapsulamento de QUE foi avaliado por espectrofotometria UV-vis; (3) preparação do hidrogel injetável (OSAG) por reticulação via base de Schiff (10% m/v OSA e 15% GEL), com tempo de gelificação de $2,33 \pm 0,03$ minutos. O hidrogel foi caracterizado quanto às propriedades reológicas, morfológicas e de intumescimento, confirmado uma rede porosa estável, injetável e autorreparável. Foram desenvolvidos os sistemas OSAGX (contendo DOX), OSAGQ (contendo QUE) e OSAGC (contendo ambos); (4) liberação in vitro de DOX e QUE dos hidrogéis; (5) avaliação da citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7. A funcionalização do OSA foi confirmada por IV (bandas entre 1730 e 1739 cm^{-1} , características de aldeídos) e RMN 1H (sinais entre 5,15 e 5,4 ppm). As HNPs apresentaram tamanho médio de $195 \pm 0,44$ nm e as QNPs de $218,8 \pm 2,77$ nm, com morfologia esférica confirmada por MET e AFM. A capacidade e eficiência de encapsulamento das nanopartículas foram de $4,78 \pm 0,00\%$ e $67,32 \pm 0,06\%$, respectivamente. Os perfis de liberação in vitro em pH 6,8 e pH 7,4 demonstraram liberação de 81,2% e 9,7%, respectivamente, indicando perfis distintos para DOX e QUE. A citotoxicidade do OSAGX foi 4,66 vezes superior à da DOX isolada, enquanto o OSAGC apresentou um aumento de 20,7 vezes. A inclusão de QNPs reduziu o IC₅₀ do OSAGX de $0,071 \pm 0,039$ para $0,016 \pm 0,014\text{ }\mu\text{g/mL}$, evidenciando o efeito potencializador da QUE. Esses resultados indicam que hidrogéis de OSA e GEL são promissores para liberação simultânea de fármacos, podendo ser explorados em aplicações terapêuticas futuras, apesar da necessidade de investigações in vivo.

Palavras-chave: Hidrogéis injetáveis; Liberação simultânea; Nanopartículas de zeína; Doxorrubicina, Quercetina; Câncer.

ABSTRACT

Systemic toxicity is one of the major challenges of chemotherapy. Doxorubicin, a first-line drug for breast cancer treatment, is limited by severe adverse effects. The combined administration of chemotherapeutics, along with drug delivery systems for localized application in malignant tumors, may effectively reduce systemic toxicity. This study developed an injectable hydrogel based on oxidized sodium alginate (OSA) and gelatin (GEL), incorporating zein nanoparticles for the simultaneous release of doxorubicin (DOX) and quercetin (QUE), the latter encapsulated in nanoparticles. The study was structured into five stages: (1) functionalization of sodium alginate by oxidation with sodium periodate (OSA) and characterization using infrared spectroscopy (IR), proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), and heteronuclear single quantum coherence (HSQC) correlation; (2) synthesis of hollow zein nanoparticles coated with chitosan using sodium carbonate as a sacrificial template (HNPs), followed by quercetin encapsulation (QNPs). HNPs were characterized in terms of size, zeta potential, X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy (TEM), and atomic force microscopy (AFM). The encapsulation of quercetin was analyzed via UV-vis spectroscopy; (3) preparation of the injectable hydrogel (OSAG) via Schiff base crosslinking with a 10% (w/v) OSA and 15% gelatin ratio, achieving a gelation time of 2.33 ± 0.03 minutes. The hydrogel was characterized for rheological, morphological, and swelling properties. After confirming the formation of a stable, porous, injectable, and self-healing network, DOX and QNPs were incorporated, resulting in the following systems: hydrogel containing DOX (OSAGX), hydrogel containing quercetin (OSAGQ), and the composite hydrogel containing both therapeutic agents (OSAGC); (4) *in vitro* release study of DOX and QUE from OSAGX, OSAGQ, and OSAGC; (5) cytotoxicity evaluation of OSAG, OSAGX, OSAGQ, and OSAGC in MCF-7 breast cancer cells. OSA was identified by absorption bands between 1730 and 1739 cm^{-1} in the IR spectrum, characteristic of aldehydes, further confirmed by the emergence of signals between 5.15 and 5.4 ppm in the ^1H NMR spectrum. HNPs had an average size of 195 ± 0.44 nm, while QNPs measured 218.8 ± 2.77 nm, as confirmed by TEM and AFM, which also revealed the spherical morphology of HNPs. The nanoparticles exhibited an encapsulation capacity and efficiency of $4.78 \pm 0.00\%$ and $67.32 \pm 0.06\%$, respectively. *In vitro* release tests of DOX and QUE at pH 6.8 and 7.4 showed distinct release profiles, with 81.2% and 9.7% released, respectively. Cytotoxicity assays revealed a 4.66-fold increase in cytotoxic action with OSAGX. The composite hydrogel OSAGC exhibited an even greater increase, enhancing cytotoxicity by 20.7 times compared to free DOX. Furthermore, the inclusion of QNPs reduced the IC₅₀ of OSAGX from 0.071 ± 0.039 to 0.016 ± 0.014 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These results highlight the cytotoxicity-enhancing effect of the hydrogel system, broadening the applications of oxidized alginate–gelatin hydrogels for dual drug delivery. Although localized administration requires further *in vivo* investigation, *in vitro* findings suggest strong potential for future therapeutic applications.

Keywords: Injectable Hydrogels; Simultaneous Release; Zein Nanoparticles; Doxorubicin; Quercetin; Cancer.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 OBJETIVOS..... | 19 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 20 |
| 3.1 MATRIZ POLIMÉRICA DE HIDROGÉIS INJETÁVEIS | 21 |
| 3.1.1 Alginato de Sódio | 23 |
| 3.1.2 Gelatina | 28 |
| 3.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÉIS INJETÁVEIS | 28 |
| 3.2.1 Ligações covalentes dinâmicas - Bases de Schiff | 34 |
| 3.2.2 Interações hidrogel-agente terapêutico | 37 |
| 3.2.3 Produção de hidrogéis compósitos com nanopartículas | 39 |
| 3.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS, ESTRUTURAIS E REOLÓGICAS | 40 |
| 3.3.1 Comportamento reológico | 43 |
| 3.3.2 Propriedades físico-químicas | 45 |
| 3.4 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS | 46 |
| 3.4.1 Liberação de agentes terapêuticos | 48 |
| 3.4.2 Liberação simultânea de agentes terapêuticos | 50 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 57 |
| 4.1 MATERIAIS E REAGENTES..... | 58 |
| 4.2 OXIDAÇÃO DO ALGINATO | 58 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO ALGINATO OXIDADO | 59 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA | 60 |
| 4.5 OBTENÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE ZEÍNA | 60 |
| 4.5.1 Potencial zeta e tamanho de partícula | 60 |
| 4.5.2 Capacidade e eficiência de encapsulamento | 61 |
| 4.5.3 Espectroscopia de IV..... | 61 |
| 4.5.4 Difração de raios X (DRX) | 61 |
| 4.5.5 Caracterização morfológica..... | 62 |
| 4.6 PRODUÇÃO DO HIDROGEL..... | 62 |
| 4.7 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL | 63 |
| 4.7.1 Avaliação qualitativa..... | 63 |
| 4.7.2 Intumescimento e degradação | 63 |
| 4.7.3 Caracterização estrutural e térmica..... | 64 |

| | |
|---|------------|
| 4.7.4 Caracterização morfológica, mecânica e de textura..... | 65 |
| 4.8 Produção do hidrogel compósito e aplicação | 65 |
| 4.8.1 Análise <i>in vitro</i> da liberação dos agentes terapêuticos..... | 66 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 68 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO ALGINATO OXIDADO | 74 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE ZEÍNA..... | 76 |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL | 85 |
| 5.3.1 Avaliação qualitativa..... | 85 |
| 5.3.2 Caracterização estrutural | 87 |
| 5.3.3 Intumescimento e degradação | 89 |
| 5.3.4 Caracterização térmica..... | 92 |
| 5.3.5 Caracterização morfológica do hidrogel | 95 |
| 5.3.6 Caracterização mecânica e de textura | 96 |
| 5.4 APLICAÇÃO DO HIDROGEL..... | 98 |
| 5.4.1 Avaliação da liberação dos agentes terapêuticos <i>in vitro</i> | 98 |
| 5.4.2 Citotoxicidade <i>in vitro</i> | 100 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 102 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 103 |
| REFERÊNCIAS..... | 104 |
| Apêndice A..... | 129 |
| Apêndice B..... | 132 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Fragmento estrutural do alginato contendo blocos GG, MG e MM. Ligações glicosídicas destacadas em laranja..... | 24 |
| Figura 2 - Mecanismo da reação de oxidação do alginato em uma unidade monossacarídica..... | 26 |
| Figura 3 - Representação de possíveis estruturas das unidades oxidadas com a formação de hemiacetais..... | 27 |
| Figura 4 - Tipos de reticulações comuns na produção de hidrogéis injetáveis..... | 33 |
| Figura 5 - Mecanismo geral da formação de imina (base de Schiff). | 34 |
| Figura 7 - Mecanismo geral de formação das oximas, hidrazonas e acilhidrazonas. | 36 |
| Figura 7 - Esquema do processo utilizado na avaliação qualitativa de autorreparação de hidrogéis..... | 44 |
| Figura 8 - Esquema do método da inversão do tubo..... | 45 |
| Figura 9 –Aplicações biomédicas emergentes dos hidrogéis injetáveis..... | 47 |
| Figura 10 – Esquema geral do desenvolvimento dos hidrogéis..... | 57 |
| Figura 11 - Esquema reacional geral da oxidação do alginato de sódio. | 58 |
| Figura 12 - Espectro de absorção na região de IV do alginato e seus derivados oxidados (esquema reacional à direita)..... | 69 |
| Figura 13 - Espectros de RMN de ¹ H (400 MHz, D ₂ O) do alginato de sódio e derivado 280. | 71 |
| Figura 14 - Espectros HSQC (400 MHz, D ₂ O/DMSO-d ₆) de SA (a) e OSA 540 (b).. | 72 |
| Figura 15 - Curvas de TG, DTG e de DSC para SA (a) e OSA 540 (b) sob atmosfera de N ₂ (fluxo de 20 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ | 74 |
| Figura 16 - Espectros de IV de nanopartículas de zeína vazias (HNP) e suas materiais-primas: zeína e quitosana. | 78 |
| Figura 17 - Espectros de IV das (a) nanopartículas de zeína revestidas com quitosana, HNP e QNP e da (b) queracetina. | 79 |
| Figura 18 – DRX das nanopartículas de zeína HNP e QNP e de seus principais componentes..... | 80 |
| Figura 19 – TG/DTG/DTA das nanopartículas de zeína (a) vazias (HNP) e (b) com queracetina encapsulada (QNP) sob atmosfera de N ₂ (fluxo de 20 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ | 82 |
| Figura 20 – MET das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (HNP) utilizando um microscópio modelo JEM-2800. | 84 |
| Figura 21 – MET das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (HNP) utilizando um microscópio modelo G2–20 FEI SuperTwin. | 84 |
| Figura 22 – Micrografia das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (HNP) por AFM..... | 85 |
| Figura 23 – Imagens do teste de inversão do tipo para determinação do tempo de gelificação e apresentação do hidrogel no molde. | 86 |
| Figura 24 – a) Comportamento injetável e b) extrudível do hidrogel pré-formado, c) discos de hidrogel antes do teste de auto-reparo, d) teste de auto-reparo após 1 minuto e e) após 24 horas, e f) Capacidade de auto-reparo dos hidrogéis injetados. | 86 |

| | |
|--|----|
| Figura 25 – Espectros de IV da gelatina, alginato oxidado (OSA) e do hidrogel vazio (OSAG)..... | 88 |
| Figura 26 – Espectros IV do hidrogel e do hidrogel contendo nanopartículas de zeína. | 89 |
| Figura 27 – Grau de intumescimento do hidrogel vazio (OSAG) à temperatura ambiente..... | 90 |
| Figura 28 – Taxa de degradação do hidrogel vazio (OSAG) a 37°C..... | 91 |
| Figura 29 – TG/DTG e DSC do hidrogel vazio (OSAG) e seus componentes gelatina e alginato oxidado (OSA) sob atmosfera de N ₂ (fluxo de 20 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ | 92 |
| Figura 30 - TG/DTG e DSC das nanopartículas com queracetina encapsulada (QNP), do hidrogel contendo nanopartículas vazias (OSAGH) e nanopartículas com queracetina encapsulada (OSAGQ) sob atmosfera de N ₂ (fluxo de 20 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ | 93 |
| Figura 31 – Micrografias de MEV do a) hidrogel OSAG (vazio), b) poro do hidrogel contendo nanopartículas, c) hidrogel OSAG autorreparado e d) QNPs..... | 95 |
| Figura 32 – (a) Teste de varredura temporal e (b) teste de varredura dinâmica de frequência do hidrogel OSAG..... | 96 |
| Figura 33 – Liberação de QUE e DOX a partir do hidrogel compósitos (OSAGC) em pH 7,4 e pH 6,8: a) individualmente e b) combinados, respectivamente..... | 98 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 4.1 - Variação da concentração de alginato, grau de oxidação teórico do alginato e identificação dos derivados oxidados OSA..... | 59 |
| Tabela 5.1 - Rendimento em massa para cada reação de oxidação realizada..... | 68 |
| Tabela 5.2 - Atribuição das bandas de IV comuns aos alginatos..... | 70 |
| Tabela 5.3 - Dados da análise térmica para o SA sob atmosfera de N ₂ (fluxo de 20 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min. | 75 |
| Tabela 5.4 - Dados da análise térmica para o OSA 540 sob atmosfera de N ₂ (fluxo de 20 cm ³ /min) e razão de aquecimento de 10 °C/min. | 75 |
| Tabela 5.5 - Características das nanopartículas: Tamanho, Índice de Polidispersão (PDI) e ζ-Potencial. | 76 |
| Tabela 5.6 - Dados da análise térmica para a HNP sob atmosfera de N2 (fluxo de 20 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min | 82 |
| Tabela 5.7 - Dados da análise térmica para a QNP sob atmosfera de N ₂ (fluxo de 20 cm ³ /min) e razão de aquecimento de 10 °C/min. | 82 |
| Tabela 5.8 - Propriedades texturais do hidrogel vazio (OSAG)..... | 97 |
| Tabela 5.9 - IC50 das formulações obtidos por Meio do Ensaio MTT | 100 |

LISTA DE ABREVIATURAS

DOX – Doxorrubicina

QUE – Quercetina

HNP – Nanopartícula de zeína oca/vazia revestida com quitosana

QNP – Nanopartícula de zeína contendo quercetina revestida com quitosana

AS – Alginato de sódio

OSA – Alginato oxidado

OSAG – Hidrogel vazio de alginato oxidado e gelatina

OSAGH - Hidrogel de alginato oxidado e gelatina contendo HNP

OSAGQ - Hidrogel de alginato oxidado e gelatina contendo QNP

OSAGX - Hidrogel de alginato oxidado e gelatina contendo doxorrubicina

OSAGC - Hidrogel de alginato oxidado e gelatina contendo doxorrubicina e QNP

1 INTRODUÇÃO

A doxorrubicina (Adriamicina) é um dos quimioterápicos mais amplamente utilizados no tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo tumores sólidos e metastáticos¹. Sua eficácia terapêutica está associada a mecanismos como ligação ao DNA, inibição da topoisomerase II e indução de danos oxidativos por meio da geração de radicais livres². Esses mecanismos possibilitam a morte celular mesmo em baixas concentrações¹. Contudo, a toxicidade sistêmica desse agente limita sua aplicação clínica, podendo causar lesões irreversíveis em tecidos saudáveis e efeitos colaterais graves, como cardiotoxicidade³. Além disso, um desafio crítico no tratamento oncológico é a resistência adquirida por muitas células cancerígenas, fator responsável por cerca de 90% do insucesso terapêutico em pacientes com câncer avançado⁴.

Estratégias terapêuticas baseadas na combinação de agentes quimioterápicos com compostos bioativos vêm se mostrando promissoras⁵. Estudos recentes indicam que metabólitos naturais, como a quer cetina — um flavonoide com propriedades antioxidantes e anticancerígenas —, podem potencializar a ação de fármacos como a doxorrubicina^{6,7}. A quer cetina tem demonstrado efeitos benéficos ao reverter a resistência a múltiplos medicamentos e mitigar toxicidades associadas a esquemas quimioterápicos convencionais. Contudo, a baixa solubilidade aquosa e a limitada biodisponibilidade da quer cetina restringem sua aplicação direta, indicando a necessidade de sistemas avançados de liberação controlada.

Nesse cenário, hidrogéis injetáveis têm ganhado destaque como plataformas versáteis para administração de fármacos diretamente em tecidos tumorais⁸. Formados por reticulação química ou física, esses materiais poliméricos tridimensionais apresentam propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e alta capacidade de retenção de água⁹. A aplicação dos hidrogéis nos tecidos tumorais permite uma liberação localizada de agentes terapêuticos, o que minimiza os efeitos colaterais sistêmicos e melhora a eficácia clínica¹⁰. Além disso, a possibilidade de incorporar múltiplos fármacos em um único hidrogel oferece vantagens significativas, como o sinergismo terapêutico entre os agentes¹¹.

Polímeros naturais como alginato e gelatina têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de hidrogéis para aplicações biomédicas devido às suas características de biocompatibilidade e funcionalidade¹². O alginato oxidado, por

exemplo, obtido pela modificação química do alginato de sódio, permite sua utilização como agente reticulante em hidrogéis dinâmicos¹³. Já a gelatina, derivada do colágeno, apresenta propriedades adesivas que favorecem a interação com células, sendo ideal para aplicações na liberação de fármacos e engenharia de tecidos¹⁴. A reticulação desses polímeros pode ser feita por meio de reações de formação de Bases de Schiff, que oferecem vantagens como simplicidade, biocompatibilidade e estabilidade estrutural¹³.

A incorporação de nanopartículas em hidrogéis injetáveis representa um avanço significativo no campo da liberação localizada de fármacos¹⁵. As nanopartículas de zeína, uma proteína derivada do milho, têm sido amplamente estudadas devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e capacidade de encapsular compostos hidrofóbicos, como a queracetina^{16,17}. A combinação de hidrogéis e nanopartículas permite o desenvolvimento de sistemas compósitos com propriedades otimizadas para liberação simultânea de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, ampliando as possibilidades terapêuticas em tratamentos oncológicos.

Dessa forma, o presente estudo propôs o desenvolvimento de um hidrogel injetável para a liberação simultânea de doxorrubicina e queracetina, visando potencializar a citotoxicidade em células de câncer de mama. A combinação desses agentes terapêuticos em uma única matriz busca superar limitações como a resistência a múltiplos medicamentos e os efeitos adversos sistêmicos. A produção, caracterização e avaliação *in vitro* desse sistema inovador de liberação localizada têm o potencial de contribuir para avanços significativos na terapia oncológica, oferecendo soluções mais eficazes e menos invasivas para os pacientes.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese consistiu em produzir hidrogéis injetáveis baseados em alginato oxidado e gelatina para liberação individual e simultânea de doxorrubicina e quercetina.

De forma a alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- a) modificar estruturalmente e caracterizar o alginato de sódio com grupos aldeídos;
- b) preparar o hidrogel com alginato oxidado e gelatina;
- c) incorporar nanopartículas de zeína produzidas ao hidrogel;
- d) caracterizar química, reológica, morfológica, espectroscópica e estruturalmente os hidrogéis e as nanopartículas produzidos;
- e) avaliar a liberação *in vitro* (*pH* 6,8 e 7,4) individual e simultânea de doxorrubicina e quercetina;
- f) avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos hidrogéis compósitos produzidos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, apresenta-se o delineamento teórico que fundamenta a tese, com sínteses da literatura sobre: (i) o contexto histórico e evolução do campo de estudo, com ênfase nos hidrogéis relevantes para esta pesquisa; (ii) hidrogéis injetáveis e sua composição; (iii) métodos de produção e propriedades desse tipo de material; e (iv) suas aplicações biomédicas, especialmente na liberação de agentes terapêuticos, destacando suas particularidades e um quadro analítico com os principais avanços no estado da arte.

O termo “**hidrogel**” ganhou popularidade na literatura científica durante o século XX, referindo-se a estruturas tridimensionais hidrofílicas de polímeros capazes de reter grandes quantidades de água sem perder sua integridade estrutural^{18,19}. A pesquisa pioneira de Wichterle & Lím²⁰ levou ao desenvolvimento do primeiro hidrogel de poli (metacrilato de 2-hidroxietila) (p-HEMA), com **aplicação biomédica** em lentes de contato gelatinosas.

Ná década de 1980, surgiram os primeiros hidrogéis baseados em **polímeros naturais**, como colágeno da cartilagem de tubarão²¹ e formulados com microcápsulas de alginato de cálcio²². Biopolímeros, macromoléculas sintetizadas por organismos vivos ou derivadas de biomassa, se destacam por sua renovabilidade e biocompatibilidade^{23,24}. Posteriormente, entre as décadas de 1990 e 2000, avanços no entendimento da química dos polímeros e processos biológicos impulsionaram o desenvolvimento de hidrogéis que gelificam espontaneamente ***in situ***, permitindo transições de fase sol-gel em condições fisiológicas – *in vivo*^{25–27}.

Desde então, o progresso no campo dos hidrogeis tem abarcado melhorias na composição, na reticulação das matrizes poliméricas, e em propriedades mecânicas e morfológicas. Além disso, a **incorporação de nanopartículas** e outros componentes têm viabilizado a criação de hidrogéis compósitos, combinando características mecânicas e funcionalidade otimizadas para aplicações específicas. Por exemplo, hidrogéis com resposta combinada a pH e temperatura²⁸; matrizes fotopolimerizadas²⁹ para liberação de fármacos³⁰; e sistemas com que incorporam reticulações de *Click Chemistry*³¹, incorporação de nanopartículas de sílica³², nanocristais de celulose³³ e partículas de hidroxiapatita³⁴ com aplicações na engenharia de tecidos.

Outro avanço importante refere-se à capacidade de **autorreparação** apresentada por alguns hidrogéis baseados em ligações dinâmicas covalentes, como as formadas por **Bases de Schiff**³⁵. Nesses sistemas, a reversibilidade da formação e quebra das ligações covalentes permite que a matriz polimérica restaure sua integridade após danos estruturais ou mudanças nas condições do meio³⁶. Essa característica amplia o potencial de aplicação dos hidrogéis em cenários biomédicos mais desafiadores, nos quais a durabilidade e a adaptabilidade são fundamentais.

Nos últimos anos, os esforços têm se concentrado na diversificação dos agentes terapêuticos encapsulados, na ampliação da especificidade para alvos biológicos e no desenvolvimento de hidrogéis que combinem múltiplas funções em uma única matriz³⁷. Dessa forma, os hidrogéis injetáveis, ao integrarem características de materiais inteligentes, têm expandido significativamente suas aplicações biomédicas. Dentro desse contexto, o desenvolvimento do hidrogel proposto nesta tese insere-se no avanço desse campo, com o objetivo de contribuir para novas soluções terapêuticas.

3.1 MATRIZ POLIMÉRICA DE HIDROGÉIS INJETÁVEIS

A biodegradabilidade é a principal característica que a matriz polimérica de um hidrogel injetável precisa apresentar, considerando sua aplicação biomédica. Essa exigência está relacionada diretamente a degradação desse material no corpo humano, que pode levar a seu acúmulo e consequente efeitos colaterais, como a toxicidade³⁸.

Os polímeros biodegradáveis utilizados em formulações de hidrogéis injetáveis quando classificados por sua natureza, podem ser divididos em naturais ou sintéticos. Os sintéticos como polipeptídios tipo-elastina, usados pelo grupo de Chilkoti³⁹ para reparação de tecidos, ou ainda mais comuns, como o poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) e os copolímeros triblocos, como o PEO-PPO-PEO, conhecidos por polímeros plurônicos, em que ambos os exemplos de polímeros sintéticos são comumente enxertados em biopolímeros dando a característica de termosensibilidade aos hidrogéis injetáveis produzidos para aplicações biomédicas^{40,41}. Enquanto os polímeros naturais, podem ser polipeptídios do tipo proteínas, como o colágeno, a elastina, fibrina, gelatina, queratina etc.; e em sua maioria, polissacarídeos como quitosana, ácido hialurônico, gomas, alginato, pectina etc.^{41,42}.

De acordo com a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemists*)⁴³ um polímero natural é composto de biomacromoléculas, ou seja, macromoléculas sintetizadas por organismos vivos⁴⁴. Portanto, ao longo desta tese, os termos ‘biopolímeros’ e ‘polímeros naturais’ serão utilizados indistintamente para se referir às macromoléculas utilizadas na produção do hidrogel injetável proposto nesta pesquisa e que são formadas a partir de fontes naturais, sejam as elas animal ou vegetal^{45–47}.

Quanto à facilidade de trabalho, os polímeros sintéticos se sobressaem dos naturais, uma vez que levam à formação de hidrogéis com boas propriedades mecânicas, além da maior reprodutibilidade, quando comparadas aos polímeros naturais⁴⁸. Em contrapartida, a gama de ligações químicas presentes nas estruturas químicas dos polímeros sintéticos pode impactar negativamente a degradação dos hidrogéis e outras propriedades relacionadas⁴⁵.

Adicionalmente, Su e col.⁴⁹ ressaltam que os polímeros naturais além de serem intrinsecamente biodegradáveis, têm atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores, por apresentarem baixa toxicidade e biocompatibilidade. Os polímeros naturais são considerados os primeiros biomateriais usados clinicamente⁵⁰. Em sua revisão Chirani e col.²⁷ explicam que uma melhor interação com células e a consequente promoção do aumento de sua diferenciação e proliferação são fenômenos esperados dos biopolímeros quando em contato com o tecido celular.

Essa citocompatibilidade traz dois principais efeitos contrários sob a ótica da aplicação dos hidrogéis baseados em biopolímeros. De forma benéfica, essa propriedade permite que estes hidrogéis possam atuar como mimetizadores de matrizes extracelulares, admitindo a incorporação de células em sua matriz, como os hidrogéis a base de gelatina produzidos pelo grupo de Myung⁵¹ em que fibroblastos foram encapsulados, e, portanto, servem de veículo de terapia celular⁵². Ao mesmo tempo que a citocompatibilidade catalisa o processo de biodegradação dos hidrogéis formados por polímeros naturais, ela tem também impulsionado o estudo da modificação desse tipo de polímeros, bem como a associação destes com os sintéticos, e principalmente, uma combinação dos mesmos para reduzir os impactos negativos dessa propriedade e realçar aspectos desejados para o hidrogel na aplicação biomédica específica⁴⁸.

Neste sentido, além das propriedades discutidas acima, os biopolímeros destacam-se dos polímeros sintéticos por sua disponibilidade e natureza renovável, abundância e diversidade estrutural e comportamento físico. Tais características

tornam seu uso versátil e interessante para os mais variados setores industriais de alto valor: agricultura, biotecnologia, alimentos, farmacêutico e médico⁵³.

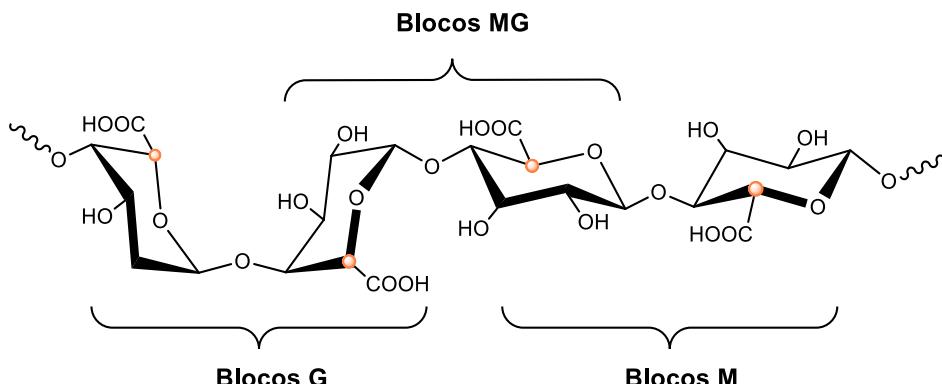
Portanto, serão discutidos em profundidade os polímeros naturais do tipo polissacarídeos e as proteínas, em especial: o alginato de sódio e a gelatina, que serão base da matriz polimérica dos hidrogéis propostos neste trabalho de tese.

3.1.1 Alginato de Sódio

Dentre os polissacarídeos mais estudados na produção de hidrogéis, destaca-se o alginato de sódio (SA). O sal do ácido algínico, disponível comercialmente como SA ou alginato de cálcio, é geralmente extraído da parede celular de algas marinhas marrons e foi obtido pela primeira vez por Stanford em 1881⁵⁴. Apresentando natureza aniônica e cadeia linear constituída de dois blocos copoliméricos de ácidos urônicos, o ácido β -D-manurônico (M) e o ácido α -L-gulurônico (G), unidos por ligações glicosídicas (1→4), ambos em conformação piranosídica^{55,56}.

O carbono C5 (quiral, ligado ao grupo ácido carboxílico) do SA apresenta conformação diferente em cada um dos ácidos M e G, portanto, estes ácidos diferem estereoquimicamente entre si⁵⁷. O fragmento estrutural do SA está representado na **Figura 1**, com destaque para as ligações glicosídicas (1→4). Essas ligações glicosídicas podem estar entre regiões homopoliméricas (MM ou GG) ou heteropoliméricas (MG ou GM)⁵⁸. Em termos conformacionais, os blocos constituídos dos resíduos de ácido 1,4- β -D-manurônico apresentam ligações glicosídicas do tipo equatorial-equatorial e os blocos do ácido 1,4- α -L-gulurônico, de ligações glicosídicas do tipo axial-axial⁵⁹. Portanto, a orientação das dessas ligações determina a forma que o polímero apresentará, caso o bloco M seja o predominante, a região adquire forma linear e se os blocos G forem dominantes, as regiões adquirem forma de ondas⁵⁹.

Figura 1 - Fragmento estrutural do alginato contendo blocos GG, MG e MM. Ligações glicosídicas destacadas em laranja



Fonte: Adaptado de Sabadini⁵⁷.

A depender de fatores ambientais em que a espécie de alga está inserida, como a região geográfica e a estação do ano no qual o alginato é dela extraído, a razão M/G dessas unidades e a quantidade relativa dos segmentos pode variar^{60,61}. Conforme a quantidade de blocos G aumenta em relação aos blocos M, os alginatos passam a formar géis mais quebradiços, com tendência a sofrer sinérese, processo de expulsão de água do interior do gel, enquanto uma maior porcentagem de blocos M tende a produzir hidrogéis mais elásticos e com menor tendência à sinérese⁶².

Ao sintetizarem SA com diferentes razões M/G e analisarem suas propriedades emulsificantes, Jiao e col.⁶³ observaram que alginatos com razões M/G maiores, formavam emulsões mais estáveis e gotículas menores; além da massa molar ter apresentado forte influência na capacidade emulsificante dos alginatos. Este comportamento complementa a afirmação de Iwaki no parágrafo anterior e pode ser relacionado a uma maior quantidade de blocos M que apresentam menor impedimento rotacional ao redor da ligação glicosídica que os blocos G, proporcionando maior estabilidade ao reduzirem o aspecto rígido e quebradiço final, característicos de emulsões e géis de alginatos ricos em blocos G⁶².

Em termos de propriedades físicas, a viscosidade do SA permite sua aplicação no setor alimentício como agente espessante, agente formador de filmes e géis; e estabilizante⁶⁴. Os alginatos comerciais estão disponíveis em uma ampla faixa de massas molares médias em torno de 33.000 a 400.000 g/mol. Quanto maior o valor da massa molar, maior a viscosidade da solução que este alginato forma. Do ponto

de vista molecular, a viscosidade do SA aumenta com a diminuição do pH, pois seus grupos carboxilatos são protonados formando ligações de hidrogênio ⁶⁵.

Nas indústrias farmacêutica e biomédica, suas aplicações incluem agente de suspensão, agente desintegrante de cápsula e comprimido, espessante, estabilizante e agente de liberação, por sua capacidade de formar sólidos e semissólidos por meio da transição conhecida por gel-sol (gel-solução), que pode se dar sob condições fisiológicas na presença de cátions divalentes Ca^{2+} , Ba^{2+} etc. ⁶⁶ Ao se alterar o estado de ionização e o contra íon que acompanha o alginato, pode-se alterar sua solubilidade. Além disso, a degradação dos alginatos é fortemente dependente do pH do meio, prevalecendo a degradação por hidrólise ácida em $\text{pH} < 5$. Enquanto a degradação via β -eliminação ocorre em $\text{pH} > 10$ ^{67,68}.

Contudo, essas propriedades intrínsecas dos polissacarídeos, incluindo sua natureza renovável, especialmente do SA, podem não ser suficientes para sua utilização em determinadas aplicações biomédicas, inclusive, em hidrogéis ⁹. Consequentemente, modificações químicas na estrutura dos polissacarídeos têm sido investigadas objetivando a modulação de propriedades físicas, químicas e biológicas. Por exemplo, na hidrofilia desses polímeros, que podem auxiliar no controle da formação e das propriedades dos hidrogéis ⁶⁹. Estas modificações podem permitir ligar derivados dos polissacarídeos às moléculas biológicas, como peptídeos ⁷⁰ e aos fármacos ⁷¹. Além disso, algumas modificações comuns na celulose, já vêm sendo empregadas em escala industrial ⁷². Dentro da literatura a respeito das modificações do SA, várias reações têm sido exploradas.

A partir dos grupos ácidos carboxílicos presentes na estrutura dos alginatos, reações para formar amidas, ésteres e seus derivados, com a utilização de carbodiimidas em meio aquoso, têm sido propostas. Hu e col. ⁷³ funcionalizaram SA com dopamina para ser empregado como camada protetora de válvulas cardíacas bioprotéticas; e Grownay e col. ⁷⁴ ao bioconjugarem SA ao plasma rico em plaquetas, o aplicaram na matriz polimérica de hidrogéis injetáveis da engenharia de tecidos.

Em adição às reações de obtenção de derivados do SA esterificados, há registros na literatura da funcionalização parcial e completa do SA com benzil-, butil-, etil- e metil ésteres, sintetizados em meio orgânico, justificada pela versatilidade que as reações em fase orgânica oferecem ⁷⁵. Estes derivados são mais solúveis em meio orgânico, que o material de partida e, de acordo com os autores, apresentam potencial

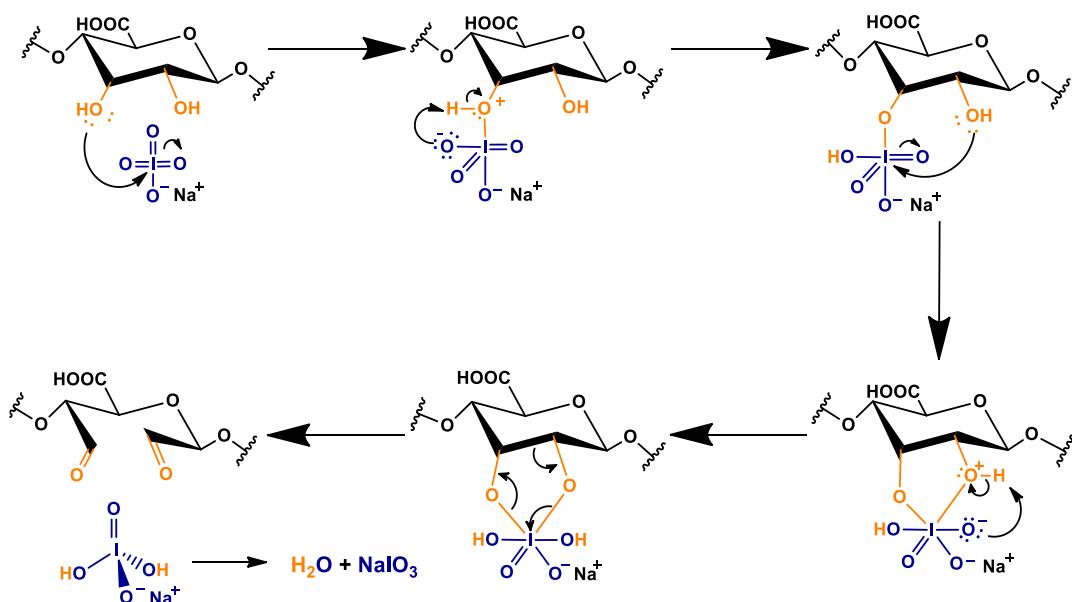
empregabilidade na preparação de dispersões sólidas para sistemas de liberação de fármacos e bioativos.

A partir das hidroxilas presentes em sua estrutura, pode-se obter derivados do SA funcionalizados com grupos aldeídos por meio da oxidação parcial destes grupos funcionais. Muitas pesquisas publicadas se detêm ao estudo das oxidações por periodato de sódio⁷⁶⁻⁷⁸, onde este agente oxidante propicia a clivagem seletiva de 1,2-dióis (vicinais) e consequente, formação de dialdeídos por unidade monossacarídica.

Ademais, estes derivados oxidados apresentam estrutura mais flexível, devido à quebra dos anéis glicosídicos e a despolimerização^{79,80}. Os aldeídos formados podem sofrer, por conseguinte, aminação redutiva com alquilaminas de cadeias longas para gerar derivados hidrofobicamente modificados⁷².

As condições brandas nas quais esta reação de oxidação é realizada - solução aquosa e pH neutro - são a principal vantagem desta reação⁸¹. Há evidências de que as hidroxilas vicinais devem estar orientadas de forma equatorial-equatorial ou axial-equatorial, para que a reação ocorra, uma vez que, a rigidez da orientação axial-axial não admite a formação do intermediário cíclico⁸², o mecanismo está apresentado na **Figura 2**, a seguir.

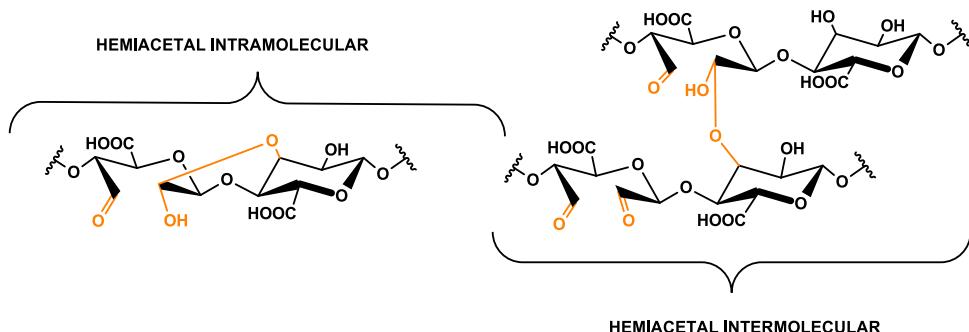
Figura 2 - Mecanismo da reação de oxidação do alginato em uma unidade monossacarídica.



Fonte: Adaptado de Ramos⁸³ e Emami e col.⁸⁴.

Segundo Kristiansen e col.⁸², o uso da reação de oxidação do SA com periodato já foi bastante explorado para determinar a massa molar de diferentes polissacarídeos. Como os blocos M e G do alginato são exclusivamente (1→4) ligados, apenas as ligações C2-C3 são clivadas durante a reação. Por apresentar tal seletividade, hidroxilas vizinhas ao aldeído podem agir como nucleófilos e atacarem a carbonila do aldeído, formando hemiacetais intra- e intermoleculares⁸⁴. Algumas estruturas possíveis estão representadas na **Figura 3**. Portanto, a oxidação total não é possível, pois os hemiacetais formados protegem algumas hidroxilas de sofrerem oxidação posterior⁷⁸.

Figura 3 - Representação de possíveis estruturas das unidades oxidadas com a formação de hemiacetais.



Fonte: Adaptado de Emami e col.⁸⁴.

Alginatos com o mesmo grau de oxidação, porém com diferentes pesos moleculares podem ser obtidos ao se alterar as condições reacionais da oxidação, como a concentração do SA⁸⁴. Ainda de acordo com estes autores, aumentar a concentração de SA mantendo o periodato constante, resulta em mais colisões moleculares, portanto, mais cisão da cadeia polimérica. Enquanto o aumento de ambos os parâmetros, leva a uma maior modificação (formação de aldeídos) e melhora a taxa de cisão da cadeia de SA.

Como consequência da utilização de SA estruturalmente modificado na formação de hidrogéis, o grau de oxidação impacta diretamente nas propriedades físicas desses sistemas poliméricos, como o grau de intumescimento, a grau de reticulação e a degradação⁸⁵. Tais propriedades serão apresentadas e discutidas individualmente, neste capítulo, nos itens relacionados aos hidrogéis.

3.1.2 Gelatina

A gelatina, um derivado do colágeno, destaca-se como um biomaterial à base de proteínas amplamente utilizado em aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e versatilidade estrutural. Derivada de fontes animais, como pele suína, bovina e de peixe, a gelatina é valorizada por sua capacidade de formar hidrogéis termo responsivos e redes tridimensionais, que promovem adesão celular e interação com agentes terapêuticos¹⁴.

Quando combinada ao alginato oxidado, a gelatina forma hidrogéis por meio de reações de condensação com formação de bases de Schiff, nas quais grupos aldeídios do alginato oxidado reagem com grupos amina da gelatina. Esse mecanismo resulta em reticulação espontânea, dispensando o uso de agentes tóxicos, o que torna o sistema altamente atraente para aplicações biomédicas^{86,87}. O grau de oxidação do alginato influencia diretamente propriedades críticas do hidrogel, como absorção de água, resistência à compressão, porosidade e taxa de biodegradação⁸⁷.

Estudos demonstram que hidrogéis de alginato oxidado e gelatina apresentam excelente biocompatibilidade, suportando adesão celular, proliferação e funcionalidade^{86,88}. Suas propriedades mecânicas e biológicas têm sido exploradas em diversas aplicações, como na regeneração de cartilagem, onde mostraram potencial como arcabouços (*scaffolds*) injetáveis e adesivos⁸⁶. Em tratamentos de infarto do miocárdio, esses hidrogéis exibiram maior resistência mecânica, estimulação de angiogênese e recrutamento celular em comparação aos hidrogéis reticulados com cálcio⁸⁹.

Além disso, a razão entre alginato e gelatina pode ser ajustada para atender às demandas específicas de diferentes aplicações. Por exemplo, hidrogéis com combinações otimizadas desses materiais têm sido investigados para regeneração muscular, demonstrando flexibilidade no design de sistemas personalizados⁸⁸.

No contexto deste estudo, a combinação de alginato oxidado e gelatina foi estrategicamente escolhida para unir as propriedades complementares de cada material. Enquanto o alginato oxidado contribui com reatividade química (agente macroreticulador) e flexibilidade estrutural, a gelatina oferece suporte biológico e melhora a interação com agentes terapêuticos.

3.2 PRODUÇÃO DE HIDROGÉIS INJETÁVEIS

São considerados hidrogéis injetáveis aqueles que, em forma de géis fluidos ou de seus precursores líquidos, podem ser extrudados de uma seringa direto no local de aplicação desejado, de forma minimamente invasiva⁹. Ao planejar a produção de hidrogéis injetáveis, deve-se levar em consideração a forma de injetabilidade de acordo com a aplicação biomédica de interesse⁸.

A injetabilidade pode derivar de géis pré-formados (*ex vivo*) que sejam capazes de fluir através de uma seringa sob pressão externa e após relaxação, retomarem sua consistência⁹⁰. Ou ainda, pode ser derivada de partículas em solução ou soluções precursoras que se gelificam *in situ*. Os hidrogéis injetáveis pré-formados devem apresentar viscosidade relativamente baixa, suficiente para ceder à força de cisalhamento aplicada pelo pistão e consequentemente, escoar pela seringa⁹¹. Já as partículas, podem ser injetadas em solução e *in situ* se autoaglomerarem formando hidrogéis ou podem apresentar estruturas tipo-gel, sem necessidade de formação pós-injeção⁹².

Enquanto os hidrogéis de formação *in situ* destacam-se dos demais veículos injetáveis, por sofrerem alterações morfológicas como resposta às mudanças do meio em que estão inseridos⁹³. Para tanto, soluções poliméricas são injetadas no local de interesse e em seguida, se autoconvertem em géis viscoelásticos, de estrutura 3D, que se adaptam ao ambiente fisiológico⁶⁸. Além disso, essas mudanças extrínsecas à matriz polimérica, como variações de temperatura e/ou pH, desencadeiam a formação e degradação do hidrogel⁹⁴. Mais detalhes sobre os estímulos para formação e degradação de hidrogéis serão apresentados no item relacionado às propriedades mecânicas, estruturais e reológicas dos hidrogéis.

Contudo, o modo de reticulação, ou seja, de ligação das redes poliméricas determinará qual tipo de injetabilidade, dentre as descritas anteriormente, o hidrogel produzido terá. Com base na reticulação os hidrogéis podem ser classificados como: físicos, se as reticulações não são covalentes; químicos, quando reticulados covalentemente e dinâmicos, quando ligações covalentes dinâmicas são a base da reticulação da matriz polimérica⁹⁵.

O estudo dos hidrogéis resultantes das reticulações covalentes são os mais bem estabelecidos na literatura mundial. As reações de reticulação comumente empregadas na produção de hidrogéis químicos são as reações de polimerização por radical livre, condensação e acoplamento ortogonal⁹⁶. De uma forma geral, os

hidrogéis são formados a partir de reações químicas entre monômeros ou polímeros funcionalizados com moléculas pequenas que atuam como agentes reticulantes⁹⁷.

Estas ligações covalentes proporcionam diversas vantagens aos hidrogéis, com destaque para uma melhor resistência mecânica e estabilidade quando comparados aos hidrogéis físicos. Porém, é comum serem utilizados agentes reticulantes como glutaraldeídos, poliepóxidos e isocianatos que são considerados tóxicos e podem causar efeitos adversos quando utilizados em aplicações biomédicas³⁸. Outra desvantagem dos hidrogéis químicos é que quando reticulados com metais, suas ligações acabam se tornando reversíveis em meio fisiológico e causam efeitos citotóxicos⁹⁸.

Quando se trata da formação de hidrogéis fotopolimerizados são necessários agentes fotossensibilizadores que quando ativados por luz UV podem ser deletérios, além de, em geral, longos tempos de irradiação também serem necessários⁹⁴. Como exemplo, pesquisadores produziram hidrogéis injetáveis, baseados em polissacarídeo e proteína modificados⁹⁹. Estes hidrogéis foram duplamente reticulados com ligação covalente dinâmica e por fotopolimerização (agente fotoiniciador Irgacure-2959). Entretanto, foram necessários 15 minutos de irradiação de luz UV para que a segunda rede fosse formada e a investigação desse tempo de reticulação *in vivo* não foi realizada.

Por outro lado, os hidrogéis reticulados por interações físicas, como: interações eletrostáticas iônicas, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, e interações π-π são muito utilizados para liberação de fármacos, peptídeos e proteínas¹⁰⁰. Porém, são mecanicamente fracos quando em condições fisiológicas, devido às trocas de cátions com o meio; têm a reatividade dos agentes reticulantes reduzidas à baixas temperaturas, além de apresentarem baixo ou nenhum controle da gelificação (muito rápida a formação do gel) devido à alta solubilidade em solução aquosa^{100,101}.

Apesar disso, devido à praticidade e baixo custo da produção desse tipo de hidrogéis, há um considerável número de estudos na literatura que utiliza agentes reticulantes iônicos^{40,102}. Em particular, o cloreto de cálcio (CaCl_2) que quando em contato com a solução aquosa de alginato se aloja entre blocos G e forma uma estrutura de rede¹⁰³.

Lee e Mooney¹⁰⁴ em sua revisão, analisaram a influência das características dos hidrogéis físicos baseados em SA e destacaram as limitações das propriedades mecânicas desses hidrogéis. Os autores reforçaram que as características resultantes

dos hidrogéis físicos direcionam o interesse das pesquisas para o desenvolvimento e otimização de hidrogéis de alginatos reticulados covalentemente.

Além disso, essa menor estabilidade mecânica torna os hidrogéis físicos ineficientes para grande parte das aplicações biomédicas e este é um desafio que tem sido avaliado nos últimos anos. Visando superar esse desafio, diversas abordagens têm emergido na busca por maior robustez mecânica, a exemplo da reticulação dupla, mencionada anteriormente na pesquisa de Yuan e col.⁹⁹ com a utilização de ligações covalentes dinâmicas e fotopolimerização.

A dupla reticulação pode advir de uma mesma matriz polimérica ou ainda, cada reticulação em uma rede polimérica diferente, sendo esta última forma a mais comumente estudada¹⁰⁵. Bem como, as ligações responsáveis pela reticulação podem ser ambas químicas, físicas ou químicas e físicas¹⁰⁶. Tais características ampliam as possibilidades de aplicação no campo biomédico e têm ganhado destaque nas pesquisas relacionadas ao hidrogéis injetáveis. De modo que diversas revisões, a respeito dos métodos de produção, tipos de redes poliméricas e novas aplicações dos hidrogéis reticulados duplamente, vêm sendo publicadas¹⁰⁵⁻¹⁰⁹.

Outro grupo de estratégias de reticulações que tem despertado o interesse dos pesquisadores é o de ligações covalentes dinâmicas^{33,46,110-112}. Tal interesse advém desse tipo de reticulação apresentar a facilidade de preparo da reticulação iônica, combinado a não utilização de agentes reticulantes potencialmente tóxicos, comumente utilizada nas reações de reticulação química⁹⁵.

Portanto, os hidrogéis reticulados por ligações covalentes dinâmicas são considerados hidrogéis dinâmicos, uma vez que a dinâmica microscópica proporciona considerável estabilidade e novas propriedades macroscópicas, como autorreparação e memória de forma^{113,114}. Além disso, os hidrogéis dinâmicos têm a capacidade de imitar propriedades estruturais das matrizes extracelulares de tecidos moles (ricos em colágeno e elastina), uma vez que uma rede polimérica rígida restringiria as interações celulares naturais, como por exemplo, impedindo que o processo de mitose aconteça¹¹³.

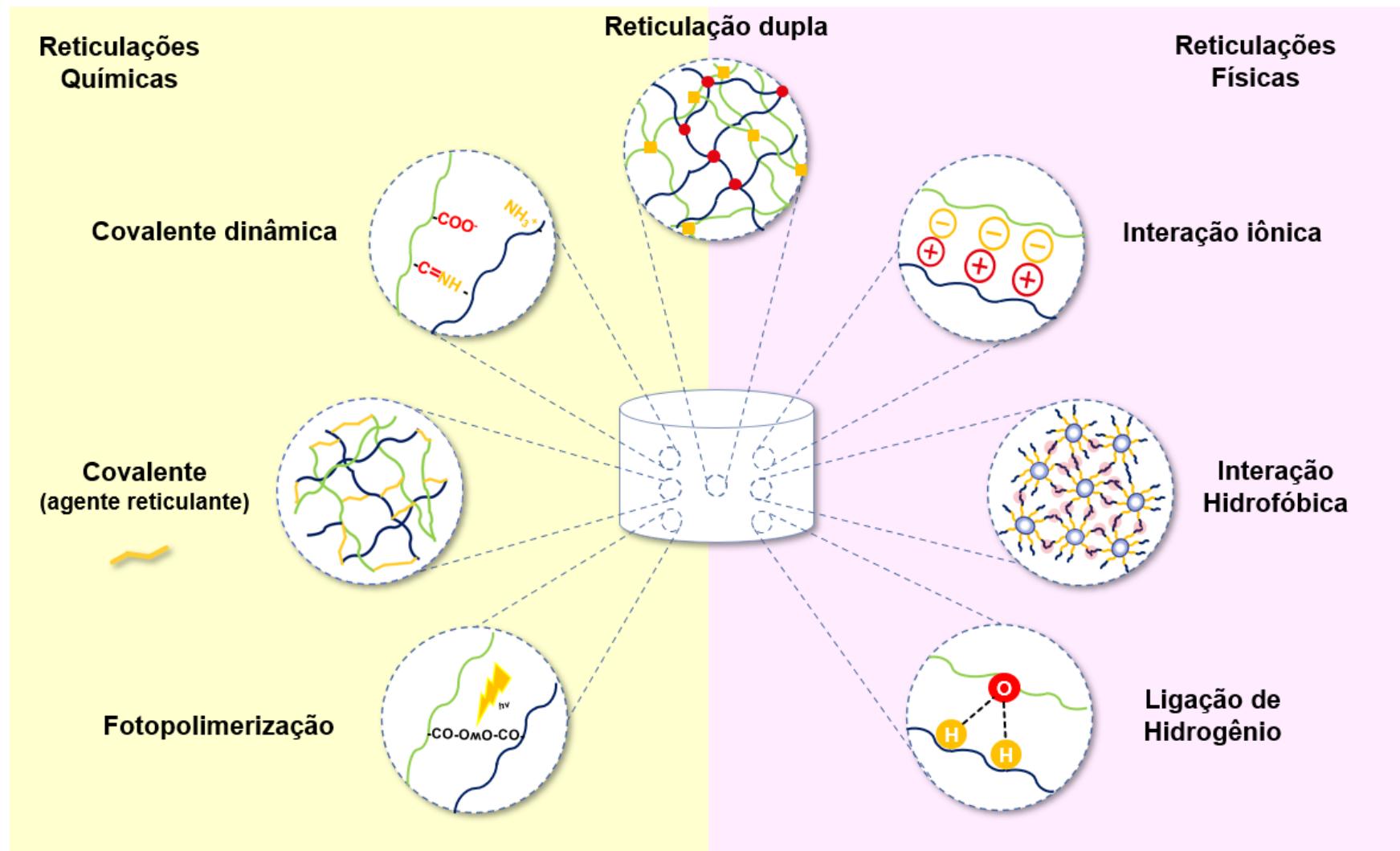
As ligações covalentes dinâmicas são um tipo de ligação covalente que pode ser quebrada e restituída de forma autônoma ou como resposta a algum estímulo^{114,115}. Como exemplo das ligações covalentes dinâmicas resultantes de reações de adição encontram-se as bases de Schiff (formação de iminas), as oximas e

hidrazonas, os ésteres borônicos e boronatos, pontes dissulfetos e as reações de Diels-Alder¹¹⁵.

Recentemente, revisões da literatura relacionadas aos diferentes aspectos das ligações covalentes dinâmicas vêm sendo publicadas^{95,113–117}. Juntas, essas revisões indicam que as ligações covalentes dinâmicas são consideradas fortes alternativas no desenvolvimento de materiais de aplicação biomédica por: serem compatíveis com diferentes grupos funcionais, diferentes condições reacionais, por serem capazes de imitar melhor as dinâmicas e funções de matrizes extracelulares. Associado a isso, a escolha dos substratos e de estratégias sintéticas adequadas são indicados como passo determinante para a evolução do campo, permitindo a consolidação dos hidrogéis dinâmicos e consequente substituição dos hidrogéis convencionais comercialmente disponíveis.

Por fim, nesta seção foram sumarizados alguns dos diferentes tipos de reticulações que embasam a produção de hidrogéis injetáveis e estão representados na **Figura 4**. O próximo subitem irá se deter as ligações covalentes dinâmicas do tipo bases de Schiff, as quais serão utilizadas no hidrogel proposto na pesquisa dessa tese.

Figura 4 - Tipos de reticulações comuns na produção de hidrogéis injetáveis.



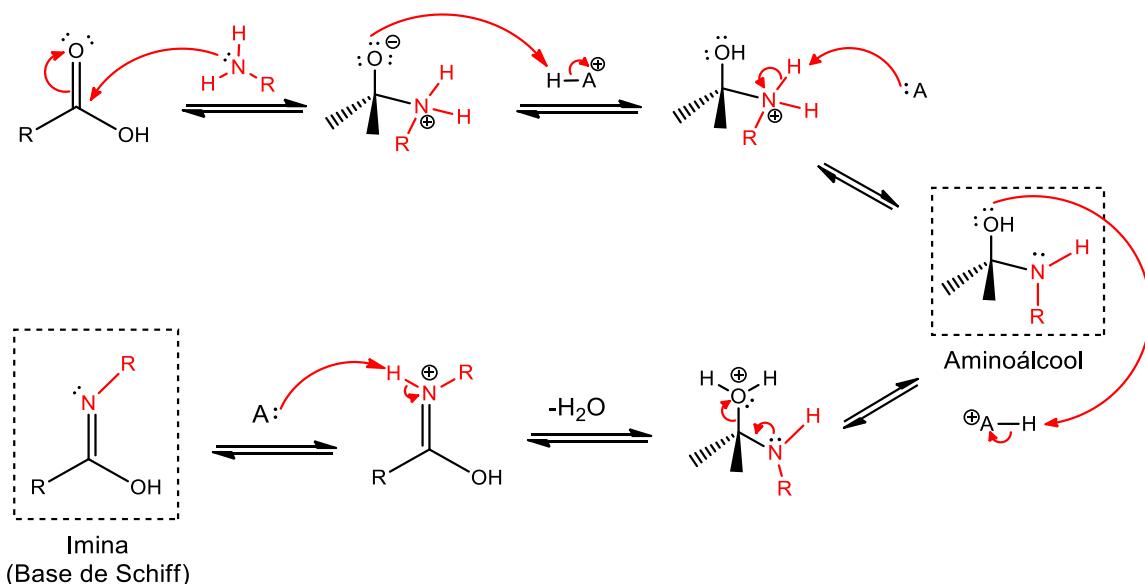
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

3.2.1 Ligações covalentes dinâmicas - Bases de Schiff

Muito conhecida na síntese orgânica, a reação da ligação covalente dinâmica de formação de imina foi descoberta por Hugo Schiff em 1864 e desde então é conhecida como base de Schiff¹¹⁸. Atualmente, esta reação é muito utilizada na produção de hidrogéis injetáveis com aplicações biomédicas, sendo também comumente encontradas em rotas biológicas^{119,120}. Sua dinamicidade está na quebra e formação da ligação C=N associada a reversibilidade da reação, em que as iminas podem ser hidrolisadas resultando nos materiais de partida e vice-versa¹¹⁴.

A formação da base de Schiff pode se dar pela condensação de um aldeído ou cetona e uma amina primária em meio levemente ácido. O mecanismo desta reação, composto por seis etapas, está representado na **Figura 5**. A primeira parte do mecanismo envolve a formação de carbinolamina/ aminoálcool e se o pH estiver em torno de 4.5 a reação apresentará a maior taxa possível¹²⁰. Ainda de acordo com Klein, em contrapartida, se o pH estiver muito alto a carbinolamina não é protonada e a reação acontece mais lentamente; e se estiver muito baixo, as aminas serão protonadas, resultando em espécies menos nucleofílicas.

Figura 5 - Mecanismo geral da formação de imina (base de Schiff).



Fonte: Adaptado de Klein¹²⁰.

O mecanismo original apresenta a possibilidade da formação de estereoisômeros.

Complexações com boro, ligações dissulfetos, reações de Diels-Alder, ligações de oximas, iminas e hidrazinas são os tipos de reticulações covalentes dinâmicas mais comumente empregadas na produção de hidrogéis dinâmicos (revisadas por Perera e Ayres⁹⁵). Destas ligações reversíveis, as bases de Schiff são um tipo de ligação que não necessita do estímulo da luz para se refazer¹²¹. Complementarmente, diversos estudos têm associado a reticulação com bases de Schiff com características macroscópicas dos hidrogéis, como a autorreparação^{122–127}.

Além disso, os grupos aldeídos ou aminos presentes nos agentes terapêuticos incorporadas à matriz polimérica dos hidrogéis podem atuar como agentes reticulantes. Como é o caso do hidrogel aplicado para o tratamento de câncer de mama, em que o fármaco doxorrubicina serviu como reticulante ao se ligar aos grupos aldeídos do polímero oxidado¹²⁸. Foi observado um menor tempo de formação do hidrogel incorporado com o fármaco, quando comparado ao hidrogel sem doxorrubicina. O menor tempo de gelificação foi atribuído à reticulação do fármaco na matriz polimérica.

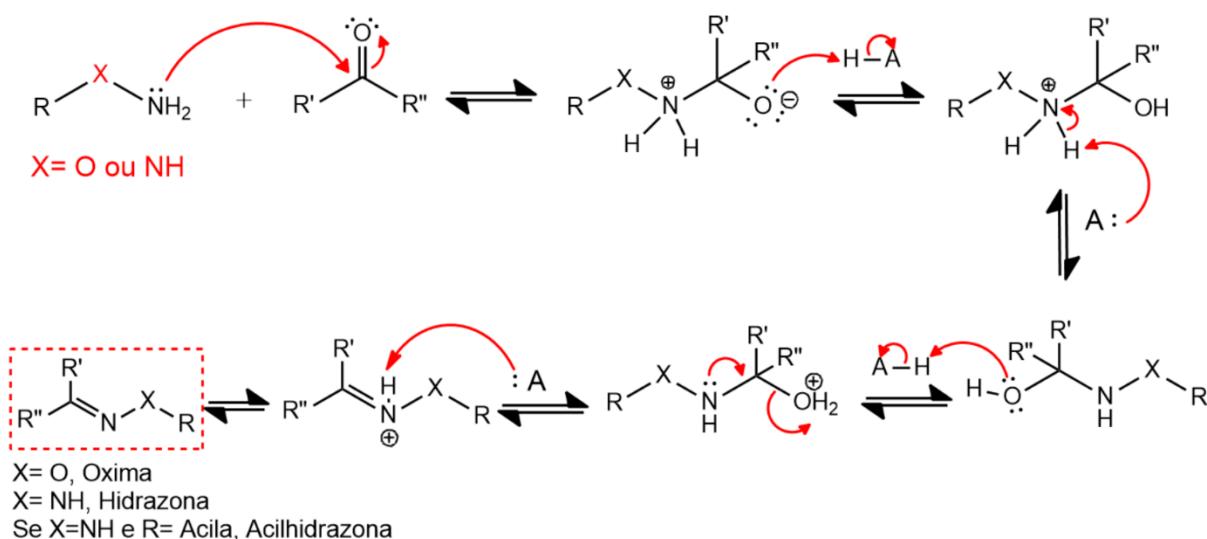
Quanto aos aspectos mecânicos, os hidrogéis convencionais quando sofrem forças mecânicas, após a injeção, deformam ou mesmo danificam⁴⁸. Além de, por exemplo, quando incorporados de células, eles as protegerem durante a extrusão. Essa proteção abriu caminho para aplicações de impressão 3D de peles e órgãos para incorporação de células na engenharia de tecidos¹²⁹.

As bases de Schiff podem reticular polímeros naturais e sintéticos¹³⁰. Em geral, polímeros naturais são modificados estruturalmente, para que grupos aldeídos e/ou grupos aminos sejam incorporados e possam ser utilizados nas matrizes poliméricas de hidrogéis injetáveis^{127,131–134}. Ao considerarmos a diversidade de polissacarídeos existente e a atual gama de possíveis modificações químicas que tem sido empregada na produção de hidrogéis injetáveis dinâmicos, ainda há muito a ser explorado.

Quanto à caracterização, a formação da base de Schiff é, geralmente, identificada com o auxílio de técnicas espectroscópicas. Em especial, a espectroscopia de IV revela uma nova banda em torno de 1645 cm⁻¹ relacionada à formação da ligação dupla -C=N- característica de iminas^{135–137}.

A despeito de suas características superiores às ligações covalentes comuns, as ligações dinâmicas do tipo bases de Schiff exibem certa instabilidade hidrolítica¹¹⁴. Ainda de acordo com Chakma e Konkolewicz¹¹⁴, a instabilidade diminui quando hidrazonas (hidrazidas) ou oximas são utilizadas. Sendo ambas formadas quando grupos aldeídos ou cetonas reagem com hidrazidas e hidroxilaminas, respectivamente. O mecanismo geral de formação das oximas, hidrazonas e acilhidrazonas é apresentado na **Figura 7**.

Figura 6 - Mecanismo geral de formação das oximas, hidrazonas e acilhidrazonas.



Fonte: Adaptado de Kolmel e Kool¹³⁸.

De forma análoga à reação de formação de iminas, o ataque nucleofílico à carbonila do aldeído ou cetona acontece de forma rápida e não é a etapa limitante da velocidade da reação. Enquanto a etapa limitante ocorre na faixa de pH entre 3 e 7 (catálise ácida) com a desidratação do intermediário tetraédrico¹³⁹. Estudos mecanísticos explicam que quando X (**Figura 7**) é um metileno (-CH₂) – caso das iminas – a basicidade do nitrogênio a ele ligado é aumentada e consequentemente, a imina se hidrolisa mais rapidamente¹⁴⁰.

Assim, o efeito indutivo negativo de heteroátomos (O ou N) é o responsável pela maior estabilidade hidrolítica das oximas, hidrazonas e acilhidrazonas, respectivamente. Sendo as oximas ainda mais estáveis que as hidrazonas e acilhidrazonas (menos básicas), devido à mais alta eletronegatividade do átomo de oxigênio¹³⁸. Quando em ressonância, o átomo de oxigênio reduz a eletrofilicidade do carbono imínico, proporcionando então, uma maior estabilidade hidrolítica.

Esta melhor relação labilidade-estabilidade das hidrazonas, as tornam ótimas para a liberação controlada de agentes terapêuticos¹³⁸. O estudo realizado por Flynn e col.¹⁴¹ confirma a importância dessa relação. Neste estudo foram desenvolvidos hidrogéis injetáveis reticulados pelos grupos aldeídos do dextrano oxidado, aminos da quitosana funcionalizada com glicol e hidrazinas do alginato de sódio funcionalizado. Em seus testes mecânicos e de intumescimento, os autores observaram que ao controlarem a concentração de alginato funcionalizado com hidrazinas, foi possível controlar o grau de reticulação¹⁴¹. Por consequência, regular a porosidade dos hidrogéis (tamanho dos meshes), bem como a liberação do agente terapêutico e a resistência mecânica dos hidrogéis formados.

Na presente tese, as reações de base de Schiff têm papel crucial na formação dos hidrogéis, promovendo a reticulação química entre os grupos aldeídos do alginato oxidado e os grupos amina da gelatina. Essa estratégia elimina a necessidade de agentes tóxicos de reticulação, garantindo maior biocompatibilidade, além de permitir o ajuste de propriedades como porosidade e resistência mecânica, aspectos fundamentais para a liberação de agentes terapêuticos.

Por fim, como mencionado anteriormente, tratando-se da produção de hidrogéis injetáveis, os agentes terapêuticos também podem atuar como agentes reticulantes na formação das ligações que dão forma ao hidrogel. Porém, a contribuição dessas substâncias, quando incorporadas ao hidrogel, vai além da reticulação. Sendo necessário entender como estas podem interagir com a matriz polimérica e como essa relação afeta as propriedades do sistema.

3.2.2 Interações hidrogel-agente terapêutico

O termo agente terapêutico está sendo utilizado, ao longo dessa revisão, para fazer referência aos fármacos, moléculas, compostos bioativos e quaisquer outras denominações que englobem substâncias sintéticas ou naturais como, polifenóis, carotenoides, DNA, proteínas e vitaminas que atuem de forma benéfica no organismo, tecido ou célula em que forem inseridos. É importante destacar que as células não estão inclusas no termo destacado acima porque as considerações para sistemas de liberação de células são diferentes dos demais agentes terapêuticos. Devido à maior dimensão celular, na escala de micrômetros, a manutenção da viabilidade após

encapsulamento e a forma de regular a secreção das células após interagirem com o hidrogel difere dos demais agentes terapêuticos incorporados em hidrogéis^{142,143}.

A incorporação de agentes terapêuticos em hidrogéis injetáveis é considerada um ponto crítico no planejamento de hidrogéis como veículos de liberação. Um ponto crítico, pois, diversas interações químicas podem ocorrer entre polímeros e agentes terapêuticos, uma vez que, ao longo das cadeias poliméricas diferentes regiões podem interagir e se ligar aos agentes terapêuticos²⁵. Ao incorporá-los nos hidrogéis, é possível protegê-los de desnaturação, além de possibilitar uma maior liberação local regulada^{144,145}. A incorporação de agentes terapêuticos que interagem física ou quimicamente com a matriz polimérica também é uma forma de reduzir o uso de excipientes na formulação, como agentes reticulantes, levando a um aumento da capacidade de incorporação desses agentes nos hidrogéis¹⁴².

Essas regiões de interação agente terapêutico-hidrogel podem ser adicionadas de forma intencional usando diversas estratégias físicas e químicas, de modo que as ligações químicas formadas aumentem a estabilidade do hidrogel e a facilidade de gelificação, ao aumentar também a densidade da reticulação¹⁴². Por exemplo, Shi e col.¹²⁸, desenvolveram hidrogéis baseados em quitosana e alginato oxidado (OSA) para liberação do quimioterápico doxorrubicina. Eles observaram que a reticulação dos hidrogéis por bases de Schiff, aconteceu de forma mais rápida nos hidrogéis incorporados com o fármaco e atribuíram à presença de grupos aminos nas moléculas do fármaco que formaram iminas com os aldeídos do alginato funcionalizado.

Os agentes terapêuticos interagem com a matriz polimérica, de forma análoga às reticulações abordadas anteriormente: por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou por conjugação química¹⁴⁶. O conhecimento e planejamento das interações agente terapêutico-hidrogel é particularmente importante para agentes com moléculas pequenas, que sem interagir com a matriz polimérica seriam liberados em um período ainda mais curto¹⁴². As ligações covalentes formadas entre o hidrogel e o agente terapêutico, por serem bastante estáveis, permanecem até que a rede polimérica seja degradada^{147,148}. Além disso, as ligações covalentes podem ser usadas de forma a só quebrarem com o tempo ou em resposta a estímulos específicos, como o caso das covalentes dinâmicas.

As interações eletrostáticas permitem a liberação simultânea de mais de um agente terapêutico, entretanto, eventualmente podem necessitar de adição de um

terceiro elemento (outra rede polimérica ou nanotecnologia) para tornar a interação mais forte^{92,149}. No caso das interações hidrofóbicas, polímeros mais hidrofóbicos são utilizados, funcionalizados com grupos mais hidrofóbicos ou moléculas pequenas, como ciclodextrinas são adicionadas como reforço para evitar separação de fases entre os agentes terapêuticos e o hidrogel¹⁵⁰.

No caso desta pesquisa, as interações entre o hidrogel, as moléculas de doxorrubicina e das nanopartículas de zeína/quitosana desempenham um papel importante na liberação dos agentes terapêuticos. Essas interações podem envolver ligações físicas, como forças de van der Waals, além de ligações químicas específicas, como as bases de Schiff no caso da doxorrubicina e do alginato oxidado.

3.2.3 Produção de hidrogéis compósitos com nanopartículas

Com o avanço dos estudos de desenvolvimento e aumento da aplicação de hidrogéis em diversas áreas, a composição tem se tornado cada vez mais complexa, deixando de lado a característica de ser apenas uma rede polimérica capaz de intumescer grandes volumes de água⁹⁵. Além de otimizar o intumescimento, a combinação dos hidrogéis com partículas (nano ou micrométricas), amplia sua aplicabilidade devido ao efeito sinérgico das propriedades individuais de cada material (partícula e hidrogel) dando origem a um material compósito com propriedades otimizadas e únicas¹⁵¹.

Na liberação de agentes terapêuticos, as nanopartículas se destacam, quando comparadas as formas farmacêuticas convencionais (comprimidos, soluções etc.), por aumentarem a biodisponibilidade de fármacos e bioativos, como por modularem a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade destes agentes¹⁵².

Por convenção, as nanopartículas são definidas como partículas com ao menos uma dimensão nanométrica^{153,154}. As nanopartículas podem ser do tipo nanocápsulas (ativos concentrados no núcleo) ou nanoesferas (ativos distribuídos uniformemente no interior). As nanocápsulas, sistemas do tipo reservatório, apresentam um centro aquoso ou oleoso recoberto por uma camada polimérica. Enquanto as nanoesferas, possuem estrutura sólida esférica e são sistemas do tipo matricial^{155,156}.

As nanopartículas podem ser constituídas de materiais inorgânicos metálicos, semicondutores ou orgânicos¹⁵¹. Em uma revisão recente, Lavrador e col.¹⁵⁷ ressaltaram duas características interessantes das nanopartículas orgânicas, como a

alta capacidade de incorporação de biomoléculas e sua versatilidade de funcionalização estrutural. Dentre as nanopartículas mais usadas em aplicações biomédicas, as baseadas em proteínas, por terem matrizes biocompatíveis e biodegradáveis, são uma ótima alternativa às nanopartículas inorgânicas que apresentam sua toxicidade questionada e desencorajada, como é o caso das baseadas em prata^{158–160}.

As nanopartículas de zeína, em especial, são conhecidas na literatura pelas seguintes características: hidrofobicidade, baixa digestão, bioadesão e boa absorção celular, assim como, por formarem esferas mais facilmente, devido à característica anfifílica da proteína^{16,160,161}. Portanto, as nanopartículas de zeína são considerados sistemas adequados para liberação de controlada de agentes terapêuticos¹⁶².

Como exemplo da aplicação das nanopartículas de zeína na liberação de fármacos, ao incorporarem a hidrogéis contendo células-troncos, as nanopartículas de zeína encapsulando azacitidina, Sharma e col.¹⁶³ reportaram diminuição no tempo de gelificação dos hidrogéis, efeito sinérgico na restauração da função cardíaca dos animais testados e na qualidade mecânica dos compósitos formados.

Sob outra perspectiva, o antibiótico gentamicina foi incorporado às nanopartículas de zeína reticuladas com bases de Schiff e incorporadas a um hidrogel contendo quitosana (que é conhecida por sua propriedade antibacteriana) como uma estratégia de combater infecções bacterianas resistentes¹⁶⁴. Os pesquisadores relacionaram o efeito sinérgico na atividade antibacteriana às bases de Schiff e à composição do compósito; e às nanopartículas, a melhoria na penetração quando aplicado à derme.

3.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS, ESTRUTURAIS E REOLÓGICAS

As propriedades mecânicas e reológicas dos hidrogéis injetáveis ditam sua funcionalidade e desempenho¹⁶⁵. Em geral, sólidos são caracterizados por suas propriedades mecânicas (Ex.: Módulo de Young, força e dureza) e líquidos por suas propriedades reológicas (Ex.: Viscosidade e elasticidade). Considerando que durante a formação de um hidrogel há uma transição de estado líquido (precursores) para sólido (hidrogel), ambos os tipos de propriedades precisam ser avaliados durante o desenvolvimento de novos hidrogéis para aplicação biomédica.

De um lado, as propriedades viscoelásticas fornecem informações sobre a estabilidade e usabilidade de hidrogéis injetáveis¹⁶⁶. Do outro, o conhecimento das propriedades mecânicas de hidrogéis injetáveis é fundamental, especialmente, para aplicação na engenharia de tecidos em que é necessário regular o comportamento celular¹⁶⁷. No caso de hidrogéis dinâmicos, como o proposto neste trabalho de tese, devido à complexidade de características combinadas (escoamento, cisalhamento e viscoelasticidade) sua caracterização requer combinações de diferentes testes para que seja adequada¹⁶⁵.

As principais propriedades mecânicas dos hidrogéis, em particular, injetáveis são: resistência (flexão) e rigidez (quebra). Contudo, estas propriedades estão relacionadas às características estruturais da matriz polimérica, como a porosidade e a capacidade de absorção de água. A porosidade é responsável por permitir a absorção de água, pelo acondicionamento e difusão de agentes terapêuticos e oxigênio para as células encapsuladas^{137,167}. Em geral, hidrogéis com redes poliméricas altamente interconectadas são preferíveis, pois facilitam a difusão dos agentes terapêuticos, a capacidade de absorção de água e a adaptação aos tecidos vizinhos¹⁶⁶. E na busca pelo aperfeiçoamento das propriedades mecânicas e estruturais dos hidrogéis, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para adequá-los a aplicações mais específicas.

Há diversas formas de tentar modelar as propriedades mecânicas de hidrogéis, uma delas é a manipulação da formulação. As proporções dos polímeros e agentes reticulantes, graus de funcionalização e concentrações dos precursores poliméricos determinam as características estruturais do hidrogel⁸⁴. E como consequência, interferem diretamente na degradação do hidrogel e na incorporação/liberação dos agentes terapêuticos¹⁶⁸.

Um exemplo recente do uso da estratégia de manipulação da formulação foi aplicado com o objetivo de aumentar a força e o grau de intumescimento de hidrogéis. Os hidrogéis formados à base de quitosana funcionalizada com glicol, dextrano funcionalizado com aldeídos e dextrano funcionalizado com hidrazinas foram avaliados quanto à liberação de uma bacteriocina (peptídeo antimicrobiano) de amplo espectro: Nisina¹⁴¹. Ao aumentarem a concentração da quitosana modificada de 3 para 6%, os pesquisadores obtiveram melhoria de cerca de 100% no módulo elástico (relacionado à rigidez) durante a caracterização mecânica. Enquanto na

caracterização do intumescimento, ao adicionar a quitosana modificada, os hidrogéis tiveram seus diâmetros duplicados.

Uma estratégia para modelar as propriedades mecânicas dos hidrogéis é a inserção de reforços estruturais, que podem ser extrínsecos ou intrínsecos, como a formação de redes poliméricas duplas e diferentes tipos de reticulação. He e col.¹⁶⁹ utilizaram carboximetilquitosana funcionalizada com colágeno-peptídeo e OSA contendo metacrilato para formar redes poliméricas duplas com reticulações por bases de Schiff e metacrilatos, que se conjugam sob luz UV. Testes mecânicos mostraram que essas redes duplas colapsavam apenas quando a tensão excedia 162%, em comparação com 40% para as redes simples. Nos testes *in vivo*, os hidrogéis com redes duplas apresentaram melhor integridade e eficácia na cicatrização de feridas em comparação aos hidrogéis simples e comerciais.

Os reforços extrínsecos estão associados à nanotecnologia, como a inclusão de nanopartículas, nanofibras e nanocristais orgânicos e inorgânicos³⁷. Quando reforços extrínsecos são adicionados a matriz polimérica, os hidrogéis passam a ser conhecidos por hidrogéis compósitos. De acordo com Silva¹⁷⁰, os hidrogéis compósitos possuem a vantagem de manter as características do hidrogel (hidrofilia e biocompatibilidade) acrescidas das propriedades do material incorporado à matriz do hidrogel (a exemplo do magnetismo e do eletrocromismo). Os hidrogéis compósitos são caracterizados por duas fases: a matriz, contínua e formada por dois ou mais macroconstituintes; e uma fase dispersa, o reforço, diferente da matriz em forma e composição química, normalmente, insolúveis entre si^{170,171}.

Recentemente, foram desenvolvidos hidrogéis contendo reforços intrínsecos e extrínsecos. Os hidrogéis injetáveis reforçados com reticulação dupla e nanopartículas de zeína (proteína extraída do milho) foram desenvolvidos para serem aplicados no tratamento de doenças cardiovasculares¹⁶³. As nanopartículas encapsulavam um dos agentes terapêuticos, 5-azacitidina responsável por auxiliar na diferenciação de células tronco, além de fornecerem grupos aminos que interagiam com os aldeídos da matriz polimérica.

Quanto à morfologia, em geral, a estrutura porosa dos hidrogéis é avaliada por meio de técnicas microscópicas. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é a principal técnica utilizada na caracterização de hidrogéis fornecendo imagens estruturais 3D, informações topográficas, de tamanho e distribuição de poros etc.¹⁷².

Assim, estas informações são essenciais para comparar aos estudos de intumescimento, uma vez que a microestrutura porosa do hidrogel permite a absorção de água, principal característica dos hidrogéis^{166,172}.

3.3.1 Comportamento reológico

O reômetro é o instrumento mais utilizado na caracterização das propriedades reológicas de hidrogéis^{166,173,174}. O uso do reômetro tem como principal vantagem a utilização de pouca amostra para obtenção de muitas informações em uma só análise^{175,176}. O comportamento reológico dos hidrogéis é determinado sob aplicação de pequenas perturbações na estrutura do hidrogel que levam a deformação do material em razão do deslocamento das partículas durante a perturbação¹⁷⁵.

Dependendo do teste aplicado, as perturbações podem se ser aplicadas de forma constante (testes estáticos) ou com tensão intermitente (testes dinâmicos). Há diversos parâmetros que contribuem para a caracterização reológica de hidrogéis injetáveis, os principais são: viscosidade (η), módulo elástico (G'), módulo viscoso (G''), módulo complexo (G^*) e o fator de perda ($\tan \delta$).

É comum aos pesquisadores, do campo dos hidrogéis, destacarem a importância da baixa viscosidade das soluções poliméricas precursoras para evitar o entupimento da agulha durante a injeção. Outra convenção é de que a velocidade de gelificação precisa ser rápida o suficiente para evitar que a solução precursora se mova para locais indesejados enquanto se solidifica após ser enxertada⁴⁰.

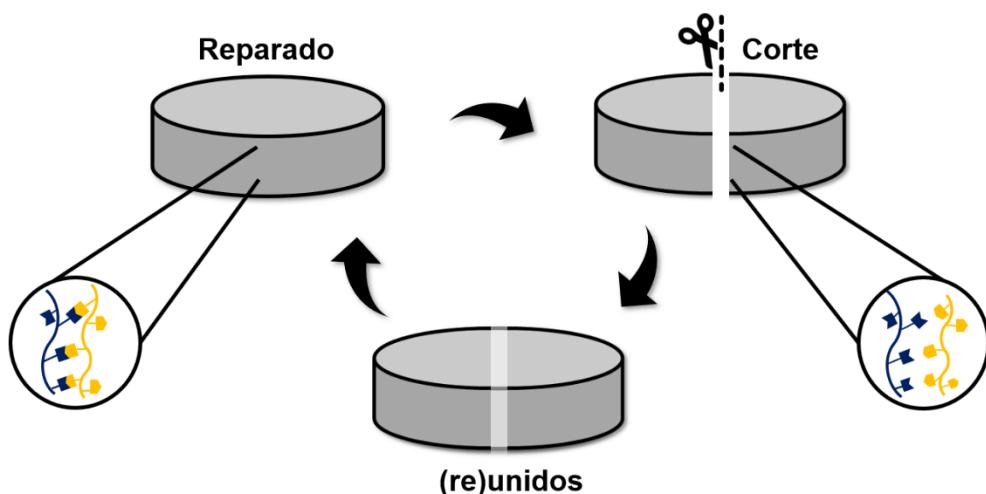
Ainda em termos reológicos, a capacidade de autorreparação é uma propriedade importante dos materiais ditos *inteligentes* e que está presente em alguns hidrogéis injetáveis¹⁷⁷. A autorreparação permite que o hidrogel se estabilize de forma relativamente rápida, após a injeção¹¹⁵. Além de poder prevenir o risco de difusão indesejada dos agentes¹⁷⁸. Inspirada em processos biológicos naturais, como a reparação de ossos fraturados, a autorreparação pode ser resultante tanto de mecanismos extrínsecos ou intrínsecos.

Por meios extrínsecos, a autorreparação ocorre a partir da atuação de agentes reparadores dispersos na matriz polimérica ou em cápsulas; quanto aos intrínsecos, em que as ligações químicas covalentes ou não, presentes na própria matriz polimérica são reversíveis³⁶. Além de não ser necessária a adição de agentes reparadores externos, quando a autorreparação se dá de forma intrínseca, ela ocorre

mais rapidamente (não há difusão do agente através do hidrogel) e permite múltiplos danos e reparações¹⁷⁹.

Na caracterização desta propriedade são avaliados o tempo que o hidrogel leva para se autorreparar, o percentual de reparação e o estímulo relacionado à autorreparação. De forma qualitativa, a capacidade de autorreparação de hidrogéis injetáveis pode ser avaliada, conforme ilustrado no esquema da **Figura 7**. A avaliação é feita a partir dos hidrogéis em sua forma semissólida, onde é causado um dano à matriz, em geral, um corte ao meio e em seguida, ambas as metades são colocadas em contato de modo a retomar a forma inicial que o hidrogel possuía enquanto o tempo é registrado. Para facilitar a visualização, hidrogéis são tingidos em cores diferentes e quando o processo de autorreparação está acontecendo, é possível observar a mistura das cores na junção⁹⁰.

Figura 7 - Esquema do processo utilizado na avaliação qualitativa de autorreparação de hidrogéis.



Fonte: Adaptado de Huang e col.¹⁸⁰ e Talebian e col.¹⁸¹.

Em uma pesquisa recente, hidrogéis baseados em polissacarídeos e reticulados por bases de Schiff foram avaliados quanto à sua autorreparação, qualitativamente. Partindo dos hidrogéis em formato retangular, após cortarem ao meio, uma das metades foi tingida com rosa rodamina B e após reunir as metades, foi realizado o acompanhamento visual por 24 horas, à 37 °C. Pandit e col.¹³⁷ observaram a difusão da cor rosa por todo o hidrogel após 24h e ao pendurarem o hidrogel com uma pinça, confirmaram o final do processo de autorreparação. Em

complemento, também destacaram que o processo ocorreu sem nenhum estímulo externo, apenas devido à dinamicidade das reticulações por bases de Schiff.

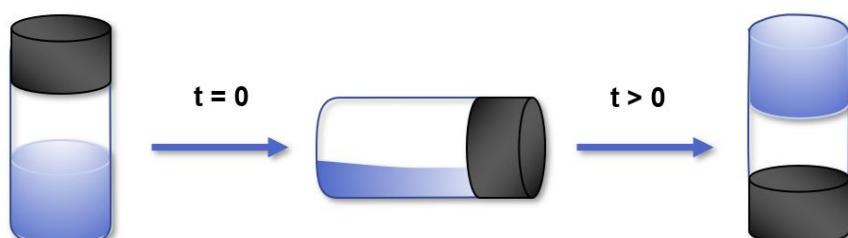
Sob outra perspectiva, Omidi e col.¹⁸² ao avaliarem a autorreparação de hidrogéis reticulados por bases de Schiff, notaram que as partes cortadas, quando reunidas, não retomavam a forma de disco previamente tida. Os autores atribuíram tal comportamento ao agente reticulante utilizado, um dialdeído sintetizado pelo grupo, que não tinha caráter polimérico. Essa justificativa parece bastante pertinente, pois ao se tratar de reticulação por Bases de Schiff, em geral, polissacarídeos são funcionalizados ou têm os grupos funcionais específicos que possam ser utilizados para atuarem como agentes macroreticulantes.

Mesmo ligações organometálicas e iônicas (não covalentes, no geral) já foram empregadas para preparar hidrogéis com autorreparação. Mas os hidrogéis baseados em ligações covalentes dinâmicas destacam-se dos demais por criar materiais robustos capazes de se autorrepararem¹⁸³. Diversas pesquisas têm associado as bases de Schiff à propriedade de autorreparação de seus hidrogéis. Que devido à reversibilidade da ligação, são capazes de recuperar a rede polimérica, a nível molecular⁹⁰.

3.3.2 Propriedades físico-químicas

O estudo da gelificação de um hidrogel de formação *in situ* é importante para definir as características do modo de injeção¹⁶⁶. Esse estudo pode ser feito por diferentes métodos, mas o mais simples e com base reológica realizado em hidrogéis para aplicações biomédicas é o método da inversão de tubo^{137,184,185}, esquematizado na **Figura 8**.

Figura 8 - Esquema do método da inversão do tubo.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

O método se baseia no acompanhamento visual da transição sol-gel ($t = 0$ à $t > 0$) ao verter a solução em tempos pré-determinados. O tempo em que a amostra não escoa mais é registrado como o tempo de gelificação^{145,186}. Em complemento, diversas propriedades viscoelásticas podem ser determinadas com o auxílio de um reômetro, como abordado no item do comportamento reológico.

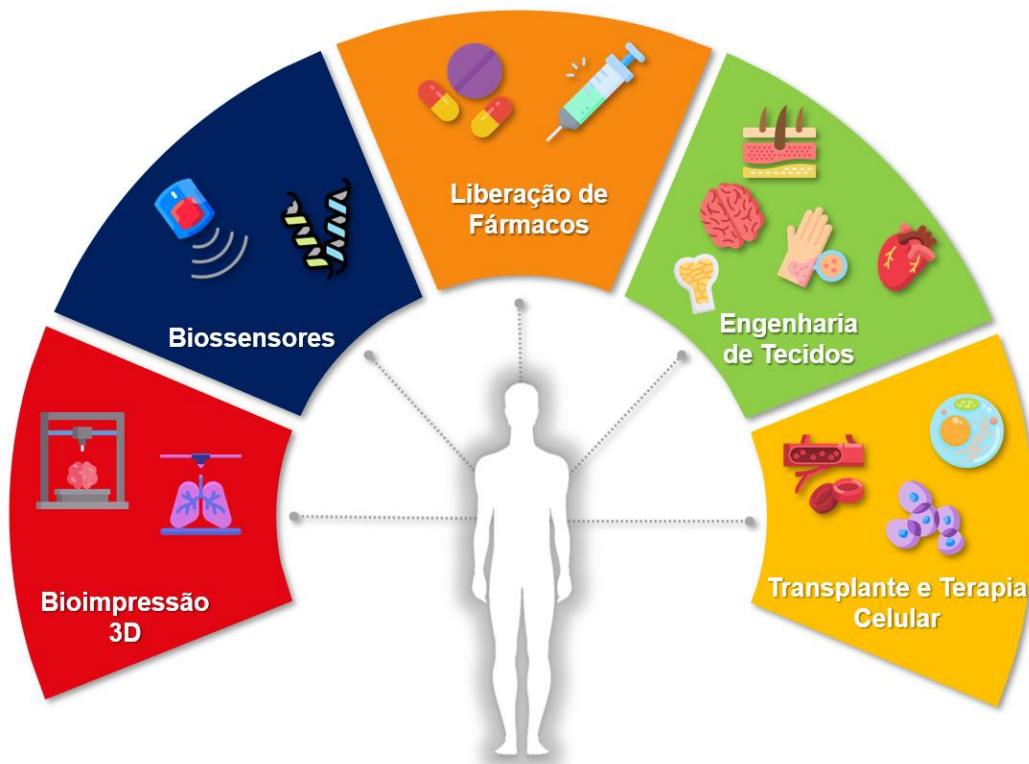
Como a capacidade de comportar e liberar agentes terapêuticos agrega valor, aumentando a aplicabilidade de um hidrogel e está diretamente relacionada à capacidade de intumescimento, é imprescindível que o estudo do intumescimento seja realizado¹⁶⁶. De forma resumida, uma rede polimérica intumesce como resultado da penetração da água na matriz hidrofóbica (por difusão e ação da capilaridade) e consequente expansão, movimentação da rede¹⁸⁷. A determinação da capacidade de intumescimento é, geralmente, feita por gravimetria. Hidrogéis secos, de massa conhecida são colocados em contato com soluções aquosas (simulando condições fisiológicas) e é feito o acompanhamento da massa e consequente, quantidade de água absorvida, até massa constante¹⁶⁶.

Ainda conforme Alonso e col.¹⁶⁶, a estabilidade e degradação estão atreladas a capacidade de intumescimento de um hidrogel. Estas propriedades são determinadas de forma análoga à capacidade de intumescimento, porém, considerando a massa remanescente do hidrogel. Algumas soluções comerciais, acrescidas de enzimas e surfactantes naturais, simulam condições gástricas, salivares e intestinais, além do estado em jejum ou alimentado¹⁸⁸. Portanto, considerando a liberação de agentes terapêuticos como a principal aplicação do hidrogel proposto neste trabalho de tese, o estudo da degradação é essencial, bem como o estudo da avaliação da toxicidade. A relação da degradação com os mecanismos de liberação dos agentes será abordada no item de liberação de agentes terapêuticos.

3.4 APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Diversas são as possíveis aplicações dos hidrogéis injetáveis, especialmente, na área biomédica. Dentre as que têm se destacado nos últimos anos estão: a engenharia de tecidos com curativos que auxiliam na cicatrização de feridas, regeneração de cartilagem, reparação óssea, transplante e terapias celulares; biossensores, biotintas para impressão 3D e a liberação de agentes terapêuticos com fins médicos e odontológicos (**Figura 9**)^{13,42,93,94,165,189–191}.

Figura 9 –Aplicações biomédicas emergentes dos hidrogéis injetáveis.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Na terapia celular, em que células são injetadas em tecidos doentes ou danificados, os hidrogéis injetáveis se apresentam como um veículo de liberação que possa também, aumentar a integração, viabilidade e a função das células injetadas¹⁹². Com outra finalidade, materiais de suporte dinâmico para bioimpressão podem ser feitos de hidrogéis ou hidrogéis podem ser utilizados como tintas (biotintas) incorporando células, proteínas e componentes de matrizes celulares para impressão de miniórgãos e de protótipos de pele¹⁹³.

Quando aplicados como biossensores, os hidrogéis injetáveis podem se tornar instrumentos de diagnóstico ou de monitoramento da saúde¹⁹⁴. Para isso, são utilizados os mais diversos tipos de hidrogéis responsivos. Ao serem empregados na engenharia de tecidos, os hidrogéis injetáveis preenchem áreas defeituosas mais profundas com sua formação *in situ* e em geral, para essa aplicação apresentam também a propriedade de memória de forma (*shape memory*) e acentuada adesividade¹⁹⁵.

Na liberação de agentes terapêuticos, solucionam os desafios da administração intravenosa de terapêuticos: melhorando a permeabilidade dos fármacos, reduzem a frequência de injeções, efeitos colaterais e possíveis reações alérgicas ou resistência à medicamentos; por serem minimamente invasivos reduzem ou eliminam problemas comumente relacionados às cirurgias tradicionais: reduzindo custos com assistência médica e o tempo de recuperação do paciente no pós-operatório^{27,93}.

Embora as barreiras epiteliais como a pele, a mucosa e o epitélio intestinal sejam impenetráveis para os hidrogéis, elas podem ser penetráveis para os agentes liberados dos hidrogéis macroscópicos¹⁴². Os autores acrescentam que quando em sua forma micrométrica (microgéis), podem ser aplicados na liberação oral, pulmonar e intraóssea; quando nanométricos, são mais adequados na liberação sistêmica.

3.4.1 Liberação de agentes terapêuticos

Dependendo da razão entre o tamanho do agente terapêutico e dos tamanhos dos poros, a liberação dos agentes terapêuticos pode ser controlada pela difusão, erosão ou intumescimento¹⁶⁵. O tamanho dos poros depende da concentração dos polímeros e agentes reticulantes utilizados, bem como, dos estímulos externos como temperatura e pH¹⁴².

Quando o tamanho do poro é maior que o tamanho do agente terapêutico incorporado, o agente difunde mais facilmente pelo hidrogel. A liberação se dá mais rapidamente, independentemente do tamanho dos poros¹⁹⁶. Neste caso a liberação inicial é considerada abrupta, como uma erupção e seu mecanismo é dito controlado pela difusão do agente incorporado ao hidrogel. Este é o mecanismo mais comum dos hidrogéis e a liberação dos agentes segue o modelo da lei de difusão de Fick²⁴. Correa e col.¹⁶⁵ destacam que mesmo dessa forma, esse tipo de transporte ainda é mais vantajoso que a administração do agente terapêutico livre. O aumento da concentração dos polímeros e/ou do agente reticulante, pode ser usado com estratégia para diminuir o tamanho dos poros e consequentemente, regular a liberação¹⁹⁷.

Quando os poros e o agente terapêutico apresentam tamanhos próximos, há uma diminuição drástica na velocidade de liberação do agente terapêutico¹⁹⁸. O mecanismo de liberação do agente terapêutico, neste caso, é dominado pela degradação da matriz polimérica. De modo que, a cinética de erosão é o fator crítico

da cinética de liberação¹⁶⁵. Podem também serem aplicadas estratégias para aumentar o tamanho do poro e permitir a liberação do agente. Durante a degradação, que pode ocorrer nas cadeias poliméricas e nas ligações reticulantes, os poros aumentam e os agentes terapêuticos se difundem através do hidrogel. Essa degradação é, em geral, mediada por hidrólise, atividade enzimática ou pela aplicação de algum estímulo externo, como a luz UV¹⁹⁹.

A degradação ou erosão pode ser preferencialmente superficial ou de dentro para fora (*bulk*), sendo esta última forma, a mais comum entre os hidrogéis devido à alta permeabilidade de água ou enzimas¹⁴². Enquanto a degradação superficial ocorre quando as cadeias poliméricas são quebradas mais rapidamente que a difusão da água ou enzimas na matriz do hidrogel. É de suma importância o conhecimento do grau de toxicidade (que deve ser nulo ou muito próximo a zero) dos produtos da degradação, uma vez que eles devem ser pequenos suficientes para a remoção natural pelo corpo¹⁹⁸.

A liberação de agentes terapêuticos também é afetada pela responsividade dos hidrogéis ao meio. Alvarez-Lorenzo e col.²⁰⁰ em seus experimentos, observaram que a capacidade de seus hidrogéis responderem à temperatura e ao pH e consequente, ativação e desativação da liberação de moléculas ativas, dependia fortemente das interações dos agentes terapêuticos com a rede polimérica. Durante o intumescimento há um aumento no tamanho dos poros do hidrogel. Este aumento é desencadeado por diversos estímulos externos diferentes, sendo a sensibilidade ao pH o mais importante para sistemas de liberação oral ou de câncer, devido às condições mais ácidas intra e extracelulares que estas regiões apresentam²⁰¹. Os hidrogéis macroscópicos que apresentam a liberação de agentes terapêuticos controlada pelo intumescimento sofrem com a difusividade lenta de água na matriz, portanto, a resposta se torna lenta¹⁴². Isso porque o tempo necessário para o agente terapêutico difundir através do hidrogel (t_{diff}) depende do comprimento da matriz polimérica (espessura do hidrogel, H) e é em geral estimado por: H^2/D em que D é a difusividade²⁰².

A degradação da matriz polimérica e intumescimento, a aplicação de deformações mecânicas, campos magnéticos ou ultrassom também constituem a base da liberação controlada de terapêuticos¹⁴². Campos magnéticos podem ser aplicados quando partículas ou outras nanotecnologias magnéticas estão inseridas na

matriz polimérica²⁰³. As ondas ultrassônicas produzem disruptão transiente das cadeias, tornando a liberação dos agentes terapêuticos pulsada, sendo bastante empregada na liberação de insulina, mimetizando o padrão biológico^{204,205}. As deformações puramente mecânicas podem ser aplicadas²⁰⁶, porém podem levar às falhas mecânicas irreversíveis e como alternativa, hidrogéis com capacidade de autorrecuperação vêm sendo desenvolvidos e otimizados³⁶.

Na administração de agentes terapêuticos de forma localizada na região intratumoral é considerada a interferência principal do pH. Células tumorais apresentam pH extracelular mais ácido (em torno de 6,4) que células saudáveis (~7,4)²⁰⁷. Grande parte das moléculas de agentes terapêuticos são consideradas instáveis *in vivo*. Isso porque são susceptíveis à degradação enzimática *in vivo* e pela atuação dos rins que exige administração de doses maiores que as necessárias¹⁴². Com isso, no hidrogel injetável proposto neste trabalho de tese, pretende-se obter características tais que possam se adequar a liberação de fármacos e bioativos individual e simultaneamente.

3.4.2 Liberação simultânea de agentes terapêuticos

A liberação simultânea por hidrogéis consiste na administração local conjunta de dois ou mais agentes terapêuticos para obter efeitos sinérgicos ou complementares sobre o organismo^{190,208–210}. A terapia combinada é uma prática clínica e hospitalar padrão na oncologia e no tratamento de doenças infeciosas. Murney²¹¹ alertou que a determinação das combinações terapêuticas adequadas, deve ser feita com base nas evidências comprovadas na literatura, para então planejar a produção de hidrogéis que comportem tais combinações.

Segundo Farokhi e col.²¹², na engenharia de tecidos a liberação simultânea também tem despertado muito o interesse dos pesquisadores e indústria, devido ao efeito sinérgico da liberação de fatores de crescimento e diferenciação celular com a mimetização do meio celular. E em termos comerciais, as previsões mercadológicas conjecturam que o crescente consumo de produtos de higiene e cuidados pessoais outro fator responsável pelo crescimento do mercado dos hidrogéis¹⁴³.

As combinações mais comuns e amplamente incorporadas a hidrogéis injetáveis são as quimioterápicas^{67,213,214}. Em sua revisão, Yu e col.²¹⁵ classificaram as combinações quimioterápicas dos hidrogéis injetáveis, em quimio e imunoterapia,

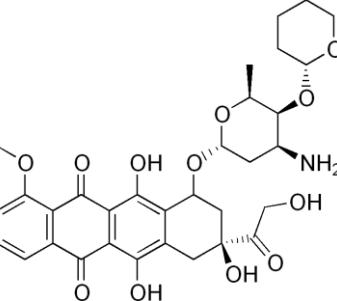
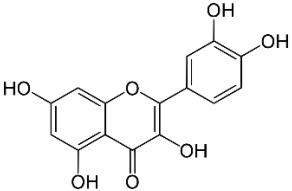
quimio-hipertermia, quimio-quimo e a quimio associada a radioterapia. Os autores ressaltam a importância dos hidrogéis como plataformas para promover a melhoria da qualidade de vida dos pacientes oncológicos ao reduzirem os efeitos adversos e proporcionarem uma administração prolongada dos quimioterápicos.

A doxorrubicina ou adriamicina (nome comercial) é um quimioterápico citotóxico da família das antraciclinas². Sendo um dos fármacos mais eficazes no combate a diversos tipos de câncer pediátricos e adultos, esta quinona atua diretamente no DNA das células de três formas diferentes²¹⁶. A doxorrubicina inibe a enzima topoisomerase II, intercala-se na estrutura do DNA e provoca danos oxidativos nas proteínas celulares²¹⁷. Entretanto, por ser altamente tóxico em células não-tumorais, principalmente, miocárdicas tem sua concentração limitada quando administrado sistemicamente²¹⁸.

Outro agravante ainda presente na quimioterapia é a resistência à múltiplas drogas, que é considerada um dos principais motivos do insucesso do tratamento²¹⁹. A causa da resistência medicamentosa é atribuída a uma série de fatores, sendo um deles a diminuição da concentração intracelular do quimioterápico pela ação de bombas de efluxo (glicoproteínas-p e proteínas MRP1)²²⁰. Assim, o uso de um agente inibidor de bombas de efluxo em combinação com a doxorrubicina seria ideal para protegê-lo do efluxo, sem causar danos adicionais às células saudáveis.

De fato, a utilização de agentes naturais coadjuvantes na quimioterapia tem atraído bastante atenção dos pesquisadores, pois possibilita o aumento da eficácia da doxorrubicina em menores concentrações, reduzindo os efeitos tóxicos aos tecidos saudáveis²²¹. Diversas famílias de metabólitos secundários de plantas têm atuado em diversas frentes ligadas ao metabolismo do câncer²²². Dentre elas, os alcaloides, compostos fenólicos, naftoquinonas e derivados exibem efeitos anticancerígenos promissores em pesquisas *in vitro* como *in vivo*^{223,224}. No **Quadro 1** estão resumidas algumas características dos agentes terapêuticos que foram utilizados neste trabalho de tese. Com base nas informações discutidas neste capítulo, espera-se que estes agentes representantes de três classes diferentes contribuam para o aumento da eficácia anticancerígena da doxorrubicina através da administração simultânea e localizada em regiões tumorais.

Quadro 1 - Doxorrubicina e Quercetina para uso em combinação.

| Agente terapêutico | Classe | Estrutura química | Tipo de Câncer avaliado <i>in vitro</i> e/ou <i>in vivo</i> | Referências |
|----------------------------|--------------|---|--|-------------|
| Doxorrubicina (cloridrato) | Antraciclina |  | Mama, próstata, útero, ovário, esôfago, pulmão, pele (melanoma), sarcomas de partes moles etc. | 225,226 |
| Quercetina | Flavonoide |  | Mama, Leucemia, próstata, pulmão, cólon e gástrico, ovário etc. | 227,228 |

A quercetina, faz parte da classe de compostos fenólicos chamada flavonoides e da subclasse flavonol²²⁹. Encontrada em diversas frutas e vegetais, a quercetina apresenta volume bastante notório de publicações que avaliam suas características antioxidantes e anti-inflamatórias, além de revisões que integram grande parte dos estudos realizados²³⁰⁻²³³. Esse flavonoide tem sido bastante estudado por suas propriedades anticâncer^{7,234,235}. Estudos atribuem à quercetina a capacidade de suprimir o desenvolvimento e induzir a apoptose de células cancerosas por diferentes rotas^{229,236}. A potencialização do efeito anticâncer da doxorrubicina à associação terapêutica com a quercetina tem sido amplamente reportada pela literatura^{221,227,237-240}. Estes estudos evidenciam os indícios de sinergismo em sua atuação em diferentes tipos de câncer e sua ação quimioprotetora.

No geral, as combinações das diversas terapias investigadas na administração por hidrogéis injetáveis podem ser de dois ou mais agentes terapêuticos. Sendo os agentes, ambos fármacos; fármacos e substâncias encontradas em fontes naturais, ou ainda, entre quaisquer um desses somados ao efeito sinérgico terapêutico que a matriz polimérica exerce. Hidrogéis com matrizes compostas por quitosana exemplificam o efeito sinérgico da matriz, pois são conhecidas por sua propriedade antibacteriana³⁴.

Pesquisas com hidrogéis injetáveis têm explorado diferentes moléculas e tratamentos: berberina e evodiamina (fitoterápicos) no tratamento de depressão²⁴¹; metotrexato (quimioterápico) e dexametasona (corticosteroide) no tratamento da artrite reumatoide²⁴²; ilhotas pancreáticas (células que produzem hormônios responsáveis pelo controle glicêmico) e lipossomo de clodronato comercial, como agentes imunoprotetores para o tratamento de diabetes tipo 1²⁴³. Além das combinações que estão resumidas no **Quadro 2** e foram incorporadas.

Quadro 2 - Seleção de artigos com algumas características dos hidrogéis injetáveis dinâmicos à base de polímeros naturais e derivados para liberação simultânea de agentes terapêuticos (2016- 2022).

| Polissacarídeos | Reticulação* | Agentes Terapêuticos | Liberação | Intumescimento (%) | Propriedades mecânicas** | t _{gel} (s) | Aplicação (Terapia) | Referências |
|--|------------------------------|--|--|--------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|-------------|
| Dextrano oxidado, plurônico F127 e quitosana | Base de Schiff (F127micelas) | 5-Fluorouracil e curcumina (F127micelas) | Cur. < 5-Flu e maior liberação em pH ácidos | NA | NA | 120 | Quimioterapia | 244 |
| Pululano oxidado, Lisina e polietilenimina ramificada | Base de Schiff (+ fármacos) | Doxorrubicina e Cisplatina | Cis > Dox. e maior liberação em pH 5,0 | 1353-1538 | NA | 40-250 | Quimioterapia | 208 |
| Quitosana modificada com melatonina (micropartículas), Carboximetil Quitosana e OSA (hidrogel) | Base de Schiff | Metilprednisolon a e Melatonina (micropartículas) | Liberação de ambos mais sustentada quando no compósito | NA | G' > G" | NA | Regenerativa | 245 |
| Amido oxidado (micela) e quitosana | Base de Schiff | Insulina e natoquinase | Insulina < natoquinase | NA | NA | 3600 | Antidiabética | 246 |
| Quitosana, nanowhiskers, grafeno e dialdeído sintético | Base de Schiff | Doxorrubicina e curcumina | Doxorrubicina > curcumina e maior liberação em pH 5,0 | 6985 (máx.) | NA | 120-360 | Quimioterapia | 182 |
| OSA, CaSO ₄ e zeína (nanopartículas) | Base de Schiff e iônica | Células-troncos e 5-azacitadina (nanopartículas) | 34,5% liberados de 5-aza em 7 dias pH 7,4 (nanopartículas) | > 2000 | G' > G" | 60-120 | Cardíaca | 163 |

| Polissacarídeos | Reticulação* | Agentes Terapêuticos | Liberação | Intumescimento (%) | Propriedades mecânicas** | t_{gel} (s) | Aplicação (Terapia) | Referências |
|---|------------------------------|--|--|--------------------|--|---------------|--|-------------|
| Dextrano oxidado, ácido hialurônico modificado com PeP | Base de Schiff | Peptídeos antimicrobianos e plasma enriquecido com plaquetas (PeP) | Peptídeos antimicrobianos > fatores de crescimento | 2000-4000 | $G' > G''$ | NA | Antimicrobiana e estimulante de colágeno | 159 |
| Dextrano oxidado | Base de Schiff (fármacos) | Sulfadiazina e Tobramicina | Taxas semelhantes com maior liberação em pH 5,0 | 1000-2000 | NA | 60-1500 | Antibacteriana | 186 |
| <i>Gelatina</i> funcionalizada com hidrazina e plurônicos F127 (micelas) | Base de Schiff (F127micelas) | 5-Fluorouracil e curcumina (F127micelas) | Curcumina < 5-Fluorouracil com maior liberação em pH 5,0 | 1000-1350 | $G' > G''$ | ~ 60 | Quimioterapia | 247 |
| <i>Gelatina</i> funcionalizada com grupos metacrilóis (microgel), amido oxidado | Base de Schiff e amida | Vancomicina (microgel) e Lisostafina (hidrogel) | Liso > Vanc. | ~ 1100 | E com agentes > E sem | 50-120 | Antibacteriana | 248 |
| Quitosana com goma guar oxidada | Base de Schiff | Aspirina e Curcumina | Curcumina < Aspirina em pH intestinal e do cólon | 5 - 30 | $\sigma >$ com mais agente reticulante | 50 - 90 | Quimioterapia | 249 |
| <i>Gelatina</i> funcionalizada com grupos metacrilóis (microgel), ácido hialurônico oxidado | Base de Schiff | Sulfato de gentamicina e Lisozima | Lisozima > Gentamicina pH mais ácido | 27 - 127 | NA | 180 -300 | Antibacteriana | 250 |

*Entre parênteses, reticulados à matriz polimérica. **Referentes às propriedades elásticas próprias de géis. NA: Não Avaliado. σ : resistência a tração.

Ainda, os efeitos das combinações de fármacos podem ser aditivos, sinérgicos ou antagônicos. No efeito aditivo, a resposta combinada equivale à soma dos efeitos individuais. No sinérgico, a combinação gera um efeito maior do que o esperado, permitindo doses menores e menor toxicidade. Já no efeito antagônico, a interação reduz a eficácia do tratamento. A avaliação dessas interações é complexa, pois diferentes modelos e definições são utilizados para quantificá-las²⁵¹.

A partir dos tópicos apresentados nesse capítulo, especialmente, os conceitos relacionados às propriedades que os hidrogéis injetáveis precisam apresentar para serem empregados como veículos de liberação de agentes terapêuticos; os métodos comumente utilizados pela literatura e que foram utilizados nesta pesquisa, estão apresentados no capítulo a seguir. Tais métodos englobam a determinação e avaliação das principais propriedades avaliadas nesta pesquisa que, por consequência, suportam a produção e caracterização dos hidrogéis injetáveis e seus precursores poliméricos propostos neste estudo. No entanto, a determinação do efeito combinado dos agentes incorporados não foi realizada, sendo um aspecto relevante para investigações futuras.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

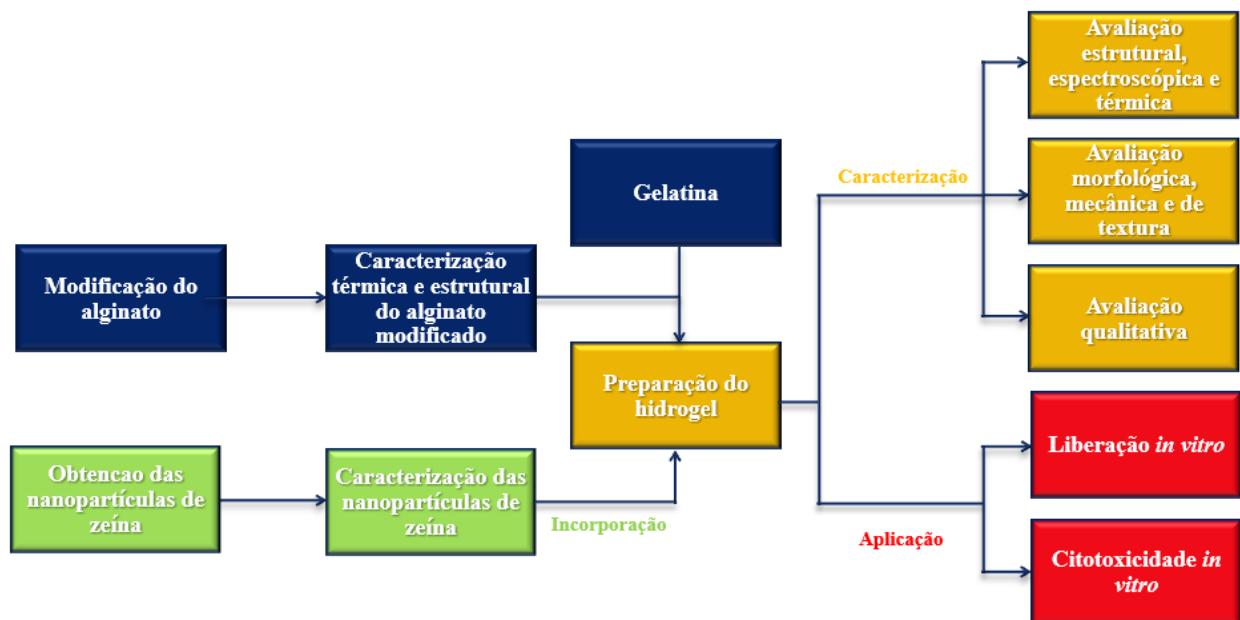
As reações de oxidação e análises de caracterização estrutural e térmica do alginato e seus derivados oxidados foram realizadas durante o doutorado sanduíche em 2020 na Universidade de Alberta (*U of A*), Canadá financiado pelo Programa Institucional de Internacionalização da UFPB (CAPES-PrInt-UFPB), sob supervisão do Professor Dr. Michael J. Serpe.

A produção do hidrogel, nanopartículas e demais caracterizações foram realizadas no Núcleo de Pesquisa e Extensão de Combustíveis e de Materiais (LACOM/UFPB) e em alguns laboratórios do Departamento de Química (DQ/UFPB), como LASOM, LASOB e LMMRQ.

A atividade citotóxica foi realizada junto ao Laboratório de Oncofarmacologia (ONCOFAR/UFPB) sob orientação da professora Marianna Sobral. Enquanto as análises microscópicas das nanopartículas de transmissão (MET) e de força atômica (AFM) foram realizadas em parceria aos professores Marcelo Viana (CTNano/UFMG) e Marcos Vinícius (UFBA).

O esquema da **Figura 10** apresenta uma visão geral das etapas de desenvolvimento dos hidrogéis executadas nesta pesquisa.

Figura 10 – Esquema geral do desenvolvimento dos hidrogéis.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

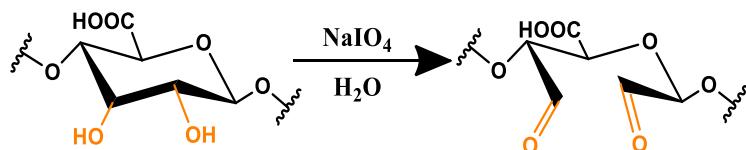
4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os solventes e reagentes utilizados foram adquiridos comercialmente e utilizados sem purificações adicionais, incluindo: Alginato de Sódio de massa molar média (W201502), Metaperiodato de Sódio (98%), Etlenoglicol anidro (99,8%), Álcool Etílico anidro (99,8%), Acetona (P.A.), Bicarbonato de Sódio ($\geq 99,5\%$), Ácido Clorídrico (37%), Ácido Tricloroacético ($\geq 99\%$), Tampão Fosfato-Salino (PBS) 1x, Quercetina, Cloridrato de Doxorrubicina (Referência Padrão Farmacopeia Europeia – MM 579,98), Terc-Butil Carbazato (98%), Ninidrina (MM 178,14), TNBS (ácido Trinitrobenzeno sulfônico), Óxido de Deutério (99% D), Zeína (~98%), Carbonato de sódio (Na_2CO_3 , ~99,8%), Quitosana (50–190 kDa), membrana de celulose (limite de exclusão de $1,4 \times 10^4$ g/mol) e gelatina comercial. A água ultrapura foi obtida por meio de um sistema de purificação Milli-Q. A linha celular MCF-7 foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil).

4.2 OXIDAÇÃO DO ALGINATO

A funcionalização foi realizada por meio da oxidação do alginato de sódio (**Figura 11**) de acordo com o método descrito por Emami e col.⁸⁴.

Figura 11 - Esquema reacional geral da oxidação do alginato de sódio.



Fonte: Elaborado pela autora (2025).

Soluções com 2 e 5 g de alginato de sódio foram preparadas em 100 mL de água Milli-Q. Em seguida, foram adicionados, gota a gota, 50 mL da solução aquosa de periodato de sódio, para obter diferentes razões molares de periodato por unidade monossacarídica do alginato (**Tabela 4.1**). As reações de oxidação foram feitas sob agitação magnética vigorosa, durante 6 horas, à temperatura ambiente, protegidas da luz para evitar a fotodegradação do periodato²⁵². Ao fim das 6 horas, foi adicionado etlenoglicol equimolar ao periodato de sódio e a mistura reacional permaneceu sob agitação por mais 30 minutos. A solução resultante foi dialisada contra água destilada, em membrana com limite de exclusão de $1,4 \times 10^4$ g/mol, durante 3-4 dias com trocas

de água diárias, para purificação. A solução dialisada foi liofilizada por 24 horas para obtenção do produto alginato de sódio oxidado (OSA).

A identificação qualitativa do produto foi feita pelo teste com o reagente de Schiff. O acompanhamento da reação foi feito por espectroscopia de IV, onde alíquotas eram retiradas a cada uma hora. A massa molar média do alginato utilizado foi de $3,035 \times 10^5$ g/mol, determinada por cromatografia de permeação em gel - GPC. A massa molar de uma unidade monossacarídica do alginato é de 198 g/mol e a quantidade de alginato utilizada, o grau de oxidação teórico e a codificação de cada produto estão descritos na **Tabela 4.1**.

Tabela 4.1 - Variação da concentração de alginato, grau de oxidação teórico do alginato e identificação dos derivados oxidados OSA.

| Concentração de alginato % (m/v) | Grau de oxidação teórico NaIO ₄ /Unidade monossacarídica (mol%) | Produto (OSA) |
|----------------------------------|--|---------------|
| 5 | 40 | 540 |
| 5 | 60 | 560 |
| 5 | 80 | 580 |
| 2 | 80 | 280 |

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

4.3 CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO ALGINATO OXIDADO

O alginato oxidado foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho (IV) utilizando um equipamento espetrômetro modelo IR Prestige-21 (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) operando à temperatura ambiente, na região espectral compreendida entre os comprimentos de onda de 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹, número de acumulações igual a 20 e modo de transmitância. As amostras foram dispersas em Brometo de Potássio (KBr).

A caracterização estrutural por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear para o núcleo de Hidrogênio (RMN de ¹H) e de Correlação Quântica Única Heteronuclear (HSQC) obtidos em equipamentos Agilent modelo (Agilent Technologies, Inc., Califórnia, EUA) e Bruker AM-400 (Bruker Corporation, Massachusetts, EUA) operando a 400 e 500 MHz. As amostras foram dissolvidas em água deuterada (D₂O) e Dimetilsulfóxido (DMSO-d₆).

4.4 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA

A análise termogravimétrica (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) do alginato puro e seus derivados funcionalizados foram feitas em um equipamento Perkin Elmer Pyris 1 (Perkins Elmer LLC., Massachusetts, EUA), em atmosfera de nitrogênio (20 mL/min), na faixa de temperatura de 25 °C a 400 °C, em cadinho de alumina e taxa de aquecimento de 10 °C/min.

4.5 OBTENÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE ZEÍNA

As nanopartículas de zeína revestidas com quitosana foram produzidas utilizando carbonato de sódio como *template* sacrificial, seguindo uma versão modificada do método descrito por Khan e seus colaboradores¹⁷. O procedimento envolveu a mistura de 3,5 mL de etanol absoluto com 5,0 mL de uma solução de zeína a 50 mg/mL em uma mistura de etanol-água a 70%. A esta solução, foram adicionados 1,5 mL de uma solução aquosa de Na₂CO₃ a 1%. A mistura resultante foi submetida à agitação magnética a 1000 rpm por 1 minuto, com adição sequencial de 40 mL de água ultrapura. As nanopartículas formadas foram então combinadas com uma solução de quitosana a 1 mg/mL em ácido acético a 1%, utilizando uma proporção volumétrica de 1:1 e agitada a 1000 rpm por 30 minutos.

O etanol foi removido da dispersão de partículas com um evaporador rotativo modelo EV400H-V (Labtech, Sorisole, Bergamo, Itália) a 35°C durante 30 minutos. As partículas instáveis foram separadas da dispersão por centrifugação a 4230 rpm por 15 minutos, seguida de centrifugação do sobrenadante a 9550 rpm por 30 minutos para remover a quitosana não adsorvida. O precipitado resultante foi disperso em um volume igual de água para obter nanopartículas ocas (HNP). Finalizando com subsequente liofilização por 24 horas.

As nanopartículas de zeína encapsulando quercetina e revestidas com quitosana (QNPs) foram produzidas a partir da adição de 10 mg de quercetina a uma solução estoque de zeína a 50 mg/mL em uma mistura de etanol-água, atingindo uma concentração final de 250 µg/mL de quercetina na dispersão de partículas, seguindo o mesmo procedimento realizado para a obtenção das HNPs.

4.5.1 Potencial zeta e tamanho de partícula

O potencial zeta e a distribuição dos tamanhos das nanopartículas de zeína (HNP e QNP) foram analisados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) conforme Sharma e colaboradores ¹⁶³.

4.5.2 Capacidade e eficiência de encapsulamento

As nanopartículas de quercetina (QNPs) foram submetidas à centrifugação a 4230 rpm por 15 minutos para eliminar qualquer quercetina não encapsulada. O sobrenadante resultante foi diluído 50 vezes em etanol e a quantidade de quercetina foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível modelo UV2550 (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) com a absorção de quercetina (QUE) medida no comprimento de onda de 373 nm. Uma curva de calibração foi construída para concentrações variando de 1 a 20 mg/mL, com um coeficiente de correlação de 0,999 - conforme ilustrado na **Figura A1 (Apêndice)**. Cada medição foi realizada em triplicata. A eficiência e a capacidade de encapsulamento de QUE nas nanopartículas foram determinadas usando as **Equações (1) e (2)**. Os resultados foram apresentados como valor médio, acompanhado pelo desvio padrão.

$$\text{Capacidade de encapsulação (\%)} = \frac{\text{Quercetina contida nas nanopartículas (\mu g)}}{\text{Zeína e quitosana (\mu g)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Eficiência da encapsulação (\%)} = \frac{\text{Quercetina no sobrenadante}}{\text{Total de quercetina adicionado}} \times 100 \quad (2)$$

4.5.3 Espectroscopia de IV

Os materiais de partida (zeína, quitosana e quercetina) e as nanopartículas (HNP e QNP) foram caracterizadas por espectroscopia de IV conforme descrito no item 4.3.

4.5.4 Difração de raios X (DRX)

As nanopartículas (HNP e QNP) e seus principais componentes (zeína, quitosana e quercetina) foram analisadas em um difratômetro de raios X modelo XRD-6000 (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) operando à voltagem de 30 kV e corrente de 30 mA. Foram feitas varreduras no intervalo de 2θ entre 5 e 40° , com

um passo de 0,02° e velocidade de 1° min⁻¹, utilizando como fonte de radiação CuKα λ=1,5406 Å.

4.5.5 Caracterização morfológica

Análise da morfologia das nanopartículas de zeína (HNP) foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando dois microscópios diferentes. Na análise realizada no microscópio modelo Tecnai G2-F20 SuperTwin operando a 200 kV (FEI Compay, Oregon, EUA), a amostra foi preparada por dispersão ultrassônica em isopropanol e, em seguida, depositada sobre uma grade de cobre de 300 mesh com filme de carbono perfurado. Na análise realizada com o microscópio modelo JEM-2800, operando a 200kV (JEOL USA Inc., Peabody, EUA), a amostra foi preparada em suspensão aquosa de água ultrapura e, em seguida, depositada sobre uma grade de cobre revestida com Formvar e carbono. A amostra foi então contrastada negativamente com uma solução de 2% de acetato de uranila.

De forma complementar, as HNP foram avaliadas por microscopia de força atômica (AFM) utilizando um microscópio modelo SPM-9700 (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão) no modo fase (sem contato), com uma sonda de curvatura inferior a 10 nm. A amostra foi aplicada em lâminas de mica moscovita recém-clivadas, usando uma suspensão preparada em água ultrapura.

4.6 PRODUÇÃO DO HIDROGEL

Para a produção dos hidrogéis (OSAG), foram preparadas soluções precursoras de OSA e gelatina. Ambos foram dissolvidos separadamente em solução tampão PBS (pH 7,4), à temperatura ambiente. Foram obtidas concentrações de 5, 10, 15 e 20% (m/v). Em seguida, as soluções foram misturadas em diferentes proporções volumétricas (1:1), (1:2) e (2:1). Os hidrogéis obtidos foram armazenados em frascos cilíndricos de 2,5 cm de diâmetro por 3,5 cm de altura, armazenados à temperatura ambiente por 24 h para garantir a gelificação completa antes das análises. Em seguida, as amostras gelificadas foram lyophilizadas no próprio frasco cilíndrico.

Para a produção dos hidrogéis contendo as nanopartículas (OSAGH e OSAGQ), as QNPs foram incorporadas já na solução precursora de OSA ¹⁶³. As etapas seguintes foram feitas de acordo com a descrição da produção de OSAG.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL

O hidrogel obtido foi caracterizado em termos estruturais, morfológicos, mecânicos, térmicos e reológicos; de forma qualitativa, quanto à sua capacidade de autorreparação, injetabilidade e tempo de gelificação.

4.7.1 Avaliação qualitativa

O hidrogel preparado com as soluções precursoras nas proporções de 10% (m/v) de OSA 540 e 15% (m/v) de gelatina (1:1) em volume, foi escolhido com base na avaliação qualitativa do tempo de gelificação utilizando o método de inversão de tubo¹⁷⁷. O método consiste em registrar o tempo necessário para a mistura das duas soluções precursoras de hidrogel se transformarem em gel, ou seja, o tempo em que o gel não flui quando o tubo/frasco é invertido. Todos os experimentos foram realizados em triplicata a 37 °C, com inversão do tubo (raio de 7,5 mm) a cada 10 segundos. O resultado foi relatado como o valor médio acompanhado do desvio padrão.

A injetabilidade do OSAG foi investigada extrudindo o disco de hidrogel através de uma seringa de 2 mL com uma agulha de calibre 21 a 37 °C^{227,253}.

A autorreparação foi avaliada colocando o OSAG em um molde cilíndrico (10 mm de diâmetro e 5 mm de altura) e dividindo o disco em duas metades. Uma parte foi imersa em solução saturada do corante azul de metileno e a outra permaneceu intacta^{34,137}. Ambas foram reconectadas e incubadas a 37 °C. Observações visuais foram feitas em intervalos de tempo aleatórios para avaliar a autorreparação e a difusão do corante através da junção. A morfologia superficial do hidrogel autorreparado foi analisada utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) após a liofilização, utilizando um microscópio eletrônico de varredura modelo MIRA3 LMH FE-SE (Tescan Orsay Holding, Brno, República Tcheca), operando com uma voltagem de aceleração de 10 kV.

4.7.2 Intumescimento e degradação

Para avaliar a capacidade de absorção de água ou grau de intumescimento, amostras em triplicata do hidrogel (previamente liofilizado por 24 horas) foram imersas em placas de petri contendo soluções tampão PBS 1x pH 6,8 e 7,4 à temperatura ambiente. Em intervalos de tempo específicos, os hidrogéis eram removidos do meio

com o auxílio de uma pinça, secos com papel toalha para retirar o excesso de água da superfície e pesados. Todos eram colocados de volta no meio respectivo ao mesmo tempo. O grau de intumescimento foi então determinado usando a **Equação (3)**, conforme Solomevich e Pandit e seus colaboradores^{137,253}.

$$\text{Grau de Intumescimento (\%)} = \left(\frac{m_e - m_s}{m_s} \right) \quad (3)$$

Onde, m_e é a massa da amostra no estado de equilíbrio de intumescimento e m_s é a massa da amostra completamente seca (inicial).

O grau de degradação dos hidrogéis foi estudado em solução tampão PBS 1x e determinado calculando a diferença de perda de massa dos hidrogéis, conforme a **Equação (4)**, procedimento análogo ao de intumescimento, porém, com o uso de uma incubadora para manter a temperatura do meio constante. Antes da análise, o hidrogel foi liofilizado por 24 horas. Amostras do hidrogel, em triplicata, foram imersas em placas de petri contendo soluções de PBS 1x com pH 7,4 e pH 6,8, incubadas a 37 °C e pesadas periodicamente. A perda de massa desses hidrogéis foi monitorada em intervalos de tempo específicos utilizando a técnica gravimétrica.

$$\text{Grau de degradação (\%)} = \frac{m_e - m_t}{m_e} \times 100 \quad (4)$$

Onde, m_t é a massa da amostra em um determinado tempo e m_e a massa no estado de equilíbrio de intumescimento.

4.7.3 Caracterização estrutural e térmica

A análise das interações entre os polissacarídeos presentes na matriz dos hidrogéis foi realizada por meio da espectroscopia de IV de acordo com o **item 4.3**. As amostras de hidrogéis foram liofilizadas e submetidas à análise. Onde foram feitas varreduras entre 600 e 4000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e intervalos de 2 cm⁻¹. De forma análoga foram investigadas as interações polissacarídeos-fármacos.

Os hidrogéis com e sem incorporação das nanopartículas foram caracterizados por TG. Os termogramas foram obtidos a partir de amostras de cerca de 5 mg, aquecidas à taxa de 10 °C/min entre 25 e 400 °C e plotados em termos de perda de massa. De forma complementar, foi realizada a caracterização por DSC.

4.7.4 Caracterização morfológica, mecânica e de textura

A morfologia dos hidrogéis liofilizados foi examinada por MEV em diferentes ampliações. Todas as amostras foram fixadas na superfície do porta amostra com o auxílio de uma fita de carbono dupla-face e revestidas com uma camada de ouro de aproximadamente 22,5 nm antes da análise.

O estudo reológico do hidrogel foi realizado com o auxílio de um reômetro modelo Haake Mars III (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) operando com geometria de placas paralelas (diâmetro: 35 mm, distância: 0,4 mm)²⁵⁴. Inicialmente, o hidrogel foi posicionado na placa inferior com o intuito de identificar o intervalo viscoelástico linear na faixa de 0,05 a 10 Pa a 25 °C. Na sequência, foi realizada uma análise de varredura de frequência, com a pressão mantida constante em 1 Pa, abrangendo o intervalo de 0,05 a 10 Hz a 25 °C. Essa varredura teve o objetivo de determinar os valores dos módulos de armazenamento (G') e de perda (G'').

A análise de textura foi conduzida em amostras cilíndricas de hidrogel OSAG com 12,5 mm de diâmetro e 20 mm de altura (3 mL cada), utilizando um analisador de textura TA-XT plus C (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). O procedimento adotado seguiu a metodologia previamente descrita para a análise do perfil de textura (TPA), empregando amostras cilíndricas de hidrogel e uma sonda P75 (diâmetro de 12,7 mm). Durante os ensaios, as amostras foram submetidas a um teste com as seguintes condições: velocidade de pré-teste de 2,0 mm/s, velocidade de teste de 2,0 mm/s, velocidade de pós-teste de 2,0 mm/s, compressão de 5 mm e força de gatilho de 5,0 g²⁵⁴.

4.8 Produção do hidrogel compósito e aplicação

Para o sistema de hidrogel compósito com doxorrubicina e nanopartículas de zeína contendo quercetina (OSAGC), procedimento análogo ao descrito no **item 4.6** foi realizado. Com exceção do seguinte passo, cloridrato de doxorrubicina foi adicionada à solução de 10% OSA de modo a obter uma solução com concentração final de 10 mg/mL de DOX. E à solução precursora de 15% gelatina foi adicionada QNP na mesma concentração. Após mistura de ambas as soluções precursoras, o gel foi vertido em moldes de silicone para completar a reação de gelificação durante a noite. O sistema de hidrogel compósito contendo apenas as nanopartículas com quercetina foi denominado OSAGQ.

4.8.1 Análise *in vitro* da liberação dos agentes terapêuticos

O perfil da liberação da doxorrubicina, de forma individual e combinada à quer cetina foi avaliado em dois ensaios paralelos. OSAGX (10 mg/mL), OSAGQ e OSAGC, com 750 μ L cada, foram imersos em placas de petri contendo 12 mL de solução tampão PBS 1x com 6,8 (simulando o pH do tecido tumoral) e 12 mL com pH 7,4 (simulando pH do tecido celular saudável) previamente incubadas a 37 °C.

A incubadora foi configurada para 100 rpm sob a mesma temperatura, e a cada intervalo de tempo definido, uma alíquota de 2 mL do meio (solução contendo os agentes terapêuticos liberados) foi coletada e submetida à análise. O volume exato do meio removido (2 μ L) foi reposto, a cada remoção, com solução tampão PBS para manter as condições *sink*²⁵⁵. Além disso, para evitar perdas relacionadas à evaporação, as placas de petri permaneceram cobertas e o meio foi exposto apenas durante o processo de amostragem, que foi realizado em triplicata.

A quantidade liberada de cada agente foi determinada com o auxílio de uma curva padrão e a detecção foi feita com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível modelo UV2550 (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão)¹⁶³. Antes de registrar a absorbância das amostras, ajustes de zero foram realizados para assegurar precisão.

As quantidades liberadas de doxorrubicina foram medidas a um comprimento de onda de 478 nm, enquanto a quer cetina foi analisada a 373 nm. As curvas de calibração da QUE e da DOX foram obtidas na faixa de concentração de 1 a 40 mg/mL, com um coeficiente de correlação de 0,999 (**Figura A2**). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Adicionalmente, os dados de cinética de liberação foram aplicados a cinco modelos de liberação de medicamentos: ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin.

4.8.2. Citotoxicidade *in vitro*

A viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio MTT, de acordo com a norma ISO 10993-5:2009 (Biological evaluation of medical devices; Part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity) e descrito por Moreira²⁵⁶. Estes ensaios foram realizados em colaboração no Laboratório de OncoFarmacologia (PgPNSB, UFPB). A linhagem celular MCF-7 foi obtida do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil) e mantida em Meio de Cultura Dulbecco Modificado (DMEM) suplementado com 1% de solução antibiótica (10.000 I.U./mL de Penicilina, 10.000 μ g/mL de Estreptomicina) e

10% de Soro Fetal Bovino (FBS). As células foram mantidas em incubadora a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂.

Para o ensaio de MTT, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração de 1×10^5 células/mL. Avaliou-se a citotoxicidade do sistema principal, OSAGC, composto de DOX e nanopartículas de zeína quercetina (QNP), incorporadas em um hidrogel. Além disso, foram examinados os hidrogéis contendo apenas DOX (OSAGX) ou apenas QNP (OSAGQ), bem como as drogas isoladas DOX e QUE.

As soluções de tratamento foram preparadas com uma concentração de 12 µg/mL de DOX e/ou QNP e adicionadas aos poços com o auxílio de uma eppendorf multipette® m4 e incubadas por 72 horas. Após a incubação, 110 µL do sobrenadante foram removidos, e 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados. As placas foram incubadas por mais 4 horas, após as quais 100 µL de uma solução de ácido clorídrico dodecil sulfato de sódio (SDS-HCl) a 10% foram adicionados para dissolver os cristais produzidos. A absorbância foi medida usando um espectrofotômetro (leitor de microplacas BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, EUA) a um comprimento de onda de 570 nm.

Foram realizados três experimentos independentes, cada um em triplicata ou quadruplicata, e os dados são expressos como a concentração que inibe o crescimento celular em 50% (IC50) ± erro padrão da média (SEM), determinado por análise de regressão não linear.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O alginato de sódio (SA) foi funcionalizado com grupos aldeídos em quatro diferentes proporções, com o grau de oxidação variando em 40, 60 e 80 mol% por unidade monossacarídica. Nas amostras de 80 mol%, utilizou-se concentrações de alginato de 2 e 5% m/v. As condições reacionais foram escolhidas com base nos resultados obtidos por Emami e col.⁸⁴. Os rendimentos (em massa) das reações de oxidação do alginato estão apresentados na **Tabela 5.1**.

Tabela 5.1 - Rendimento em massa para cada reação de oxidação realizada.

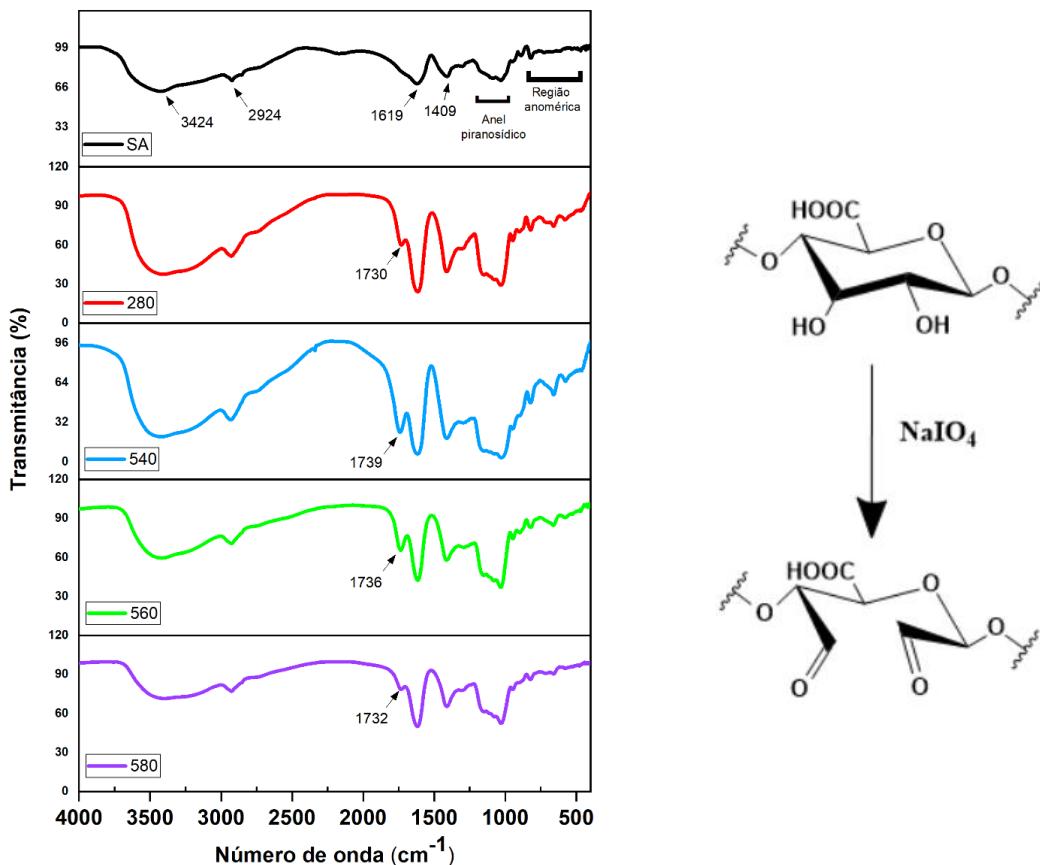
| Concentração de alginato %(m/v) | Grau de Oxidação teórico | | Produto | Rendimento (%) |
|------------------------------------|---|--|---------|-------------------|
| | NaO ₄ /Unidade monossacarídica (mol%) | | | |
| 5 | 40 | | 540 | 76 |
| 5 | 60 | | 560 | 76 |
| 5 | 80 | | 580 | 78 |
| 2 | 80 | | 280 | 66 |

Fonte: Dados próprios (2025).

Os rendimentos obtidos para os derivados oxidados com 5% (m/v) de SA são próximos do valor relatado por Salem, Sallam e Youssef²⁵⁷ de 70%, obtidos com os mesmos 0,025 mols de SA. O rendimento de 66% obtido neste trabalho pode ser atribuído à etapa de diálise, devido à liberação de cadeias de menor massa molar com consequente perdas durante a purificação do material.

A **Figura 12** mostra os espectros de IV do SA e de seus derivados oxidados. As bandas de absorções características de aldeídos entre 1730 e 1739 cm⁻¹, presentes nos espectros de IV das amostras 280, 540, 560 e 580; e ausentes em SA evidenciam a oxidação dos alginatos. Em geral, bandas características de grupos aldeídos (CHO) alifáticos, mais especificamente, suas carbonilas absorvem na região entre 1720-1740 cm⁻¹²⁵⁸.

Figura 12 - Espectro de absorção na região de IV do alginato e seus derivados oxidados (esquema reacional à direita).



Onde, SA – alginato de sódio puro; 280 – 2% (m/v) alginato de sódio e 80 mol% periodato de sódio; 540 – 5% (m/v) alginato de sódio e 40 mol% periodato de sódio; 560 – 5% (m/v) alginato de sódio e 60 mol% periodato de sódio; 580 – 5% (m/v) alginato de sódio e 80 mol% periodato de sódio.

Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

Emami e col.⁸⁴ observaram em seus alginatos oxidados, novas bandas de CHO em 1735 cm⁻¹. Bouhadir e col.²⁵⁹, Salem e col.²⁵⁷, Lee e Mooney¹⁰⁴, Zhou e col.²⁶⁰ também obtiveram resultados semelhantes. Devido à formação dos hemiacetais, a identificação dos aldeídos é dificultada, de modo que a nova banda é fraca, de baixa intensidade, semelhante a um ombro^{136,257}. Há casos em que esta banda não é detectada, devido à formação de hemiacetais entre os resíduos oxidados e não oxidados do alginato, como reportaram Sarker e col.²⁶¹.

Ramos⁸³ também atribui a baixa intensidade da banda de CHO há possíveis formas hidratadas do grupo aldeído (dois dióis geminais). Devido à alta reatividade dos aldeídos, eles podem formar hemiacetais intra e intermoleculares – como apresentado na fundamentação teórica – bem como, de acordo com Sirvio²⁶²,

aldeídos hidratados. Destaca-se a variação da intensidade das bandas de CHO dos derivados oxidados. Quanto maior o grau de oxidação, menos intensa é a banda.

As demais bandas comuns a todos os alginatos foram atribuídas, conforme apresentado na **Tabela 5.2**, e estão de acordo com as propostas pela literatura.

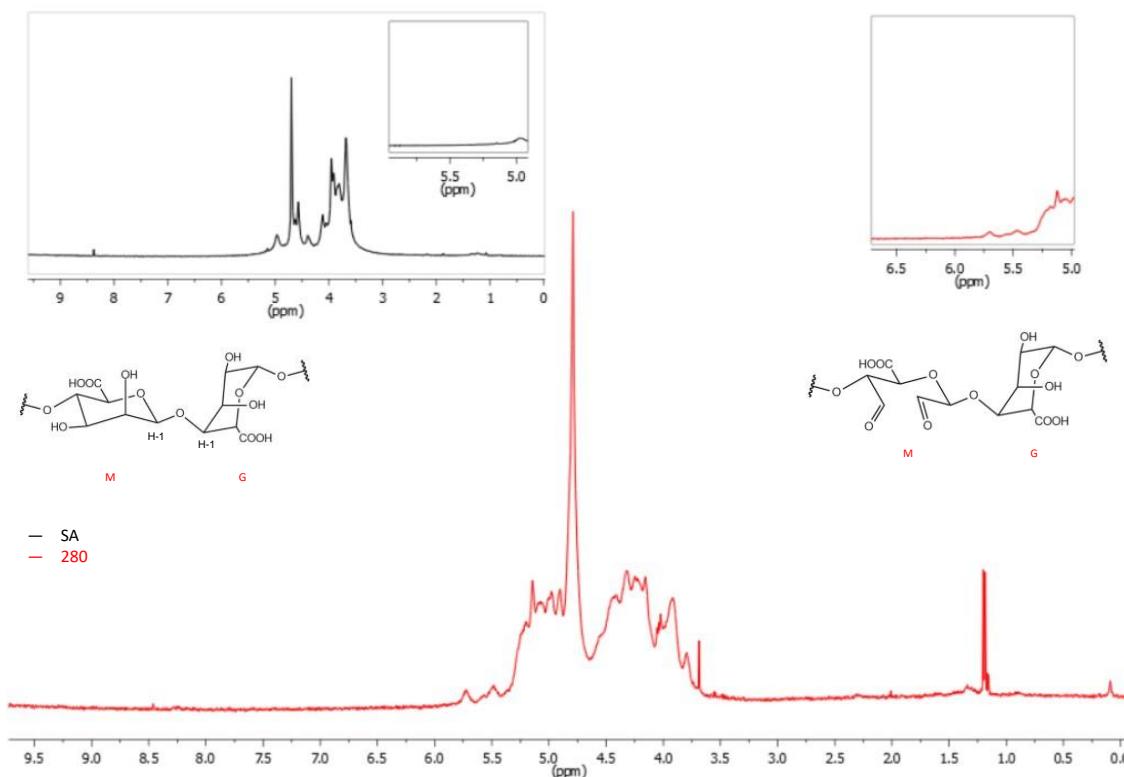
Tabela 5.2 - Atribuição das bandas de IV comuns aos alginatos.

| Número de onda da região (cm^{-1}) | Atribuição | Referências |
|---|---|----------------|
| 3400 - 3424 | Banda larga - estiramento vibracional (O-H) | 259,263 |
| 2924 - 2928 | Estiramento vibracional simétrico e assimétrico (C-H) | 259,263 |
| 1616 - 1619 | Estiramento vibracional assimétrico (-COO) | 84,261,263,264 |
| 1409 - 1413 | Estiramento vibracional simétrico (-COO) | 84,261,263,264 |
| 1308 - 1315 | Dobramento vibracional (C-H) | 261,264 |
| 1156 | Estiramento vibracional (C-C) | 261 |
| 1030 - 1086 | Estiramento (C-O-C) do anel piranosídico | 261,264 |
| <1000 | Região de carbono anomérico (C-O) estiramentos e dobramentos: resíduos do ácido urônico | 261,264 |

Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

A **Figura 13** apresenta os espectros de RMN de ^1H do alginato de sódio e do derivado oxidado 280 (2% de alginato de sódio e 80 mol% periodato). Os demais espectros de RMN de ^1H encontram-se apresentados na **Figura A3**.

Figura 13 - Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) do alginato de sódio e derivado 280.



Onde, SA – alginato de sódio puro; 280 – 2% (m/v) alginato de sódio e 80 mol% periodato de sódio.

Fonte: Dados próprios (2025).

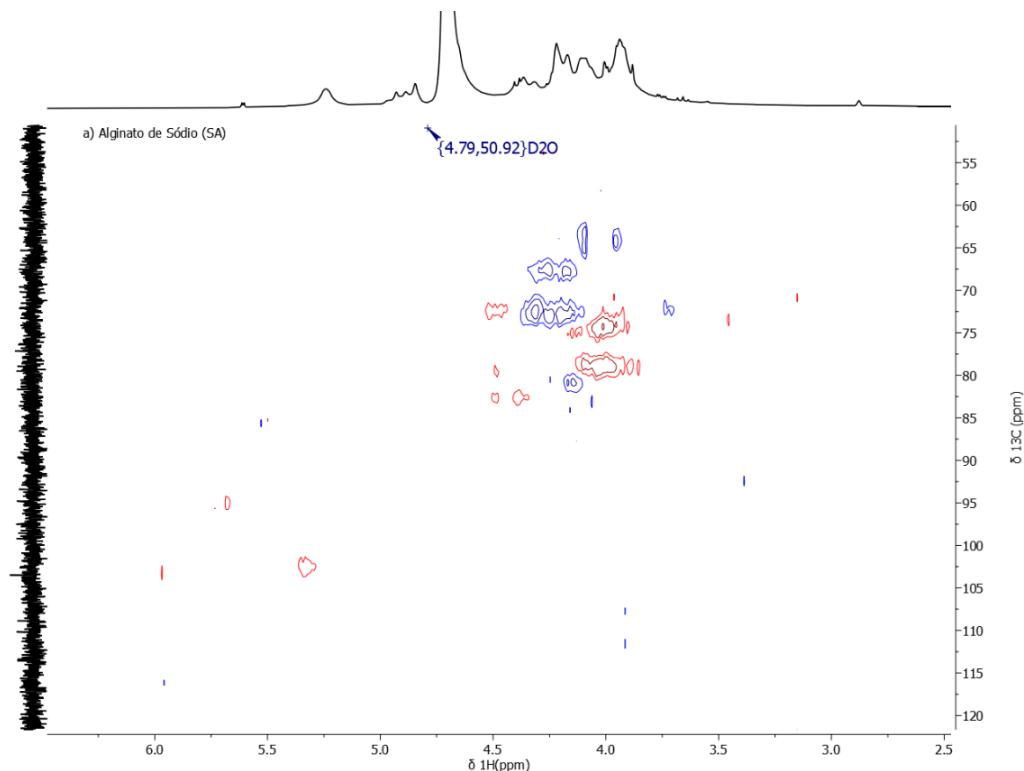
Os sinais característicos do alginato de sódio aparecem na região anomérica entre 4,5 e 5,0 ppm e correspondem às ressonâncias dos 10 hidrogênios das unidades M e G²⁶⁵. A princípio, os dois sinais próximos a 5,0 ppm (mais desblindados) podem ser atribuídos aos prótons H-1 G e H-1 M entre oxigênios devido à proximidade aos átomos de oxigênio glicosídicos. Tais atribuições corroboram com o observado por Jensen e col.⁵⁸.

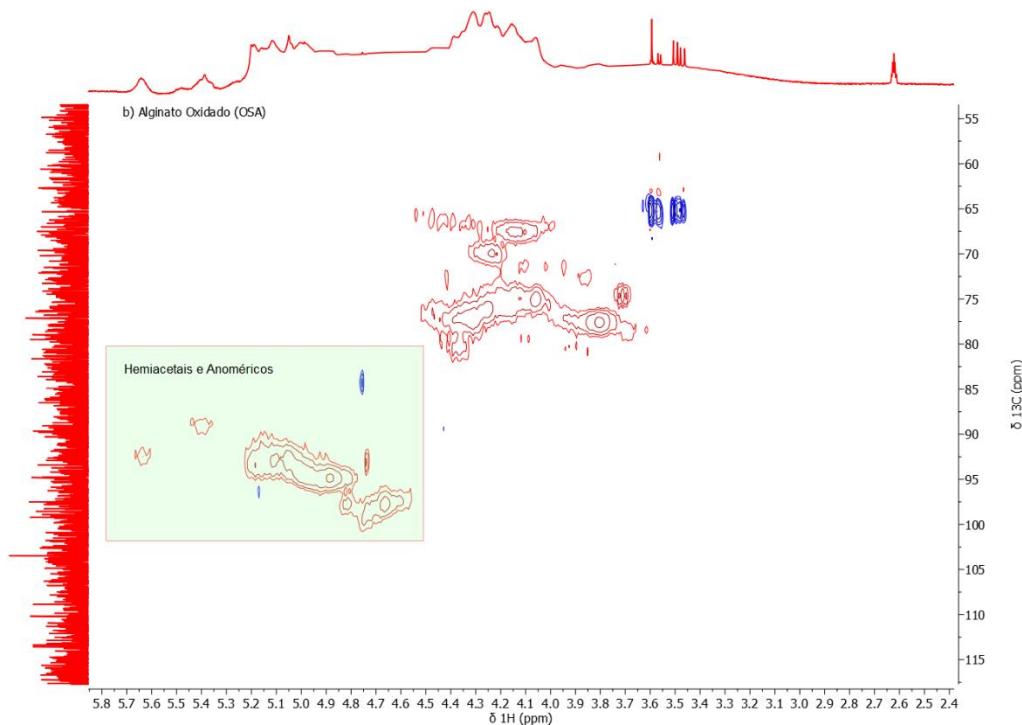
Não foi observado o sinal característico do hidrogênio aldeídico em aproximadamente 9,7 ppm. Entretanto, a presença dos sinais 5,15 e 5,4 ppm no espectro do OSA 280 (em vermelho) correspondente a um hidrogênio hemiacetálico formado a partir de grupos aldeídos e hidroxila vizinhos, confirmam a modificação estrutural. Estes sinais são semelhantes e consistentes com os relatados na literatura para alginato oxidado^{78,123,266,267}.

Maia e col.²⁶⁸ relatam o surgimento de um sinal em 9,7 ppm, aos 10 minutos de reação, onde atribuíram o sinal ao hidrogênio do grupo aldeído livre. Após 30 minutos de reação, o sinal estava ausente, sugerindo a conversão dos aldeídos em

hemiacetais. Portanto, estes resultados também estão alinhados com os espectros de IV e de forma complementar, os espectros HSQC apresentados na **Figura 14** fornecem uma análise comparativa detalhada do alginato de sódio (SA) e sua forma oxidata (OSA), revelando modificações estruturais significativas após a oxidação.

Figura 14 - Espectros HSQC (400 MHz, D₂O/DMSO-d₆) de SA (a) e OSA 540 (b).





Fonte: Dados e elaboração próprios (2022).

No espectro da **Figura 14a** são observados os sinais característicos do alginato antes da reação de oxidação. Na região anomérica, os sinais localizados na faixa de $\delta^{1\text{H}}$ de 4,5–5,5 ppm e na faixa de $\delta^{13\text{C}}$ de 95 a 105 ppm correspondem aos hidrogênios e carbonos anoméricos, respectivamente, indicando a presença de ligações glicosídicas na cadeia principal do alginato. Os sinais observados entre $\delta^{1\text{H}}$ 3,5–4,5 ppm e $\delta^{13\text{C}}$ 60–80 ppm representam as correlações entre os carbonos da cadeia principal do carboidrato e seus hidrogênios associados. Estes são consistentes com a estrutura polissacarídica do alginato, destacando a presença de resíduos de ácidos manurônico e gulurônico.

Enquanto o espectro da **Figura 14b** apresenta sinais que evidenciam modificações estruturais em relação ao material de partida. A região anomérica, $\delta^{1\text{H}}$ de 4,5–5,4 ppm e na faixa de $\delta^{13\text{C}}$ de 80–105 ppm, apresenta novos sinais que podem ser atribuídos à formação de hemiacetais e carbonos anoméricos associados aos locais oxidados.

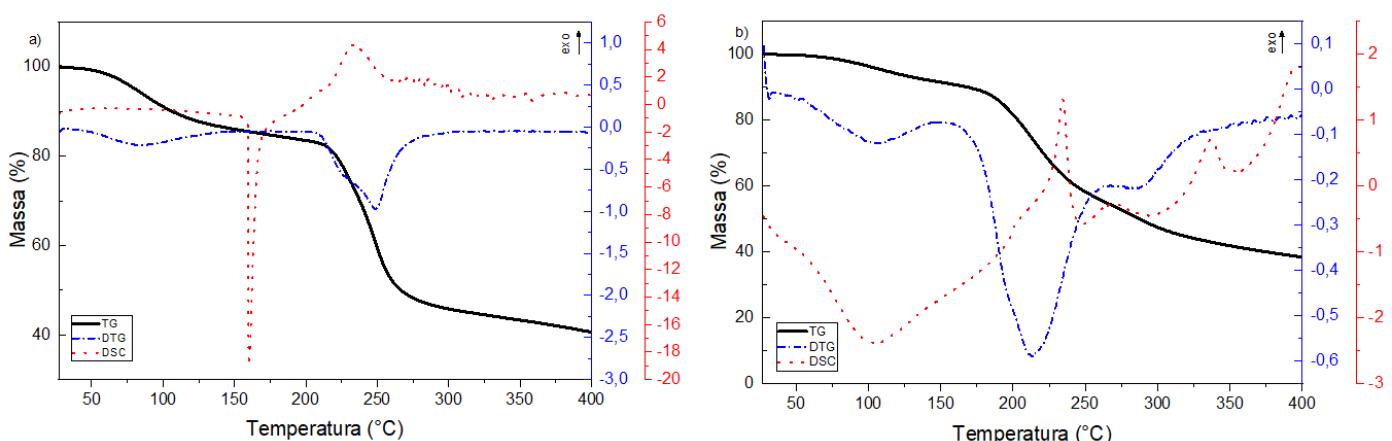
Correlações adicionais e sinais que agora aparecem em posições ligeiramente diferentes são observadas na faixa de $\delta^{1\text{H}}$ de 3,3–3,8 ppm e na faixa de $\delta^{13\text{C}}$ de 60–80 ppm. Esses deslocamentos indicam mudanças no ambiente eletrônico dos carbonos anoméricos devido à oxidação. Assim, o aparecimento de novos sinais e o

deslocamento dos sinais existentes no espectro HSQC reforçam a eficácia do protocolo de oxidação empregado.

5.1 CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DO ALGINATO OXIDADO

As curvas de TG, DTG e DSC do alginato antes (a) e após oxidação (b) são apresentadas na **Figura 15**, evidenciando as diferenças na estabilidade térmica e nos eventos de degradação térmica entre os dois tipos de alginato.

Figura 15 - Curvas de TG, DTG e de DSC para SA (a) e OSA 540 (b) sob atmosfera de N₂ (fluxo de 20 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.



Fonte: Dados e elaboração próprios (2023).

Os resultados das análises de TG/DTG/DSC para SA e OSA são sumarizados nas **Tabelas 5.3 e 5.4**, respectivamente. Os eventos termogravimétricos sugerem três grandes processos: I) desidratação II) degradação i e III) degradação ii.

Comparando os resultados das **Tabelas 5.3 e 5.4**, observa-se que os processos (I, II, III) ocorrem em faixas de temperatura semelhantes para SA e OSA. O evento I, em ambos os materiais, é característico da perda de água; no entanto, a perda de massa do alginato SA nesse evento foi aproximadamente o dobro da observada para o OSA, indicando uma maior quantidade de água inicialmente adsorvida no material não oxidado. Durante o evento II, ambos os materiais sofrem despolimerização, mas a perda de massa foi menor para o SA em comparação ao OSA. No evento III, a perda de massa do SA também foi inferior à do OSA, esse comportamento indica uma maior estabilidade térmica do SA, estando de acordo com o esperado, visto que a oxidação do SA altera as ligações na cadeia polimérica,

tornando-a mais suscetível à degradação térmica. Além disso, estudos têm atribuído esse evento à decomposição gradual da cadeia principal em CO, CO₂ e H₂O, por isso o rápido declínio no peso ²⁶⁹.

Tabela 5.3 - Dados da análise térmica para o SA sob atmosfera de N₂ (fluxo de 20 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

| Evento | TG/DTG | | DSC | | Atribuição |
|---------------|-----------------------|---------------------------|------------------|--|-------------------|
| | Intervalo (°C) | Perda de massa (%) | Pico (°C) | | |
| I | 50 – 206 | 16,5 | 160,93 | | Desidratação |
| II | 206 – 303 | 37,5 | 233,32 | | Degradação i |
| III | 303 – 400 | 4,9 | - | | Degradação ii |

Tabela 5.4 - Dados da análise térmica para o OSA 540 sob atmosfera de N₂ (fluxo de 20 cm³/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

| Evento | TG/DTG | | DSC | | Atribuição |
|---------------|-----------------------|---------------------------|------------------|--|-------------------|
| | Intervalo (°C) | Perda de massa (%) | Pico (°C) | | |
| I | 59 – 165 | 9,1 | 102,94 | | Desidratação |
| II | 165 – 304 | 43,6 | 234,73 | | Degradação i |
| III | 304 – 400 | 8,3 | 335,90 | | Degradação ii |

Além disso, no evento III, o DSC do OSA revela dois picos exotérmicos pronunciados, em aproximadamente 335°C e próximo a 400°C, que não são observados no SA. A presença desses picos exotérmicos adicionais no OSA pode estar relacionada ao início da formação de material carbonáceo e à geração de produtos de degradação diferentes dos observados para o SA. Essas diferenças provavelmente decorrem das novas ligações formadas e das modificações estruturais

(menos ligações glicosídicas) introduzidas durante o processo de oxidação do alginato.

Esses resultados indicam que o processo de oxidação pode estar influenciando tanto a retenção de água quanto a estabilidade térmica do material. A maior perda de massa do OSA nos estágios de degradação térmica sugere que o processo de oxidação introduz modificações que tornam o material mais suscetível à degradação em temperaturas mais elevadas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE ZEÍNA

As nanopartículas de zeína obtidas foram avaliadas quanto ao tamanho, potencial zeta, em sua capacidade e eficiência de encapsulamento de quercetina, por espectroscopia de IV, DRX, térmica (TG e DSC) e morfologicamente por MET e AFM.

Conforme apresentado na **Tabela 5.5**, a inclusão dos 100 µg/mL de quercetina levou a um aumento no tamanho das HNP. Os valores de PDI inferiores a 0,3 sugerem uma distribuição de tamanho homogênea e bem definida. A análise do potencial zeta indicou valores positivos tanto para as nanopartículas vazias (HNP) quanto para as nanopartículas com quercetina encapsulada (QNP), o que reflete a forte natureza catiônica da superfície das partículas, atribuída à presença da camada externa de quitosana, um polímero catiônico natural²⁷⁰.

Tabela 5.5 - Características das nanopartículas: Tamanho, Índice de Polidispersão (PDI) e ζ -potencial.

| Nanopartícula | Tamanho (nm) | PDI | Potencial- ζ (mV) |
|---------------|------------------|-------------------|-------------------------|
| HNP | $195,0 \pm 0,44$ | $0,153 \pm 0,006$ | $71,4 \pm 2,95$ |
| QNP | $218,8 \pm 2,77$ | $0,170 \pm 0,006$ | $52,5 \pm 3,80$ |

A diferença na magnitude dos valores do potencial zeta pode estar associada à adsorção de quercetina nas superfícies das partículas. Entretanto, o valor absoluto positivo do potencial zeta (acima de 20 mV) indica uma tendência à repulsão

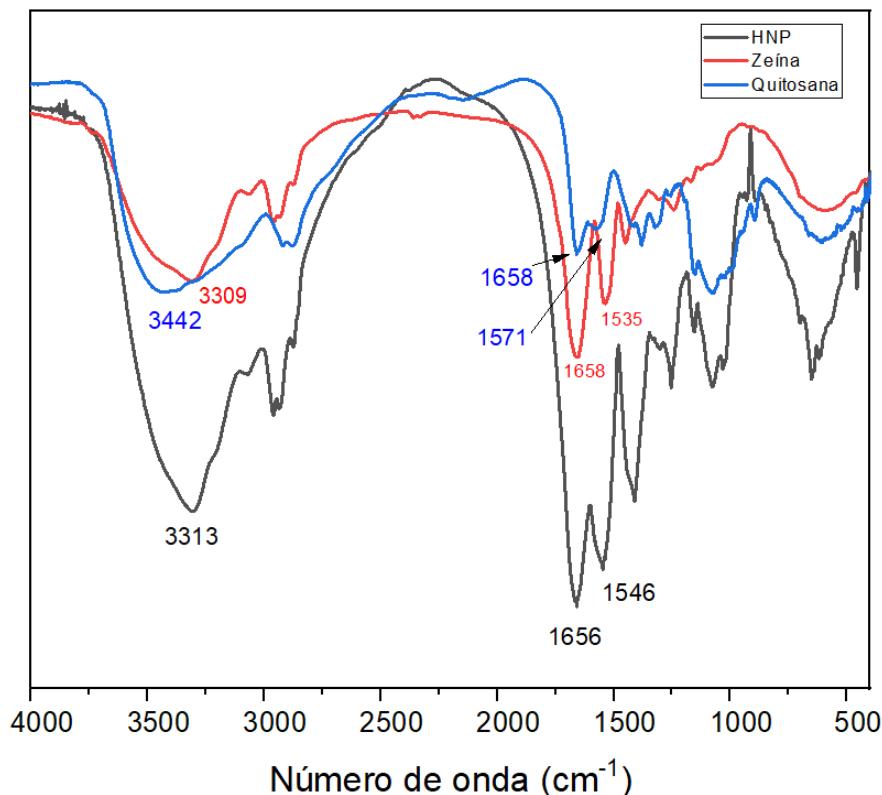
eletrostática entre as partículas, fator que contribui para sua estabilidade e dispersão em meio aquoso²⁰⁴. Além disso, a carga positiva na superfície das partículas oferece potencial para interações com entidades biológicas de carga negativa, o que pode ser particularmente vantajoso para a construção de nanopartículas camada a camada²⁷¹.

Procedeu-se à análise da capacidade e eficiência de encapsulamento das nanopartículas para quantificar a incorporação de quercetina. A capacidade de encapsulamento foi determinada em $4,78 \pm 0,00\%$, refletindo a quantidade de quercetina incorporada por unidade de massa das partículas. Esse valor demonstra a capacidade das partículas de zeína em acomodar a carga de quercetina. Esse resultado está de acordo com o intervalo reportado por Khan e colaboradores¹⁷, que observaram capacidades de encapsulamento entre 2,22% e 5,89% ao modificar a concentração de quercetina. Além disso, valores de magnitude comparável (5,6%) foram obtidos em experimentos prévios de encapsulamento de quercetina em partículas de zeína revestidas com caseinato e kappa-carragenana, empregando uma metodologia de obtenção similar²⁷².

A eficiência de encapsulamento foi de $67,32 \pm 0,06\%$, o que representa a percentagem do potencial teórico de encapsulamento efetivamente atingido. Esse valor evidencia a utilização eficaz do espaço interno das partículas de zeína para a encapsulamento, sendo esse espaço criado pela utilização de Na_2CO_3 como núcleo ou *template* sacrificial durante o processo de precipitação em etanol²⁷³. Sabe-se que nanopartículas ocas ou com estrutura do tipo “núcleo-casca” apresentam vantagens em termos de propriedades de encapsulamento e liberação de agentes terapêuticos, embora o controle preciso do tamanho das nanopartículas permaneça um desafio técnico significativo²⁷⁴. Por fim, a leve redução nos valores observados em comparação com os reportados na literatura pode estar relacionada a adaptações no aparato de encapsulamento utilizado neste estudo, o que possivelmente resultou em uma maior adsorção de quercetina na superfície das partículas.

Os resultados da caracterização espectroscópica das principais matérias-primas (quitosana e zeína) das nanopartículas vazias (HNP), bem como das próprias nanopartículas estão apresentados na **Figura 16**.

Figura 16 - Espectros de IV de nanopartículas de zeína vazias (HNP) e suas matérias-primas: zeína e quitosana.



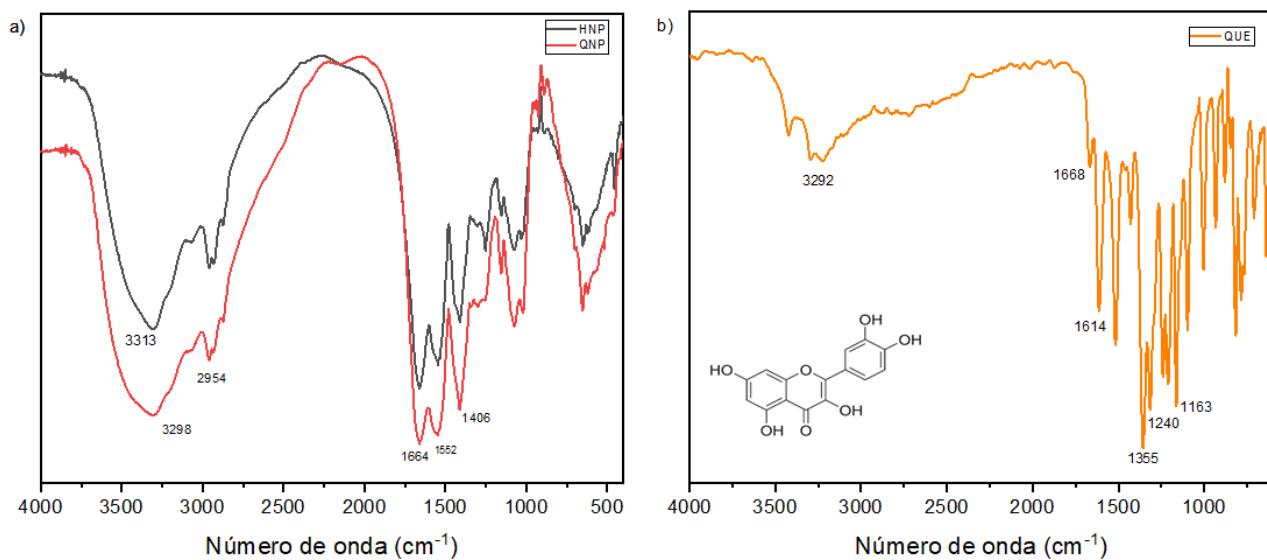
Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

O espectro da quitosana apresentou bandas de absorção características em 1658 cm^{-1} e 3442 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de estiramento da carbonila (C=O) da amida I, hidroxila (O-H) e grupos (N-H), respectivamente. No espectro da zeína, a banda relacionada ao estiramento do grupo OH aparece em 3309 cm^{-1} , enquanto no espectro no espectro da nanopartícula de zeína revestida de quitosana a banda atribuída ao grupo OH está deslocada para 3313 cm^{-1} . O deslocamento dessa banda no espectro da nanopartícula sugere a presença de ligações de hidrogênio entre os componentes da nanopartícula, visto que a presença de ligações de hidrogênio causa um aumento na distância da ligação O-H e uma diminuição na constante de força associada ao estiramento, resultando em um deslocamento para frequências mais baixas. Além disso, consistente com a literatura, as bandas de absorção da amida I e

II deslocaram de 1660 e 1571 cm⁻¹ nos espectros da quitosana e zeína para 1658 e 1546 cm⁻¹ em nanopartículas de zeína revestidas com quitosana, devido a interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre ambos.^{17,275}

Na **Figura 17**, são apresentados os espectros de IV das nanopartículas (a) HNP e QNP e da (b) quercetina (QUE). Observa-se que as bandas características da quercetina, localizadas em 1614, 1355, 1240 e 1163 cm⁻¹, que correspondem, respectivamente, às vibrações de estiramento dos grupos C=C, C-O-H(fenol), C-O-C e C-OH, estão ausentes nos espectros das nanopartículas, HNP e QNP. A ausência dessas bandas, em particular no espectro da QNP sugere que a quercetina foi eficientemente encapsulada nas nanopartículas de zeína, o que restringe os movimentos de estiramento e deformação de certas ligações moleculares.¹⁷ As únicas bandas de absorção em comum entre a QUE, HNP e QNP estão em 3302 cm⁻¹, correspondendo às vibrações de estiramento O-H, e em 1658 cm⁻¹, associadas aos grupos C=O.

Figura 17 - Espectros de IV das (a) nanopartículas de zeína revestidas com quitosana, HNP e QNP e da (b) quercetina.



Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

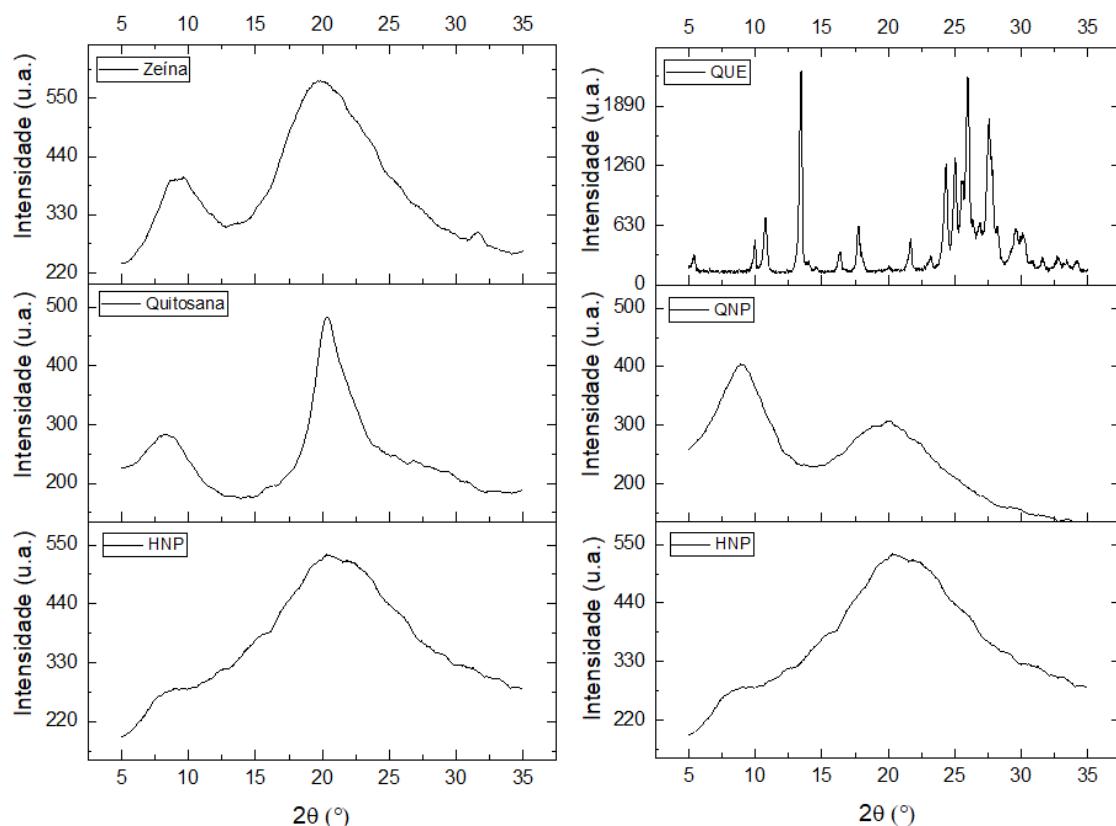
DRX é amplamente utilizada para identificar características estruturais e cristalinas de materiais. Esta técnica foi realizada com o intuito de identificar a natureza cristalina ou amorfica das nanopartículas e compreender como o encapsulamento e o revestimento influenciam a organização estrutural dos compostos. Na **Figura 18** estão representados os difratogramas dos componentes principais da HNP e da QNP, sendo a zeína (matéria-prima principal da nanopartícula)

e a quitosana (revestimento) comum à ambas as nanopartículas e na QNP a QUE é encapsulada.

A zeína apresenta um padrão de difração característico com picos largos, o que é esperado de um material majoritariamente amorfó, com pouca cristalinidade²⁷⁶. A quitosana, por outro lado, mostra um pico intenso e mais estreito, indicando uma maior cristalinidade, possivelmente devido à sua estrutura polimérica semi-organizada²⁷⁷.

Já o difratograma de HNP exibe características que se assemelham às de ambas as amostras puras (zeína e quitosana), mas com diferenças importantes. O padrão de difração da HNP apresenta picos mais suaves e largos, o que sugere uma diminuição na cristalinidade²⁷⁷. Isso é esperado por várias hipóteses, seja pelas interações moleculares que desorganizam as cadeias, pelo recobrimento que possa impedir uma estrutura uniforme, ou ainda restrições de movimento nas cadeias da zeína e, até mesmo, pelo método de produção, que durante a evaporação do solvente ou na etapa de precipitação, crie uma camada desordenada/amorfa.

Figura 18 – DRX das nanopartículas de zeína HNP e QNP e de seus principais componentes.



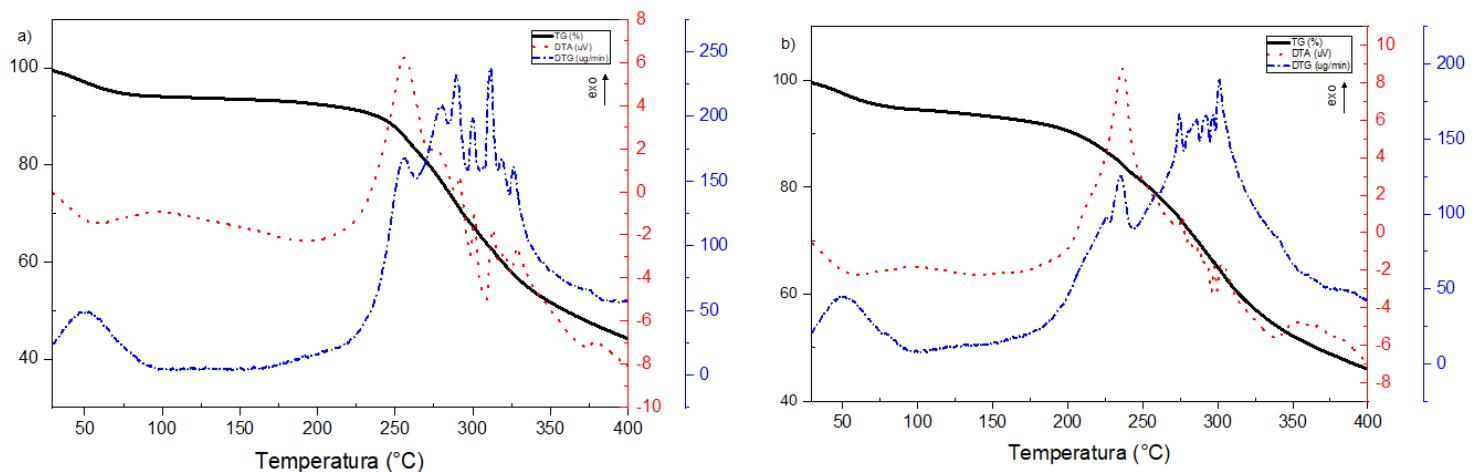
Fonte: Dados e elaboração próprios (2024).

O difratograma da QUE apresenta uma série de picos bem intensos e definidos na faixa de 2θ entre 10° e 30° , característica que confirma a natureza cristalina da quercetina. Entre os ângulos observados, destacam-se os valores em $5,38^\circ$, $9,98^\circ$, $10,74^\circ$, $13,46^\circ$, $16,36^\circ$, $17,76^\circ$, $21,66^\circ$, $25,96^\circ$ e $27,56^\circ$, os quais estão diretamente relacionados à disposição ordenada das moléculas de quercetina em sua rede cristalina²⁷⁸. No difratograma da QNP, os picos característicos da QUE não são identificados. Em substituição a esses picos, observa-se dois picos largos em 9° e 20° , o que sugere que a quercetina encapsulada está em uma forma menos cristalina, possivelmente amorfa ou distribuída de maneira uniforme na matriz da nanopartícula.

Portanto, os resultados apresentados indicam que a HNP exibe características intermediárias entre a zeína e a quitosana pelo recobrimento da zeína com quitosana. E ainda, que o encapsulamento da QUE foi bem-sucedido, com uma possível transição da QUE para uma forma menos cristalina devido à interação entre a quercetina, a zeína e a quitosana.

As curvas de TG, DTG e DTA das nanopartículas HNP e da QNP estão apresentadas na **Figura 19**. Esta análise pode ajudar a entender se o encapsulamento da QUE afeta a estabilidade térmica da zeína. Além disso, os resultados da caracterização térmica estão sumarizados nas **Tabelas 5.6 e 5.7**.

Figura 19 – TG/DTG/DTA das nanopartículas de zeína (a) vazias (HNP) e (b) com queracetina encapsulada (QNP) sob atmosfera de N₂ (fluxo de 20 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.



Fonte: Dados e elaboração próprios (2024).

Tabela 5.6 - Dados da análise térmica para a HNP sob atmosfera de N₂ (fluxo de 20 mL/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min

| Evento | TG/DTG | | DTA | | Atribuição |
|---------------|-----------------------|---------------------------|------------------|--|-------------------|
| | Intervalo (°C) | Perda de massa (%) | Pico (°C) | | |
| I | 46 – 210 | 5,4 | 58,67 | | Desidratação |
| II | 210 – 332 | 36,5 | 329,09 | | Degradação i |
| III | 332 – 400 | 11,2 | 379,99 | | Degradação ii |

Tabela 5.7 - Dados da análise térmica para a QNP sob atmosfera de N₂ (fluxo de 20 cm³/min) e razão de aquecimento de 10 °C/min.

| Evento | TG/DTG | DTA | Atribuição |
|---------------|---------------|------------|-------------------|
| | | | |

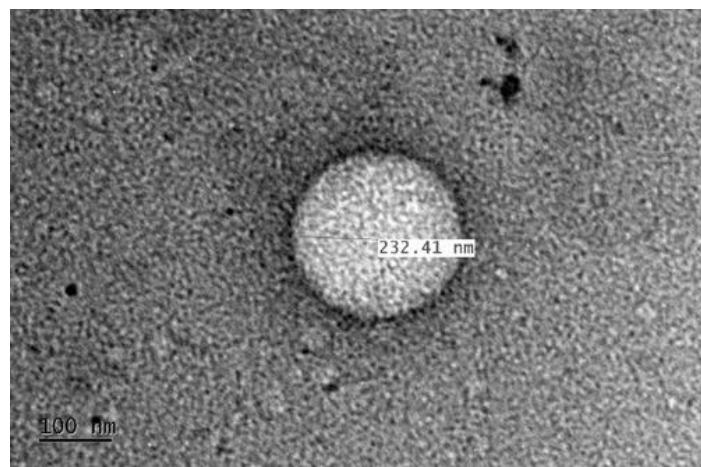
| | Intervalo (°C) | Perda de massa (%) | Pico (°C) | |
|-----|----------------|--------------------|-----------|---------------|
| I | 38 – 177 | 6,4 | 43,36 | Desidratação |
| II | 177 – 314 | 32,1 | 303,64 | Degradação i |
| III | 314 - 400 | 13,8 | 357,52 | Degradação ii |

As curvas de TG revelam uma diminuição significativa de massa em múltiplos estágios, indicando processos distintos de decomposição térmica. No caso das HNP (**Figura 19a**), a primeira etapa de perda de massa ocorre na faixa de 40–210 °C, atribuída à eliminação de água adsorvida. Este comportamento é esperado, considerando a característica hidrofílica da quitosana. Em temperaturas mais elevadas, observa-se um segundo evento de degradação, com uma queda acentuada na faixa de 250–350 °C, atribuída à decomposição térmica dos componentes orgânicos, como a zeína e a quitosana. A análise da DTG confirma esses eventos, apresentando picos bem definidos em aproximadamente 100 °C e 290 °C.

Para as QNP (**Figura 19b**), a curva de TG mostra comportamento semelhante na eliminação inicial de água. Há uma diferença notável no perfil de decomposição térmica, com picos de degradação principal deslocados para temperaturas mais baixas em relação às HNP. Esta diminuição na temperatura de degradação sugere uma interação que pode estar induzindo a desestabilização entre a zeína/quitosana e a quercetina encapsulada e adiantando a decomposição térmica.

A **Figura 20**, obtida por MET utilizando microscópio JEM-2800 de 200 kV, revela a morfologia esférica das HNP. É possível também observar uma região mais escura em torno da partícula, mais pronunciada na partícula maior em destaque, sugerindo a formação de uma casca externa às nanopartículas, atribuída ao revestimento de quitosana.

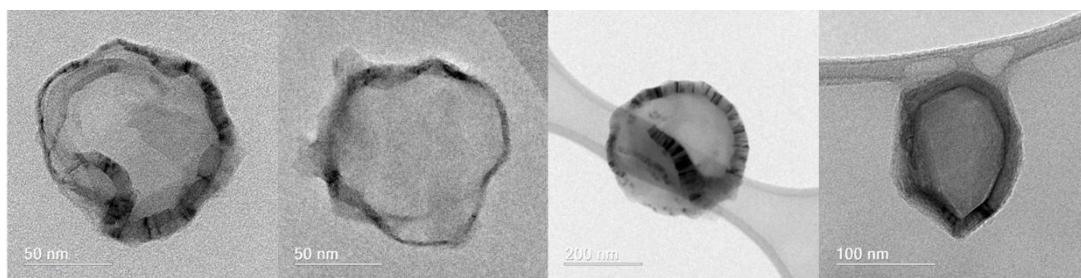
Figura 20 – MET das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (HNP) utilizando um microscópio modelo JEM-2800.



Fonte: Dados próprios (2024).

De forma complementar, as micrografias apresentadas na **Figura 21** apresentam as características morfológicas e distribuição de tamanho das HNP. Estas micrografias também foram obtidas por MET, porém utilizando um microscópio Tecnai G2–20 FEI SuperTwin. As HNP apresentaram um tamanho médio variando entre 50 e 300 nm, resultado que é consistente com os dados obtidos por dispersão dinâmica de luz (DLS) – discutidos anteriormente no item **4.5.4**.

Figura 21 – MET das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (HNP) utilizando um microscópio modelo G2–20 FEI SuperTwin.



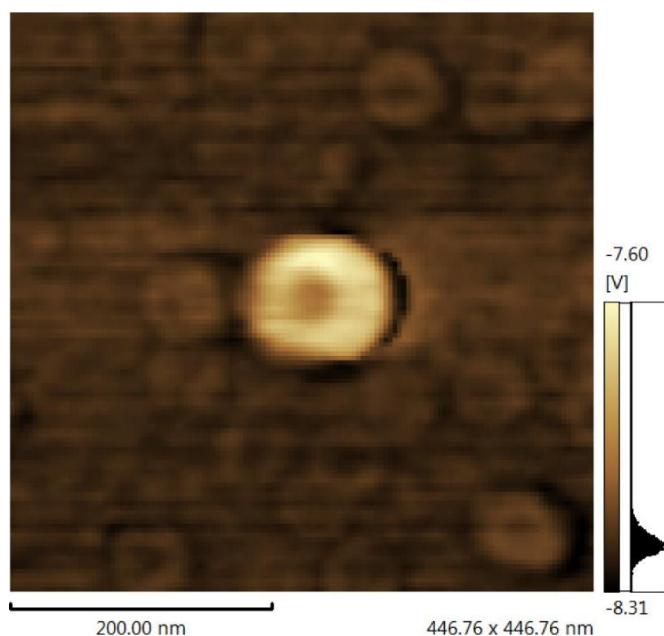
Fonte: Dados próprios (2024).

É possível observar com mais clareza a cavidade interna mais clara, que corresponde à zeína, e uma camada externa nanométrica mais escura, composta por quitosana, reforçando a observação na **Figura 20** anterior e que também está de acordo com a descrição de Xu²⁷³, Khan e seus colaboradores²⁷⁹. Em seu estudo, Khan e colaboradores²⁷⁹ sintetizaram partículas de zeína revestidas com o biopolímero quitosana para avaliar o potencial de encapsulação do resveratrol,

obtendo resultados morfológicos muito semelhantes aos apresentados nas imagens TEM deste trabalho.

Por fim, a micrografia por AFM é apresentada na **Figura 22**. De forma a corroborar fortemente com as imagens obtidas por MET, é possível observar que todas as nanopartículas vazias de zeína (HNP) exibem uma depressão central, indicando a existência de uma cavidade interna, visível inclusive nas nanopartículas de menor tamanho.

Figura 22 – Micrografia das nanopartículas de zeína revestidas com quitosana (HNP) por AFM.



Fonte: Dados próprios (2024).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL

Diversas caracterizações foram realizadas nos hidrogéis produzidos, bem como no hidrogel compósito.

5.3.1 Avaliação qualitativa

Os hidrogéis foram reticulados pela reação de formação de ligações covalentes dinâmicas de imina (base de Schiff) entre alginato oxidado (-CHO) e gelatina (-NH₂). O tempo de gelificação foi determinado durante o teste de inversão do tubo e ocorreu em $2,33 \pm 0,03$ minutos após a combinação das soluções precursoras a 37°C. Após a inversão do tubo (**Figura 23**), não foi observada fluidez dentro de 30 segundos.

O tempo de gelificação dos hidrogéis é um fator crítico para seu uso biomédico, devendo ser equilibrado; não deve ser muito curto, o que poderia resultar em obstrução da agulha, nem muito longo, pois isso impediria sua conformação ao local de injeção e poderia interferir no tempo de liberação do fármaco. Hidrogéis utilizados em aplicações de quimioterapia, desenvolvidos com diversas matrizes poliméricas e agentes terapêuticos, também apresentaram tempos de gelificação comparáveis^{182,208,244}. Além disso, esse comportamento de transição de fase sol-gel do hidrogel também foi investigado por reometria e será discutido adiante.

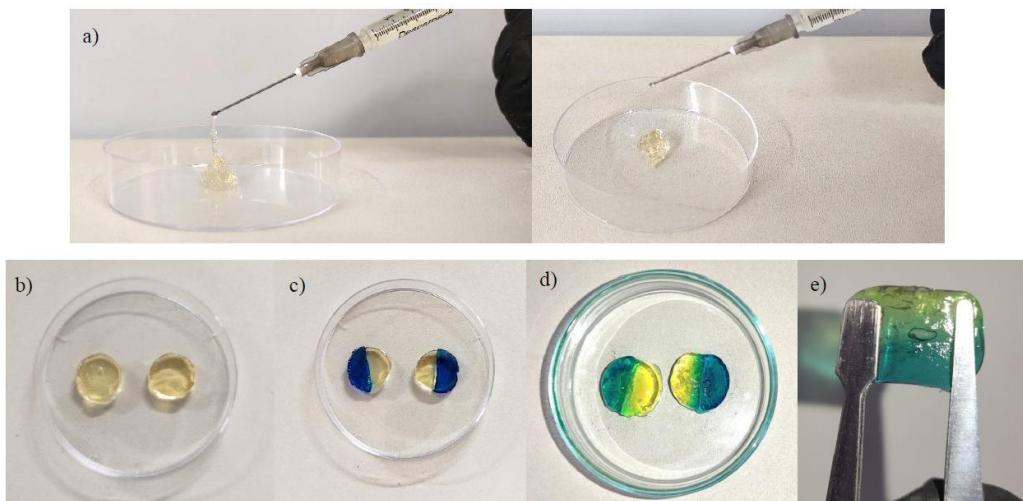
Figura 23 – Imagens do teste de inversão do tipo para determinação do tempo de gelificação e apresentação do hidrogel no molde.



Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

A injetabilidade do hidrogel também foi avaliada adicionando-se ambas as soluções precursoras em uma seringa e forçando sua extrusão através da agulha. O hidrogel formado foi facilmente extrudado pela agulha, conforme mostrado na **Figura 24a**. A natureza dinâmica da ligação covalente da base de Schiff na rede dos hidrogéis também sugere a capacidade dos hidrogéis de se autorrepararem. Para examinar visualmente a capacidade de autorreparação dos hidrogéis, foi realizado um teste macroscópico.

Figura 24 – a) Comportamento injetável e extrudível do hidrogel pré-formado, b) discos de hidrogel antes do teste de autorreparo, c) teste de autorreparo após 1 minuto e d) após 24 horas, e e) Capacidade de autorreparo dos hidrogéis injetados.



Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

Inicialmente, dois discos de hidrogel (**Figura 24b**) foram seccionados ao meio, e as metades opostas, previamente tingidas com cores distintas, foram unidas (**Figura 24c**). A **Figura 24d** ilustra o estado dos discos de hidrogel após 1 minuto de processo de autorreparação à temperatura ambiente e após 24 horas. Decorridas 24 horas, o hidrogel reparado demonstrou capacidade de sustentar-se de maneira independente, preservando sua integridade estrutural, como evidenciado na **Figura 24e**.

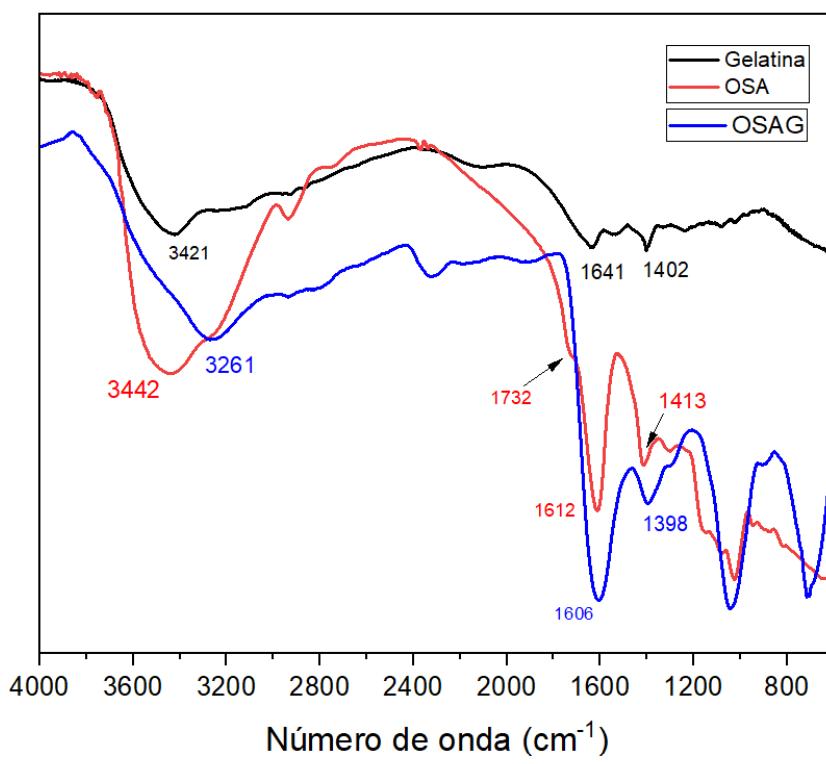
5.3.2 Caracterização estrutural

A seguir, são apresentados os espectros de infravermelho (IV) do hidrogel OSAG e de seus componentes individuais, OSA e gelatina, bem como dos hidrogéis compósitos contendo nanopartículas vazias (OSAGH) e nanopartículas encapsulando quercetina (OSAGQ), com o objetivo de possibilitar uma análise comparativa detalhada.

Os espectros de IV da gelatina e do OSA, apresentados na **Figura 25**, revelam bandas de absorção características em 3421 e 3442 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de estiramento dos grupos hidroxila (OH). No espectro do hidrogel vazio (OSAG), o pico correspondente encontra-se deslocado, sugerindo a ocorrência de interações por ligação de hidrogênio entre os componentes da matriz polimérica durante o processo de formação do hidrogel.

Um indicativo interessante da formação do hidrogel é a ausência da banda fraca em 1732 cm^{-1} no espectro do hidrogel, característico do grupo CHO, sugere que a oxidação do alginato foi bem-sucedida; assim como a intensificação de uma banda aguda a 1606 cm^{-1} atribuída ao estiramento do C=N resultante do deslocamento das bandas atribuídas às vibrações de estiramento da carbonila das amidas da gelatina e dos grupos carboxilatos do OSA a 1641 e 1612 cm^{-1} para um comprimento de onda menor. Esses achados estão relacionados à formação das ligações de reticulação de base de Schiff (imina) a partir da interação dos grupos aldeído e amino presentes nas estruturas do alginato oxidado e da gelatina, respectivamente¹⁸⁴.

Figura 25 – Espectros de IV da gelatina, alginato oxidado (OSA) e do hidrogel vazio

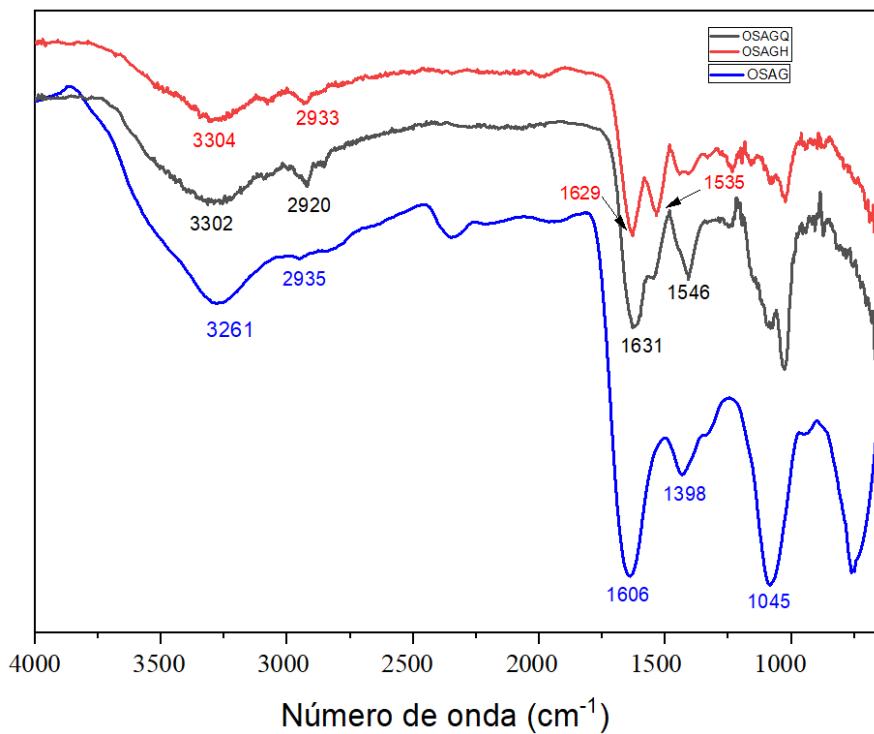


Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

Nos espectros apresentados na **Figura 26**, observa-se a ausência de uma banda localizada entre 1535 e 1546 cm^{-1} , atribuída à amida II, (presente em ambos os hidrogéis contendo nanopartículas vazias e com quercetina encapsulada). Esse fenômeno pode ser justificado pela natureza proteica dos materiais, uma vez que essa banda se manifesta como um pico intenso nos espectros da zeína, HNP e QNP, enquanto no espectro da gelatina é identificada apenas como um pico de baixa intensidade. Além disso, conforme previsto, os picos característicos da quercetina não

são detectados no espectro do hidrogel compósito, o que pode ser atribuído ao encapsulamento da molécula, como discutido previamente.

Figura 26 – Espectros IV do hidrogel e do hidrogel contendo nanopartículas de zeína.



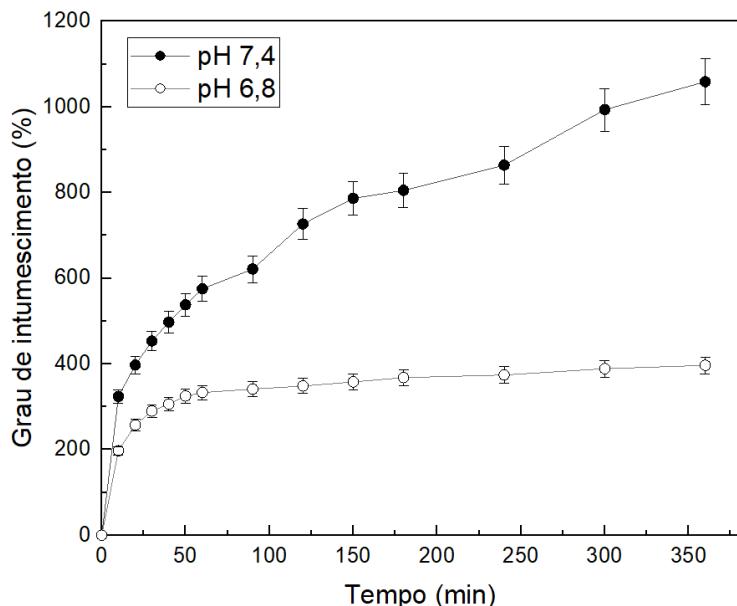
Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

5.3.3 Intumescimento e degradação

A capacidade de absorção de água ou grau de intumescimento do OSAG foi analisada em condições fisiológicas ($\text{pH } 7,4$) e em um ambiente que simula o microambiente tumoral ($\text{pH } 6,8$)²⁸⁰. Inicialmente, ao ser imerso em solução tampão PBS pH 7,4, o hidrogel exibiu um intumescimento rápido e significativo nas primeiras horas, conforme ilustrado na **Figura 27**.

O grau de intumescimento apresentou um aumento contínuo ao longo da análise, atingindo um fator máximo de 1050 vezes o peso seco inicial. O comportamento observado revelou uma fase inicial de absorção abrupta, caracterizada por um aumento rápido de peso (0-50 min), seguida por uma fase de intumescimento mais lenta e sustentada a partir de 50 minutos. Após cerca de 6 horas de imersão, o hidrogel atingiu o equilíbrio do intumescimento, demonstrando sua capacidade de reter água por períodos prolongados.

Figura 27 – Grau de intumescimento do hidrogel vazio (OSAG) à temperatura ambiente.



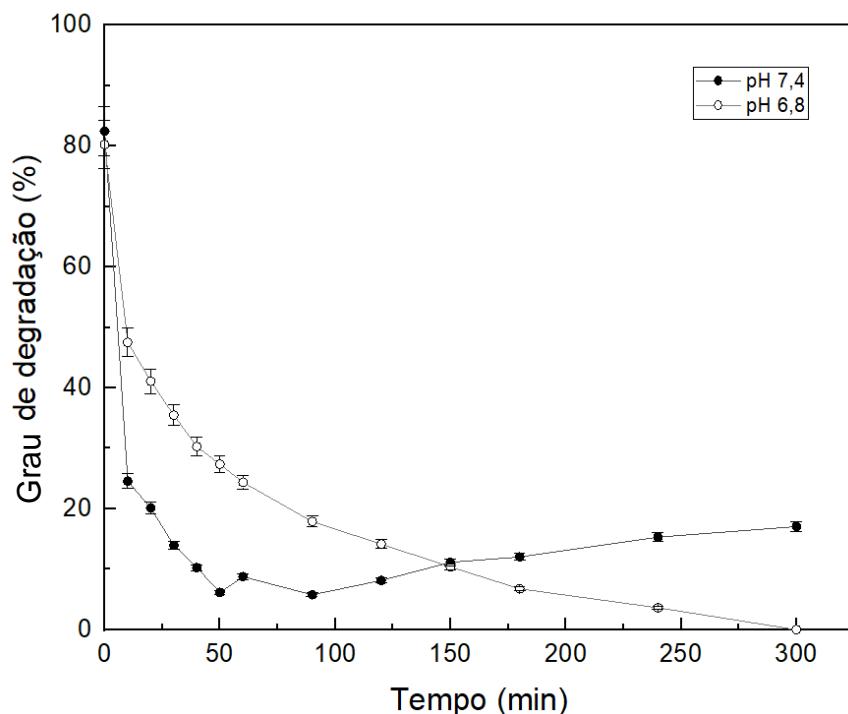
Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

Por outro lado, quando imerso em solução PBS com pH 6,8, caracterizado por um ambiente levemente ácido, o grau de intumescimento hidrogel apresentou um comportamento distinto, com implicações para sua aplicação potencial em terapias oncológicas²⁸⁰. Observou-se que não ocorreu uma fase inicial de intumescimento pronunciada, e a expansão do material foi limitada, não superando um aumento de peso de 500 vezes.

A diferença de comportamento pode ser atribuída ao pH, pois, em condições de pH 7,4, a maior ionização dos grupos carboxila presentes nas estruturas de gelatina e alginato promove maior pressão osmótica e repulsão eletrostática, resultando em um aumento de intumescimento. Em pH 6,8, os grupos carboxila estão menos ionizados, o que diminui a repulsão eletrostática e limita o intumescimento. Esses resultados demonstram a significativa capacidade de absorção de água do hidrogel e seu potencial para encapsular e liberar agentes terapêuticos tanto em condições fisiológicas quanto em condições ligeiramente ácidas, como aquelas presentes no ambiente tumoral.

A estabilidade do hidrogel OSAG e seu potencial como sistema de liberação controlada de fármacos foram investigados por meio do ensaio do grau de degradação tanto em pH 7,4, quanto em pH 6,8, sob temperatura de 37 °C, conforme ilustrado na **Figura 28**.

Figura 28 – Grau de degradação do hidrogel vazio (OSAG) a 37°C.



Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

Nos primeiros 50 minutos de análise, o grau de degradação foi consideravelmente maior em pH 6,8 em relação a pH 7,4. Com o avanço do tempo, observou-se uma redução progressiva no grau de degradação em ambos os valores de pH. No ambiente ácido (pH 6,8), a degradação inicial diminuiu rapidamente, estabilizando-se em aproximadamente 20% após cerca de 150 minutos. Por outro lado, em pH 7,4, a degradação ocorreu de forma mais lenta e gradual, alcançando uma estabilização entre 10% e 15%. Ao longo de 300 minutos de observação, a degradação foi consistentemente mais elevada em pH 6,8, indicando uma maior estabilidade do hidrogel em condições fisiológicas (pH 7,4). Esses resultados se correlacionam com os padrões de intumescimento observados anteriormente em experimentos conduzidos à temperatura ambiente.

Em pH 7,4, o hidrogel demonstrou maior intumescimento durante os experimentos, provavelmente resultando em alterações significativas na estrutura dos poros. Essa modificação é atribuída à ionização acentuada dos grupos carboxila, o que contribui para a formação de poros mais amplos e uma estrutura mais estabilizada, reduzindo a taxa de degradação do material²⁸¹.

Sob condições de pH 7,4, observou-se uma rápida redução inicial no grau de degradação, seguida por um aumento em tempos posteriores. Tal comportamento pode ser interpretado como um período de ajuste estrutural do hidrogel durante os primeiros 100 minutos, atribuído à adaptação à temperatura de 37 °C, em contraste com os experimentos de intumescimento realizados em temperatura ambiente.

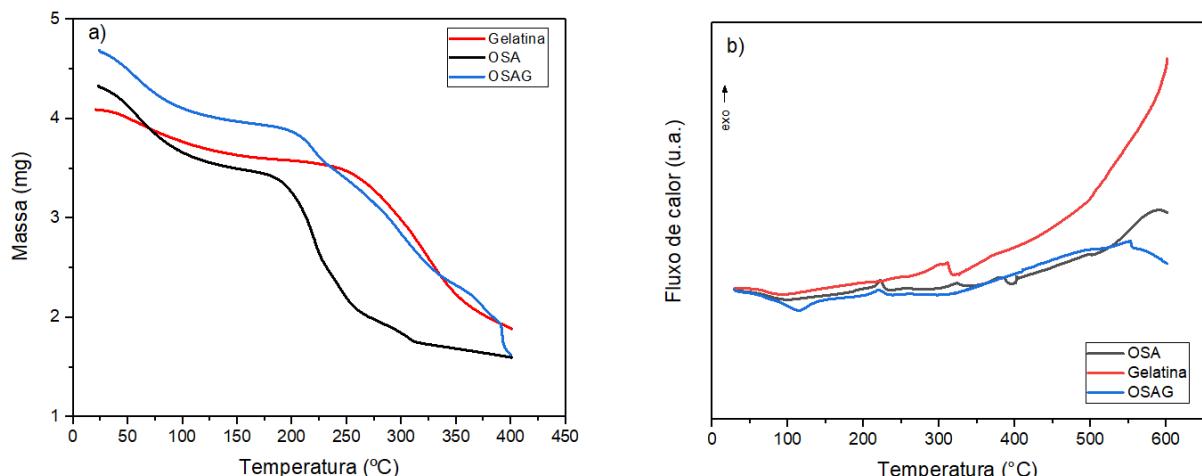
Após essa etapa inicial, o hidrogel apresentou um processo de intumescimento, embora em um grau mais baixo do que a verificada no teste anterior, possivelmente devido ao impacto contínuo da temperatura sobre as propriedades dinâmicas da sua estrutura. Em pH 6,8, menores graus de intumescimento e ionização, combinados com a hidrólise das ligações de reticulação, resultou em uma rede polimérica menos estável, o que levou a uma degradação mais acelerada.

Desse modo, os padrões de intumescimento previamente observados sob diferentes condições de pH desempenharam um papel determinante na cinética de degradação subsequente, sugerindo que as mudanças estruturais e a expansão do hidrogel durante o intumescimento têm um impacto direto na regulação das taxas de degradação.

5.3.4 Caracterização térmica

O OSAG, juntamente com HNP, QNP, seus materiais precursores e os hidrogéis compósitos OSAGH e OSAGC, foram caracterizados por meio das técnicas de análise termogravimétrica (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Figura 29 – TG/DTG e DSC do hidrogel vazio (OSAG) e seus componentes gelatina e alginato oxidado (OSA) sob atmosfera de N₂ (fluxo de 20 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.



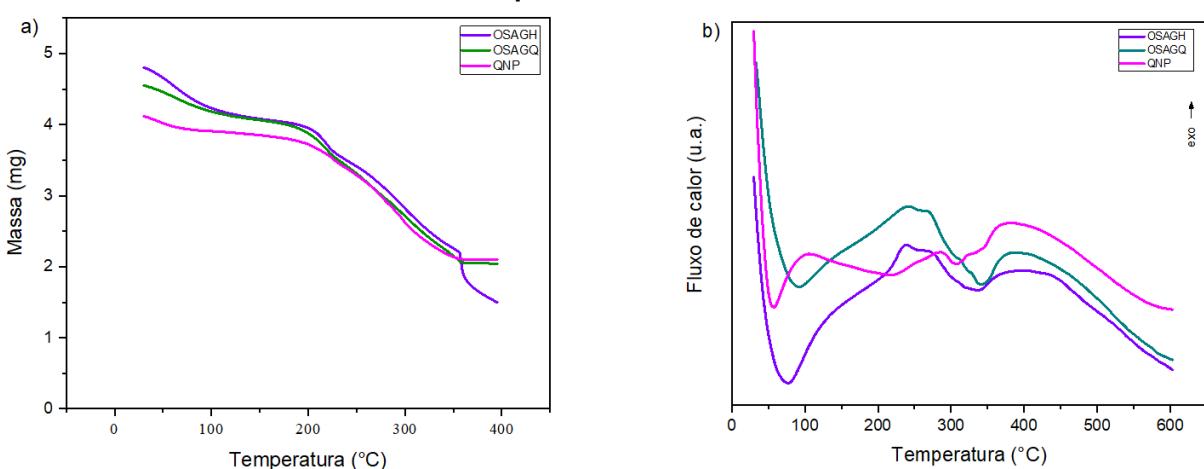
Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

A curva TG referente à gelatina (**Figura 29**) apresentou um perfil típico de degradação em dois estágios, frequentemente observado em gelatinas de diferentes origens. O primeiro estágio, caracterizado por uma perda de massa até aproximadamente 100 °C, foi atribuído à eliminação da água fisicamente adsorvida. O segundo estágio, ocorrido em temperaturas mais elevadas, foi relacionado à degradação da estrutura proteica da gelatina, em concordância com relatos da literatura²⁸². Em contrapartida, o termograma do OSA exibiu um comportamento térmico em três estágios, como analisado anteriormente.

A curva TG do OSAG revelou um padrão de perda de massa em múltiplos estágios, ocorrendo em temperaturas superiores às observadas para seus materiais precursores. Esse comportamento sugere um processo de decomposição mais complexo, envolvendo diferentes componentes da matriz do hidrogel. A integração da gelatina e do OSA no hidrogel parece gerar um perfil térmico heterogêneo, refletindo as interações entre os componentes durante a degradação. Tal complexidade é atribuída tanto às interações quanto às ligações resultantes da reticulação entre os polímeros constituintes, como a formação de bases de Schiff, que podem introduzir estágios adicionais de decomposição, relacionados à sua quebra. Esses fenômenos, em conjunto, modulam o comportamento térmico do hidrogel.

No que se refere às QNP e ao OSAGQ, verifica-se uma evidente semelhança nos padrões de perda de massa entre as nanopartículas isoladas e aquelas incorporadas à matriz do hidrogel, conforme demonstrado na **Figura 30**.

Figura 30 - TG/DTG e DSC das nanopartículas com quercetina encapsulada (QNP), do hidrogel contendo nanopartículas vazias (OSAGH) e nanopartículas com quercetina encapsulada (OSAGQ) sob atmosfera de N₂ (fluxo de 20 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.



Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

A inclusão de nanopartículas de zeína provocou alterações detectáveis nas propriedades térmicas, uma possível indicação de sua incorporação bem-sucedida na estrutura do material. Em todas as amostras avaliadas, foi observada uma perda de massa gradual iniciada em temperaturas próximas a 100 °C, atribuída à evaporação da água absorvida. Em seguida, identificou-se uma etapa predominante de degradação na faixa de 200 a 350 °C, que pode estar associada à decomposição de componentes menos estáveis. Notavelmente, no caso do OSAGH, a perda de massa prolongou-se além de 350 °C, sugerindo a degradação térmica da estrutura do hidrogel, possivelmente relacionada à decomposição da gelatina e do alginato oxidado²⁸³. Por outro lado, o comportamento de estabilização térmica observado entre 350 e 400 °C, tanto no QNP quanto no OSAGQ, pode ser atribuído à formação de estruturas mais resistentes ao calor, resultando em produtos de degradação mais estáveis.

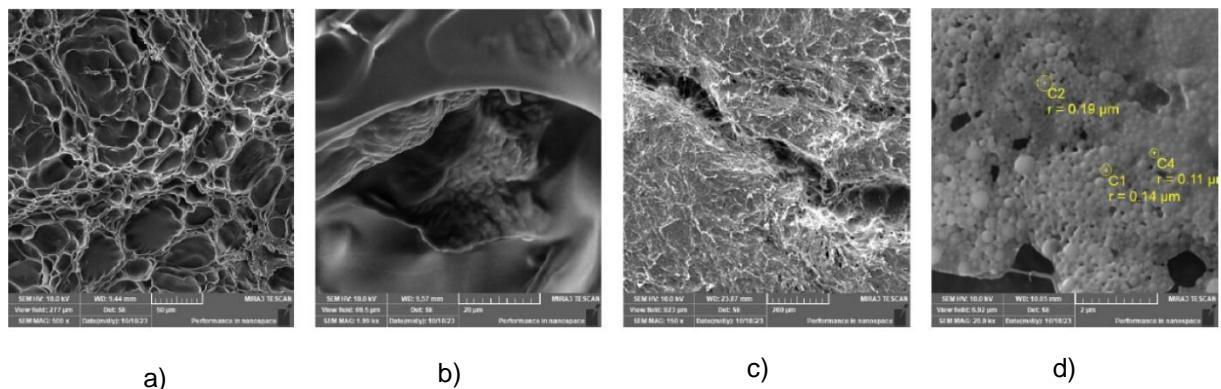
A curva DSC das QNP revelou um pico endotérmico em torno de 100 °C, relacionado à evaporação da água absorvida, em conformidade com os resultados da análise TG. De acordo com Campos e colaboradores²⁸⁴, esse evento endotérmico é característico de componentes como quitosana e zeína. Além disso, foram identificados dois picos exotérmicos a 200 e 300 °C, seguidos por um pico endotérmico mais acentuado próximo a 400 °C, possivelmente indicando transições exotérmicas adicionais. Esses fenômenos podem estar associados à decomposição de componentes orgânicos presentes nas nanopartículas, à degradação térmica de resíduos estáveis ou, ainda, a eventos de cristalização secundária.

Por sua vez, a curva DSC do OSAGH exibiu eventos térmicos distintos. Um pico endotérmico destacado foi identificado a 225 °C e atribuído ao início da decomposição dos polímeros constituintes do hidrogel. Pequenos picos exotérmicos e endotérmicos adicionais foram registrados em 340 e 400 °C, associados, respectivamente, à desintegração das cadeias laterais intermoleculares da gelatina e à sua degradação progressiva. Esses achados corroboram estudos anteriores, como o de Shehap e colaboradores que investigaram filmes compósitos baseados em gelatina²⁸⁵. O OSAGQ apresentou comportamento térmico semelhante ao do OSAGH até 350 °C, contudo, tanto o OSAGQ quanto o QNP demonstraram maior estabilidade térmica quando comparados ao OSAGH. Portanto, os resultados obtidos a partir das análises térmicas evidenciam a existência de interações complexas entre os diferentes constituintes do sistema.

5.3.5 Caracterização morfológica do hidrogel

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi empregada para caracterizar a microestrutura e as propriedades morfológicas dos hidrogéis e das nanopartículas, conforme ilustrado na **Figura 31**.

Figura 31 – Micrografias de MEV do a) hidrogel OSAG (vazio), b) poro do hidrogel contendo nanopartículas, c) hidrogel OSAG autorreparado e d) QNPs.



Fonte: Dados próprios (2025).

Na **Figura 31a**, observa-se uma distribuição heterogênea dos poros, resultando em uma rede estruturada que proporciona uma abundância de locais favoráveis para o carregamento e a liberação tanto de nanopartículas encapsuladas com fármacos quanto de fármacos livres. Em conjunto com as caracterizações anteriores, esses resultados fornecem evidências substanciais de que o hidrogel pode atuar como um veículo eficaz para o transporte de agentes terapêuticos.

A **Figura 31b** apresenta o hidrogel contendo as partículas carregadas dentro de um poro. A imagem revela a superfície do poro e a presença de um aglomerado de nanopartículas, o que indica a incorporação bem-sucedida das mesmas na matriz do hidrogel²⁸⁶. A **Figura 31c** mostra a morfologia do hidrogel vazio autorreparado. Áreas de reconexão e fusão são visíveis de forma diagonal, demonstrando a capacidade do material em se autorreparar. Já a **Figura 31d** revela que as QNPs apresentam uma morfologia esférica, com diâmetro médio variando entre 220 e 380 nm, o que é consistente com os resultados obtidos por DLS e claramente observados pelo MET e AFM. Além disso, a superfície das partículas exibe um acabamento liso, sem irregularidades ou rugosidade significativas.

Em síntese, as imagens obtidas por MEV fornecem informações valiosas sobre as características morfológicas do OSAG em diferentes estados, oferecendo uma

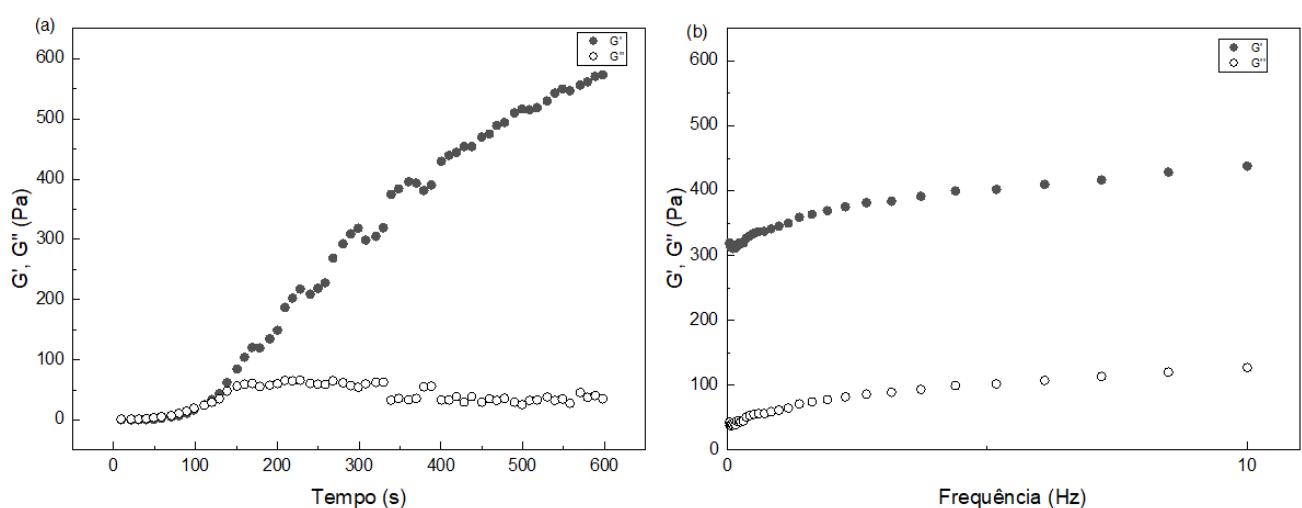
visão detalhada de suas propriedades estruturais, capacidades de carga e potencial de autorreparação. Esses resultados ampliam nossa compreensão sobre as possíveis aplicações do OSAG, particularmente em sistemas de liberação controlada de fármacos e em diversas áreas biomédicas.

5.3.6 Caracterização mecânica e de textura

As propriedades reológicas do OSAG foram investigadas e os resultados, conforme ilustrado na **Figura 32**. Inicialmente, foi conduzido um teste de varredura temporal a uma frequência angular de 1 Hz durante 10 minutos, conforme apresentado na **Figura 32a**. Durante este teste, o módulo de armazenamento (G') do hidrogel ultrapassou o módulo de perda (G'') aos 150,9 segundos (ou 2 minutos e 31 segundos), o que corresponde ao ponto crítico da transição sol–gel, corroborando os resultados obtidos no teste de inversão do tubo.

Adicionalmente, foi realizada uma varredura dinâmica de frequência com o objetivo de avaliar a viscoelasticidade e a estabilidade do OSAG, conforme mostrado na **Figura 32b**. O gráfico resultante indicou que tanto G' quanto G'' apresentaram dependência de frequência, aumentando com o incremento da frequência. Na região viscoelástica linear, a razão entre G'' e G' foi inferior a 1, o que sugere que o hidrogel mantém um comportamento elástico desejável²⁵⁴.

Figura 32 – (a) Teste de varredura temporal e (b) teste de varredura dinâmica de frequência do hidrogel OSAG.



Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

As propriedades texturais do hidrogel OSAG foram avaliadas e os resultados estão apresentados na **Tabela 5.8**. A dureza do OSAG, representando a força necessária para provocar uma deformação específica, foi avaliada em $1,01 \pm 0,33$ Newtons. Este valor indica um baixo nível de rigidez e resistência à deformação, o que está de acordo com o esperado, pois para aplicações de liberação de fármacos e como hidrogel injetável, uma menor rigidez pode ser preferível. Por outro lado, um hidrogel utilizado em engenharia tecidual pode demandar maior dureza para fornecer o suporte mecânico necessário²⁸¹.

Tabela 5.8 - Propriedades texturais do hidrogel vazio (OSAG).

| Propriedades | Valores |
|-------------------|-----------------|
| Dureza (N) | 1.01 ± 0.33 |
| Elasticidade (mm) | 4.47 ± 0.24 |
| Coesão (N) | 0.87 ± 0.06 |
| Força Adesiva (N) | 0.40 ± 0.00 |
| Gomosidade (N) | 0.86 ± 0.21 |

Valores médios das análises duplicadas.

No que se refere à elasticidade, o hidrogel apresentou um valor de $4,47 \pm 0,24$ mm, indicando sua capacidade de resistir à compressão inicial. Tal resistência contribui para a preservação da integridade estrutural do material. A coesividade do hidrogel OSAG, representando a sua resistência à ruptura interna, foi observada em $0,87 \pm 0,06$ Newtons. Esse valor é superior aos resultados recentemente publicados para hidrogéis à base de polissacarídeos e de gelatina/amido oxidado^{287,288}. Isso sugere uma natureza coesiva e elástica, contribuindo para a estabilidade geral do hidrogel, que é atribuída à rede de ligações internas densas.

A força adesiva registrada reflete a capacidade do hidrogel de aderir a superfícies, característica que pode ser particularmente vantajosa após a injeção do hidrogel compósito e durante a fase subsequente de liberação do fármaco. Enquanto a gomosidade, parâmetro que combina dureza e coesividade, foi determinada em $0,86 \pm 0,21$ N, demonstrando a capacidade do hidrogel de manter sua integridade e aderir entre suas partículas. No conjunto, os resultados indicam que o hidrogel apresenta características favoráveis para aplicações de liberação de fármacos e, como hidrogel injetável, oferece um equilíbrio entre flexibilidade, integridade estrutural e adesividade.

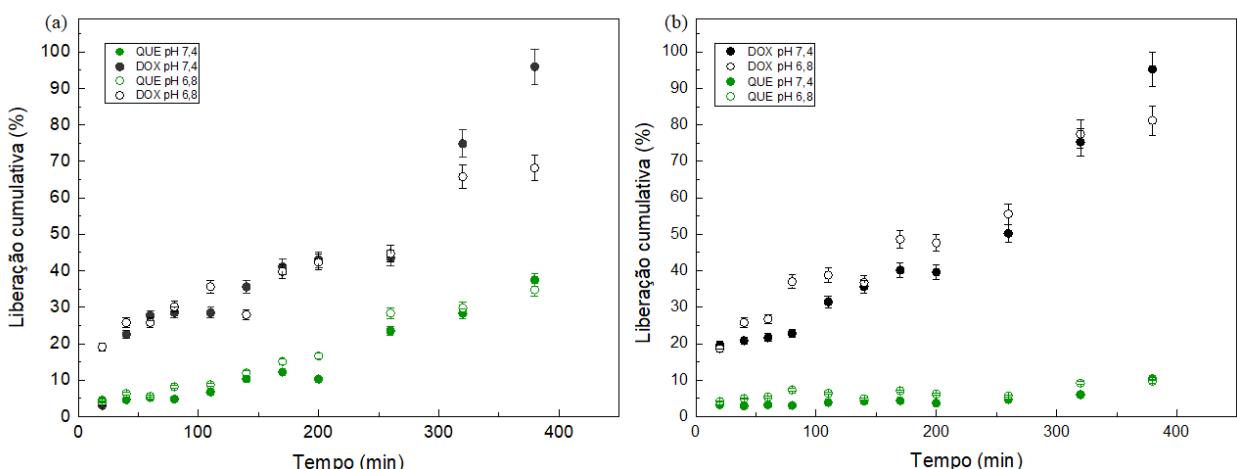
5.4 APLICAÇÃO DO HIDROGEL

5.4.1 Avaliação da liberação dos agentes terapêuticos *in vitro*

Foi analisado o comportamento de liberação simultânea do hidrogel compósito (OSAGC) em pH 7,4 e pH 6,8, os quais simulam, respectivamente, condições fisiológicas e tumorais²⁸⁹.

A liberação individual da QUE demonstrou um perfil constante e prolongado a pH 7,4, com uma liberação cumulativa máxima de 37,5% durante um período de 6,5 horas, conforme apresentado na **Figura 33a**. Em pH 6,8, o comportamento de liberação da quercetina foi semelhante, embora com uma liberação cumulativa um pouco inferior, atingindo 34,7%. Este fenômeno pode ser principalmente explicado pela resposta de intumescimento mais modesta do hidrogel a pH 6,8, devido à menor ionização dos grupos carboxila presentes, o que resulta em uma leve diminuição na absorção de água e, consequentemente, uma ligeira redução nas taxas de difusão.

Figura 33 – Liberação de QUE e DOX a partir do hidrogel compósitos (OSAGC) em pH 7,4 e pH 6,8: a) individualmente e b) combinados, respectivamente.



Fonte: Dados e elaboração próprios (2025).

Além disso, dado que as nanopartículas de quercetina (QNP) são revestidas com quitosana, a pH 6,8, a quitosana se apresenta mais protonada, o que eleva sua solubilidade e capacidade de intumescimento, podendo, assim, aumentar de forma marginal a taxa de liberação da quercetina a partir das nanopartículas. Contudo, a taxa geral de liberação permanece constante devido à restrição no intumescimento do

hidrogel a esse pH. A liberação de doxorrubicina a partir da matriz do hidrogel apresentou perfis de liberação semelhantes para ambos os pH 7,4 e 6,8, com quantidades cumulativas distintas. A 7,4, a liberação acumulada alcançou 95,9%, enquanto a 6,8, essa liberação foi consideravelmente mais baixa, atingindo 68,2%.

Notavelmente, o comportamento de liberação a pH 6,8 revelou um padrão de liberação mais gradual durante o período de 6,5 horas de análise, contrastando com a liberação observada a pH 7,4. As diferenças observadas, atribuídas aos padrões de intumescimento, podem ter influenciado a taxa de liberação da doxorrubicina, especialmente a pH 6,8. Isso ocorre porque, a pH 6,8, o intumescimento reduzido resulta em canais de difusão menores, dificultando a liberação de doxorrubicina. Além disso, dado que a doxorrubicina possui um pKa de 8,25, a pH 6,8, a forma protonada da doxorrubicina pode interagir de forma mais intensa com os grupos carregados negativamente presentes no hidrogel, diminuindo sua taxa de difusão. Em resumo, a quer cetina teve que superar múltiplas barreiras para sua liberação, envolvendo tanto as partículas quanto a matriz do hidrogel, enquanto a doxorrubicina estava apenas dispersa na matriz polimérica do hidrogel.

Na liberação combinada (**Figura 33b**), apenas a quer cetina apresentou um perfil de liberação distinto em comparação com a sua liberação isolada, resultando em uma quantidade de liberação ligeiramente inferior. Por outro lado, a liberação cumulativa de doxorrubicina a partir do hidrogel foi maior a pH 7,4 do que a pH 6,8, corroborando os resultados do experimento de liberação isolada. O intumescimento reduzido a pH 6,8 restringiu a difusão de ambos os fármacos, resultando em menores porcentagens de liberação acumulada.

A incorporação simultânea de QNP e DOX também introduziu complexidades adicionais que contribuíram para esse fenômeno. A pH 7,4, a doxorrubicina se encontra menos protonada, o que resulta em interações menos intensas com a matriz do hidrogel e as nanopartículas de quer cetina, resultando, assim, em uma liberação maior. Adicionalmente, o recobrimento com quitosana nas nanopartículas de zeína confere uma carga superficial positiva, facilitando as interações eletrostáticas entre as nanopartículas e os grupos carregados negativamente na matriz do hidrogel, conforme observado por Campos e seus colaboradores²⁸⁴. Essas interações podem levar a uma liberação mais controlada e em menores proporções, quando comparada à liberação de doxorrubicina.

O modelo matemático de Peppas-Sahlin foi identificado como aquele que proporcionou o melhor ajuste ($r^2 > 0,98$) para a liberação isolada de quercetina em pH 6,8, dentre os cinco modelos avaliados (**Figura A4**). Esse resultado sugere que o mecanismo de liberação envolve processos mais complexos do que a simples difusão. Por outro lado, nas demais condições avaliadas — tanto nas liberações individuais quanto nas combinações —, o modelo de ordem zero mostrou-se o mais adequado para descrever o perfil de liberação, indicando um mecanismo com taxa constante, independente da concentração do fármaco. Assim, o perfil de liberação de quercetina, representado por um modelo distinto sob condições específicas, é coerente com as diferenças observadas nos demais perfis de liberação previamente apresentados.

5.4.2 Citotoxicidade *in vitro*

Os resultados da análise de citotoxicidade na linhagem celular tumoral humana MCF-7, apresentados na **Tabela 5.9**, indicam a concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (IC_{50}) em cada tratamento, após 72 horas. Esses dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes, realizados em triplicata ou quadruplicata, sendo expressos como $IC_{50} \pm$ erro padrão da média, calculado por regressão não linear. As formulações testadas incluem: DOX (doxorrubicina livre); QUE (quercetina livre); QNP (nanopartículas contendo quercetina); OSAGQ (hidrogel contendo QNP); OSAGX (hidrogel contendo DOX); e OSAGC (hidrogel contendo DOX e QNP).

Tabela 5.9 - IC_{50} das formulações obtidos por Meio do Ensaio MTT (MCF-7)

| Formulações | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------|--------------------------------|
| DOX | 0.331 \pm 0.013 |
| QUE | > 6 |
| QNP | > 6 |
| OSAGC | 0.016 \pm 0.014 |
| OSAGX | 0.071 \pm 0.039 |
| OSAGQ | 2.07 \pm 0.24 |

Fonte: Dados próprios (2024).

Entre as amostras analisadas, apenas QUE e QNP não apresentaram redução significativa na viabilidade celular. Por outro lado, a formulação OSAGX demonstrou um aumento de 4,66 vezes na citotoxicidade em comparação com a doxorrubicina livre, enquanto a formulação OSAGC exibiu um incremento ainda maior, de 20,7 vezes. A análise comparativa entre OSAGX e OSAGC evidenciou que a inclusão de QNP contribuiu para um aumento adicional de 4,4 vezes na atividade citotóxica.

Estudos prévios corroboram esses resultados. Por exemplo, Hassan e colaboradores⁶ observaram que a quercetina intensifica a ação citotóxica da doxorrubicina em células de adenocarcinoma pancreático (AsPC-1) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2), por meio de efeitos sinérgicos relacionados à apoptose, além da inibição de HIF-1α e da atividade da proteína MDR1. De forma semelhante, Zhang e colaboradores²⁹⁰ relataram que a quercetina aumenta a eficácia da doxorrubicina em células de câncer de mama, sugerindo seu potencial como coadjuvante no tratamento oncológico.

Essas evidências indicam que o sistema desenvolvido apresenta um impacto significativo na intensificação do efeito citotóxico da doxorrubicina, constituindo uma estratégia promissora para potencializar a eficácia do tratamento do câncer. O sistema, por sua capacidade de combinar agentes hidrofóbicos e hidrofílicos, como quercetina e doxorrubicina, oferece uma alternativa viável para ampliar as aplicações terapêuticas dos hidrogéis multifuncionais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esperava-se que a funcionalização da goma arábica com grupos aminos e reticulação com alginato oxidado pudesse formar um hidrogel capaz de incorporar agentes terapêuticos e liberados de forma sustentada. No entanto, devido às dificuldades enfrentadas durante o desenvolvimento desse trabalho, bem como a complexidade estrutural da goma arábica, optou-se por interromper os estudos com a goma arábica, ficando o estudo restrito apenas a uma matriz polimérica conhecida de gelatina com alginato oxidado e com apenas um dos derivados oxidados do alginato.

Assim, foi possível incorporar a doxorrubicina na matriz do hidrogel e a quercetina em partículas de zeína revestidas com quitosana, estabelecendo um sistema compósito.

As nanopartículas obtidas apresentaram características morfológicas e propriedades físicas favoráveis para a incorporação da quercetina. A estrutura porosa do hidrogel indicou a capacidade de incorporar doxorrubicina e as nanopartículas de zeína contendo quercetina. Observou-se também que o hidrogel apresentou propriedades de autorreparação, além de demonstrar injetabilidade.

As análises espectroscópicas do sistema polimérico revelaram alterações em relação aos componentes isolados, demonstrando a complexidade das interações entre os componentes do hidrogel e principalmente do hidrogel compósito. Enquanto a análise térmica do hidrogel contendo as nanopartículas com quercetina encapsulada (OSAGQ) apresentou estabilidade relativamente melhor que o hidrogel com nanopartículas vazias (OSAGH).

Por fim, a exposição do hidrogel compósito a células de câncer de mama MCF-7 resultou em um efeito tóxico vinte vezes mais intenso em comparação à doxorrubicina isolada, destacando o potencial deste sistema para terapias combinadas com maior eficácia.

7 PERSPECTIVAS

Para os estudos futuros, os esforços devem ser voltados para:

- Um direcionamento estratégico que inclua ensaios clínicos, visando avaliar a eficácia e segurança da formulação em modelos biológicos mais complexos.
- A exploração da incorporação de outras combinações de agentes terapêuticos e outros sistemas nanoméricos como porfirinas e estruturas de grafeno, além de fármacos quimioterápicos e não-quimioterápicos, com especial atenção a combinações de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, pode expandir o potencial terapêutico do sistema, maximizando sua aplicabilidade em terapias combinadas.
- Além disso, é pertinente investigar novas aplicações para essa matriz, como no campo odontológico e biomédico, onde hidrogéis podem oferecer benefícios em processos de regeneração, diagnóstico e reparo.
- Paralelamente, a otimização da formulação demanda atenção aos métodos de preparação e reticulação (iminas aromáticas ou hidrazonas), além do estudo reológico/mecânico do hidrogel compósito, visando aprofundar o conhecimento das interações químicas entre os componentes e controlar a liberação dos agentes terapêuticos, elementos cruciais para alcançar uma maior precisão e eficácia terapêutica.

REFERÊNCIAS

1. Sritharan, S. & Sivalingam, N. A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin. *Life Sci* 278, 119527 (2021).
2. Martins-Teixeira, M. B. & Carvalho, I. Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *ChemMedChem* 15, 933–948 (2020).
3. Gorini, S. et al. Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib. (2018) doi:10.1155/2018/7582730.
4. Bukowski, K., Kciuk, M. & Kontek, R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci* 21, 3233 (2020).
5. Ye, Q. et al. Reversal of multidrug resistance in cancer by multi-functional flavonoids. *Front Oncol* 9, 1–16 (2019).
6. Hassan, S. et al. Quercetin potentializes the respective cytotoxic activity of gemcitabine or doxorubicin on 3D culture of AsPC-1 or HepG2 cells, through the inhibition of HIF-1 α and MDR1. *PLoS One* 15, (2020).
7. Ezzati, M., Yousefi, B., Velaei, K. & Safa, A. A review on anti-cancer properties of Quercetin in breast cancer. *Life Sci* 248, (2020).
8. Mellati, A. & Akhtari, J. Injectable Hydrogels: A Review of Injectability Mechanisms and Biomedical Applications. *Research in Molecular Medicine* 6, 1–19 (2019).
9. Patenaude, M., Smeets, N. M. B. & Hoare, T. Designing injectable, covalently cross-linked hydrogels for biomedical applications. *Macromol Rapid Commun* 35, 598–617 (2014).
10. Wei, L., Chen, J., Zhao, S., Ding, J. & Chen, X. Thermo-sensitive polypeptide hydrogel for locally sequential delivery of two-pronged antitumor drugs. *Acta Biomater* 58, 44–53 (2017).
11. Wu, X., He, C., Wu, Y. & Chen, X. Synergistic therapeutic effects of Schiff's base cross-linked injectable hydrogels for local co-delivery of metformin and 5-fluorouracil in a mouse colon carcinoma model. *Biomaterials* 75, 148–162 (2016).
12. Jaipan, P., Nguyen, A. & Narayan, R. J. Gelatin-based hydrogels for biomedical applications. *MRS Commun* 7, 416–426 (2017).

13. Kong, X., Chen, L., Li, B., Quan, C. & Wu, J. Applications of oxidized alginate in regenerative medicine. *J Mater Chem B* 9, 2785–2801 (2021).
14. Michelini, L., Probo, L., Farè, S. & Contessi Negrini, N. Characterization of gelatin hydrogels derived from different animal sources. *Mater Lett* 272, (2020).
15. Idrees, H. *et al.* A review of biodegradable natural polymer-based nanoparticles for drug delivery applications. *Nanomaterials* 10, 1–22 (2020).
16. Luo, Y. & Wang, Q. Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. *J Appl Polym Sci* 131, 1–12 (2014).
17. Khan, M. A., Zhou, C., Zheng, P., Zhao, M. & Liang, L. Improving physicochemical stability of quercetin-loaded hollow zein particles with chitosan/pectin complex coating. *Antioxidants* 10, (2021).
18. Peppas, N. A. Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 5–9 (2013).
19. Ferreira, N. N. *et al.* Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches. *Eur Polym J* 99, 117–133 (2018).
20. Wichterle, D.; Lím, O. Industrial Research Associations: Some Taxation Problems. *Nature* 185, 117–118 (1960).
21. Yannas, I. V., Lee, E., Orgill, D. P., Skrabut, E. M. & Murphy, G. F. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 933–937 (1989).
22. Lim, F. & Sun, A. M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* (1979) 210, 908–910 (1980).
23. Arno Behr, T. S. *Chemistry of Renewables*. *ChemSusChem* (Springer Spektrum, 2020). doi:10.1007/978-3-662-61430-3.
24. Rizwan, M. *et al.* pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications. *Polymers (Basel)* 9, (2017).
25. Lee, S. C., Kwon, I. K. & Park, K. Hydrogels for delivery of bioactive agents: A historical perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 65, 17–20 (2013).
26. Buwalda, S. J. *et al.* Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release* 190, 254–273 (2014).

27. Chirani, N., Yahia, L. Lh., Motta, F. L., Chirani, S. & Faré, S. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences* 04, 1–23 (2015).
28. Liang-chang, D., Qi, Y. & Hoffman, A. S. Controlled release of amylase from a thermal and pH-sensitive, macroporous hydrogel. *Journal of Controlled Release* 19, 171–177 (1992).
29. Sawhney, A. S., Pathak, C. P. & Hubbell, J. A. Photopolymerized Polyethylene glycol)-co-poly(-hydroxy. *Macromolecules* 26, 581–587 (1993).
30. Elisseeff, J. et al. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3104–3107 (1999).
31. Xu, X.-D. et al. ‘Click’ Chemistry for In situ Formation of Thermoresponsive P(NIPAAm-co-HEMA)-Based Hydrogels. *J Polym Sci A Polym Chem* 46, 5263–5277 (2008).
32. Wu, M. et al. Injectable and Self-Healing Nanocomposite Hydrogels with Ultrasensitive pH-Responsiveness and Tunable Mechanical Properties: Implications for Controlled Drug Delivery. *Biomacromolecules* 21, 2409–2420 (2020).
33. Ghorbani, M., Roshangar, L. & Soleimani Rad, J. Development of reinforced chitosan/pectin scaffold by using the cellulose nanocrystals as nanofillers: An injectable hydrogel for tissue engineering. *Eur Polym J* 130, 109697 (2020).
34. Ma, L. et al. Synthesis and characterization of injectable self-healing hydrogels based on oxidized alginate-hybrid-hydroxyapatite nanoparticles and carboxymethyl chitosan. *Int J Biol Macromol* 165, 1164–1174 (2020).
35. Balakrishnan, B. & Jayakrishnan, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 26, 3941–3951 (2005).
36. Kahar, N. N. F. N. M. N. et al. The versatility of polymeric materials as self-healing agents for various types of applications: A review. *Polymers (Basel)* 13, 1–34 (2021).
37. De France, K. J., Cranston, E. D. & Hoare, T. Mechanically Reinforced Injectable Hydrogels. *ACS Appl Polym Mater* 2, 1016–1030 (2020).
38. Mathew, A. P., Uthaman, S., Cho, K. H., Cho, C. S. & Park, I. K. Injectable hydrogels for delivering biotherapeutic molecules. *Int J Biol Macromol* 110, 17–29 (2018).

39. Lim, D. W., Nettles, D. L., Setton, L. A. & Chilkoti, A. In Situ Cross-Linking of Elastin-like Polypeptide Block Copolymers for Tissue Repair. *Biomacromolecules* 9, 222–230 (2008).
40. Li, Y., Yang, H. Y. & Lee, D. S. Advances in biodegradable and injectable hydrogels for biomedical applications. *Journal of Controlled Release* 330, 151–160 (2021).
41. Muir, V. G. & Burdick, J. A. Chemically modified biopolymers for the formation of biomedical hydrogels. *Chem Rev* 121, 10908–10949 (2021).
42. Fathi, M., Ahmadi, N., Forouhar, A. & Hamzeh Atani, S. Natural Hydrogels, the Interesting Carriers for Herbal Extracts. *Food Reviews International* (2021) doi:10.1080/87559129.2021.1885436.
43. IUPAC. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. (International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), Research Triangle Park, NC, 2019). doi:10.1351/goldbook.
44. Vert, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* 84, 377–410 (2012).
45. Bhatia, S. *Natural Polymer Drug Delivery Systems Nanoparticles, Plants and Algae*. Springer (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-41129-3.
46. Li, Y. et al. Click chemistry-based biopolymeric hydrogels for regenerative medicine. *Biomedical Materials (Bristol)* 16, (2021).
47. E, J. S. C., Gopi, S., A, R., G, S. & Pius, A. Highly crosslinked 3-D hydrogels based on graphene oxide for enhanced remediation of multi contaminant wastewater. *Journal of Water Process Engineering* 31, 100850 (2019).
48. Fan, M. & Tan, H. Biocompatible conjugation for biodegradable hydrogels as drug and cell scaffolds. *Cogent Eng* 7, (2020).
49. Su, H., Jia, Q. & Shan, S. Synthesis and characterization of Schiff base contained dextran microgels in water-in-oil inverse microemulsion. *Carbohydr Polym* 152, 156–162 (2016).
50. Nair, L. S. & Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 32, 762–798 (2007).
51. Madl, A. C., Madl, C. M. & Myung, D. Injectable Cucurbit[8]uril-Based Supramolecular Gelatin Hydrogels for Cell Encapsulation. *ACS Macro Lett* 9, 619–626 (2020).

52. Mo, C., Xiang, L. & Chen, Y. Advances in Injectable and Self-healing Polysaccharide Hydrogel Based on the Schiff Base Reaction. *Macromol Rapid Commun* 42, 1–18 (2021).
53. Ahmad, S., Ahmad, M., Manzoor, K., Purwar, R. & Ikram, S. A review on latest innovations in natural gums based hydrogels: Preparations & applications. *Int J Biol Macromol* 136, 870–890 (2019).
54. Kaplan, D. L. *Biopolymers from Renewable Resources. Biopolymers from Renewable Resources* (1998). doi:10.1007/978-3-662-03680-8.
55. Ray, P. et al. Alginate-based hydrogels for drug delivery applications. in *Alginates in Drug Delivery* 41–70 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-817640-5.00003-0.
56. Andriamanantoanina, H. & Rinaudo, M. Relationship between the molecular structure of alginates and their gelation in acidic conditions. *Polym Int* 59, 1531–1541 (2010).
57. Sabadini, R. C. Redes Poliméricas de Macromoléculas Naturais como hidrogéis superabsorventes. (Universidade de São Paulo (USP), 2015).
58. Jensen, H. M., Larsen, F. H. & Engelsen, S. B. Characterization of Alginates by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Vibrational Spectroscopy (IR, NIR, Raman) in Combination with Chemometrics. in *Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols* vol. 1308 347–363 (2015).
59. Hartmann, M., Dentini, M., Ingar Draget, K. & Skjåk-Bræk, G. Enzymatic modification of alginates with the mannuronan C-5epimerase AlgE4 enhances their solubility at low pH. *Carbohydr Polym* 63, 257–262 (2006).
60. Hasnain, M. S. et al. *Alginates: Sources, Structure, and Properties. Alginates in Drug Delivery* (INC, 2020). doi:10.1016/b978-0-12-817640-5.00001-7.
61. Llanes, F., Sauriol, F., Morin, F. G. & Perlin, A. S. An examination of sodium alginate from *Sargassum* by NMR spectroscopy. *Can J Chem* 75, 585–590 (1997).
62. Iwaki, Y. O. Eletrólitos Sólidos Poliméricos a Base de Alginato de Sódio. (Universidade de São Paulo, 2010).
63. Jiao, W. et al. Effects of Molecular Weight and Guluronic Acid/Mannuronic Acid Ratio on the Rheological Behavior and Stabilizing Property of Sodium Alginate. *Molecules* 24, 1–12 (2019).

64. Qin, Y., Jiang, J., Zhao, L., Zhang, J. & Wang, F. Applications of Alginate as a Functional Food Ingredient. in *Biopolymers for Food Design* 409–429 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811449-0.00013-X.
65. Abasalizadeh, F. et al. Alginate-based hydrogels as drug delivery vehicles in cancer treatment and their applications in wound dressing and 3D bioprinting. *J Biol Eng* 14, 1–22 (2020).
66. Szekalska, M., Puciłowska, A., Szymańska, E., Ciosek, P. & Winnicka, K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Int J Polym Sci* 2016, (2016).
67. Posocco, B. et al. *Polysaccharides for the Delivery of Antitumor Drugs. Materials* vol. 8 (2015).
68. Chowhan, A. & Giri, T. K. Polysaccharide as renewable responsive biopolymer for in situ gel in the delivery of drug through ocular route. *Int J Biol Macromol* 150, 559–572 (2020).
69. Szabó, L., Gerber-Lemaire, S. & Wandrey, C. Strategies to functionalize the anionic biopolymer na-alginate without restricting its polyelectrolyte properties. *Polymers (Basel)* 12, (2020).
70. Forget, A. et al. Polysaccharide hydrogels with tunable stiffness and provasculogenic properties via α -helix to β -sheet switch in secondary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12887–12892 (2013).
71. Zhao, K. et al. Targeted hydroxyethyl starch prodrug for inhibiting the growth and metastasis of prostate cancer. *Biomaterials* 116, 82–94 (2017).
72. Cumpstey, I. Chemical Modification of Polysaccharides. *ISRN Org Chem* 2013, 1–27 (2013).
73. Hu, Y., Su, X., Lei, Y. & Wang, Y. A novel anti-calcification method for bioprosthetic heart valves using dopamine-modified alginate. *Polymer Bulletin* 76, 1423–1434 (2019).
74. Gowney, E. A., Linder, H. R., Garg, K., Bledsoe, J. G. & Sell, S. A. Bioconjugation of platelet-rich plasma and alginate through carbodiimide chemistry for injectable hydrogel therapies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 108, 1972–1984 (2020).
75. Pawar, S. N. & Edgar, K. J. Alginate esters via chemoselective carboxyl group modification. *Carbohydr Polym* 98, 1288–1296 (2013).

76. Balakrishnan, B., Lesieur, S., Labarre, D. & Jayakrishnan, A. Periodate oxidation of sodium alginate in water and in ethanol-water mixture: A comparative study. *Carbohydr Res* 340, 1425–1429 (2005).
77. Ding, W., Zhou, J., Zeng, Y., Wang, Y. nan & Shi, B. Preparation of oxidized sodium alginate with different molecular weights and its application for crosslinking collagen fiber. *Carbohydr Polym* 157, 1650–1656 (2017).
78. Gomez, C. G., Rinaudo, M. & Villar, M. A. Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydr Polym* 67, 296–304 (2007).
79. Lee, K. Y., Bouhadir, K. H. & Mooney, D. J. Evaluation of chain stiffness of partially oxidized polyguluronate. *Biomacromolecules* 3, 1129–1134 (2002).
80. Vold, I. M. N., Kristiansen, K. A. & Christensen, B. E. A Study of the Chain Stiffness and Extension of Alginates, in Vitro Epimerized Alginates, and Periodate-Oxidized Alginates Using Size-Exclusion Chromatography Combined with Light Scattering and Viscosity Detectors. *Biomacromolecules* 7, 2136–2146 (2006).
81. Wang, S., Oommen, O. P., Yan, H. & Varghese, O. P. Mild and efficient strategy for site-selective aldehyde modification of glycosaminoglycans: Tailoring hydrogels with tunable release of growth factor. *Biomacromolecules* 14, 2427–2432 (2013).
82. Kristiansen, K. A., Potthast, A. & Christensen, B. E. Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties. *Carbohydr Res* 345, 1264–1271 (2010).
83. Ramos, E. L. de L. Preparo e Caracterização de Hidrogéis Injetáveis de Galactomanana de *Delonix regia* Oxidada e Gelatina. (Universidade Federal do Ceará, 2016).
84. Emami, Z., Ehsani, M., Zandi, M. & Foudazi, R. Controlling alginate oxidation conditions for making alginate-gelatin hydrogels. *Carbohydr Polym* 198, 509–517 (2018).
85. Millan, C., Cavalli, E., Groth, T., Maniura-Weber, K. & Zenobi-Wong, M. Engineered Microtissues Formed by Schiff Base Crosslinking Restore the Chondrogenic Potential of Aged Mesenchymal Stem Cells. *Adv Healthc Mater* 4, 1348–1358 (2015).

86. Balakrishnan, B., Joshi, N., Jayakrishnan, A. & Banerjee, R. Self-crosslinked oxidized alginate/gelatin hydrogel as injectable, adhesive biomimetic scaffolds for cartilage regeneration. *Acta Biomater* 10, 3650–3663 (2014).
87. Nguyen, T. P. & Lee, B. T. Fabrication of oxidized alginate-gelatin-BCP hydrogels and evaluation of the microstructure, material properties and biocompatibility for bone tissue regeneration. *J Biomater Appl* 27, 311–321 (2012).
88. Baniasadi, H., Mashayekhan, S., Fadaoddini, S. & Haghsharifzamini, Y. Design, fabrication and characterization of oxidized alginate-gelatin hydrogels for muscle tissue engineering applications. *J Biomater Appl* 31, 152–161 (2016).
89. Bai, X. *et al.* Self-cross-linkable hydrogels composed of partially oxidized alginate and gelatin for myocardial infarction repair. *J Bioact Compat Polym* 28, 126–140 (2013).
90. Chen, M. H. *et al.* Methods to Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. *ACS Biomater Sci Eng* 3, 3146–3160 (2017).
91. Gharaie, S. S., Dabiri, S. M. H. & Akbari, M. Smart shear-thinning hydrogels as injectable drug delivery systems. *Polymers (Basel)* 10, 0–15 (2018).
92. Chen, X. & Liu, Z. A pH-Responsive Hydrogel Based on a Tumor-Targeting Mesoporous Silica Nanocomposite for Sustained Cancer Labeling and Therapy. *Macromol Rapid Commun* 37, 1533–1539 (2016).
93. Askari, E. *et al.* Stimuli-responsive hydrogels for local post-surgical drug delivery. *Gels* 6, 1–31 (2020).
94. DiMatteo, R., Darling, N. J. & Segura, T. In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. *Adv Drug Deliv Rev* 127, 167–184 (2018).
95. Perera, M. M. & Ayres, N. Dynamic covalent bonds in self-healing, shape memory, and controllable stiffness hydrogels. *Polym Chem* 11, 1410–1423 (2020).
96. Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z. & Akil, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering C* 57, 414–433 (2015).
97. González-Henríquez, C. M., Sarabia-Vallejos, M. A. & Rodriguez-Hernandez, J. Advances in the fabrication of antimicrobial hydrogels for biomedical applications. *Materials* 10, 1–23 (2017).

98. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 101, 1869–1879 (2001).
99. Yuan, L. *et al.* Injectable photo crosslinked enhanced double-network hydrogels from modified sodium alginate and gelatin. *Int J Biol Macromol* 96, 569–577 (2017).
100. Lee, J. H. Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomater Res* 22, 1–14 (2018).
101. Gyles, D. A., Castro, L. D., Silva, J. O. C. & Ribeiro-Costa, R. M. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. *Eur Polym J* 88, 373–392 (2017).
102. Le, T. M. D. *et al.* Physically crosslinked injectable hydrogels for long-term delivery of oncolytic adenoviruses for cancer treatment. *Biomater Sci* 7, 4195–4207 (2019).
103. Grant, G. T., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C. & Thom, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett* 32, 195–198 (1973).
104. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* 37, 106–126 (2012).
105. Gu, Z. *et al.* Double network hydrogel for tissue engineering. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 10, (2018).
106. Chu, W., Nie, M., Ke, X., Luo, J. & Li, J. Recent Advances in Injectable Dual Crosslinking Hydrogels for Biomedical Applications. *Macromol Biosci* 21, 1–17 (2021).
107. Chen, Q., Chen, H., Zhu, L. & Zheng, J. Fundamentals of double network hydrogels. *J Mater Chem B* 3, 3654–3676 (2015).
108. Chen, Q., Chen, H., Zhu, L. & Zheng, J. Engineering of Tough Double Network Hydrogels. *Macromol Chem Phys* 217, 1022–1036 (2016).
109. Zhang, W. *et al.* Fatigue of double-network hydrogels. *Eng Fract Mech* 187, 74–93 (2018).
110. Wang, W. *et al.* Injectable, Self-Healing Hydrogel with Tunable Optical, Mechanical, and Antimicrobial Properties. *Chemistry of Materials* 31, 2366–2376 (2019).
111. Xu, F. *et al.* High-Throughput Synthesis, Analysis, and Optimization of Injectable Hydrogels for Protein Delivery. *Biomacromolecules* 21, 214–229 (2020).

112. Marco-Dufort, B., Willi, J., Vielba-Gomez, F., Gatti, F. & Tibbitt, M. W. Environment Controls Biomolecule Release from Dynamic Covalent Hydrogels. *Biomacromolecules* 0–43 (2020) doi:10.1021/acs.biomac.0c00895.
113. Zhang, K., Feng, Q., Fang, Z., Gu, L. & Bian, L. Structurally Dynamic Hydrogels for Biomedical Applications: Pursuing a Fine Balance between Macroscopic Stability and Microscopic Dynamics. *Chem Rev* 121, 11149–11193 (2021).
114. Chakma, P. & Konkolewicz, D. Dynamic Covalent Bonds in Polymeric Materials. *Angewandte Chemie - International Edition* 58, 9682–9695 (2019).
115. Uman, S., Dhand, A. & Burdick, J. A. Recent advances in shear-thinning and self-healing hydrogels for biomedical applications. *J Appl Polym Sci* 137, 1–20 (2020).
116. Heidarian, P. et al. Dynamic plant-derived polysaccharide-based hydrogels. *Carbohydr Polym* 231, 115743 (2020).
117. Picchioni, F. & Muljana, H. Hydrogels based on dynamic covalent and non covalent bonds: A chemistry perspective. *Gels* 4, 1–11 (2018).
118. Zhang, Z., He, C. & Chen, X. Hydrogels based on pH-responsive reversible carbon-nitrogen double-bond linkages for biomedical applications. *Mater Chem Front* 2, 1765–1778 (2018).
119. Belowich, M. E. & Stoddart, J. F. Dynamic imine chemistry. *Chem Soc Rev* 41, 2003–2024 (2012).
120. Klein, D. *Organic Chemistry*. (John Wiley and Sons, Inc., 2017).
121. Ding, F. et al. A dynamic and self-crosslinked polysaccharide hydrogel with autonomous self-healing ability. *Soft Matter* 11, 3971–3976 (2015).
122. Zhao, X. et al. Antibacterial anti-oxidant electroactive injectable hydrogel as self-healing wound dressing with hemostasis and adhesiveness for cutaneous wound healing. *Biomaterials* 122, 34–47 (2017).
123. Hafeez, S. et al. Viscoelastic Oxidized Alginates with Reversible Imine Type Crosslinks: Self-Healing, Injectable, and Bioprintable Hydrogels. *Gels* 4, 85 (2018).
124. Chen, Y. et al. Multiresponsive and Self-Healing Hydrogel via Formation of Polymer-Nanogel Interfacial Dynamic Benzoxaborole Esters at Physiological pH. *ACS Appl Mater Interfaces* (2019) doi:10.1021/acsami.9b16139.
125. Luo, C. et al. Biocompatible Self-Healing Coating Based on Schiff Base for Promoting Adhesion of Coral Cells. *ACS Appl Bio Mater* 3, 1481–1495 (2020).

126. Wang, L. N. L. N. *et al.* A double-crosslinked self-healing antibacterial hydrogel with enhanced mechanical performance for wound treatment. *Acta Biomater* 124, 139–152 (2021).
127. Wei, Z. *et al.* Novel biocompatible polysaccharide-based self-healing hydrogel. *Adv Funct Mater* 25, 1352–1359 (2015).
128. Shi, J. *et al.* Schiff based injectable hydrogel for in situ pH-triggered delivery of doxorubicin for breast tumor treatment. *Polym Chem* 5, 6180–6189 (2014).
129. He, Y. *et al.* Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Sci Rep* 6, 1–13 (2016).
130. Liao, S., Tang, L. & Qu, J. Schiff-base-functionalized polymeric hydrogel with high stretchability and multifunction. *Polym Adv Technol* 32, 1844–1852 (2021).
131. Atoufi, Z. *et al.* A novel bio electro active alginate-aniline tetramer/ agarose scaffold for tissue engineering: synthesis, characterization, drug release and cell culture study. *J Biomater Sci Polym Ed* 28, 1617–1638 (2017).
132. Hozumi, T., Kageyama, T., Ohta, S., Fukuda, J. & Ito, T. Injectable Hydrogel with Slow Degradability Composed of Gelatin and Hyaluronic Acid Cross-Linked by Schiff's Base Formation. *Biomacromolecules* 19, 288–297 (2018).
133. Koivisto, J. T. *et al.* Mechanically Biomimetic Gelatin-Gellan Gum Hydrogels for 3D Culture of Beating Human Cardiomyocytes. *ACS Appl Mater Interfaces* 11, 20589–20602 (2019).
134. Li, W. *et al.* All-natural injectable hydrogel with self-healing and antibacterial properties for wound dressing. *Cellulose* 27, 2637–2650 (2020).
135. Ferreira, C. R. *et al.* Synthesis and characterization of scaffolds produced under mild conditions based on oxidized cashew gums and carboxyethyl chitosan. *Int J Biol Macromol* 176, 26–36 (2021).
136. Yang, X., Bakaic, E., Hoare, T. & Cranston, E. D. Injectable polysaccharide hydrogels reinforced with cellulose nanocrystals: Morphology, rheology, degradation, and cytotoxicity. *Biomacromolecules* 14, 4447–4455 (2013).
137. Pandit, A. H., Mazumdar, N., Imtiyaz, K., Alam Rizvi, M. M. & Ahmad, S. Self-Healing and Injectable Hydrogels for Anticancer Drug Delivery: A Study with Multialdehyde Gum Arabic and Succinic Anhydride Chitosan. *ACS Appl Bio Mater* 3, 8460–8470 (2020).
138. Kölmel, D. K. & Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem Rev* 117, 10358–10376 (2017).

139. Cordes, E. H. & Jencks, W. P. On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis. *J Am Chem Soc* 84, 832–837 (1962).
140. Kalia, J. & Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angewandte Chemie International Edition* 47, 7523–7526 (2008).
141. Flynn, J., Durack, E., Collins, M. N. & Hudson, S. P. Tuning the strength and swelling of an injectable polysaccharide hydrogel and the subsequent release of a broad spectrum bacteriocin, nisin A. *J Mater Chem B* 8, 4029–4038 (2020).
142. Li, J. & Mooney, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater* 1, (2016).
143. Cascone, S. & Lamberti, G. Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review. *Int J Pharm* 573, 118803 (2020).
144. Vigata, M., Meinert, C., Hutmacher, D. W. & Bock, N. Hydrogels as drug delivery systems: A review of current characterization and evaluation techniques. *Pharmaceutics* 12, 1–45 (2020).
145. Hu, B. *et al.* An intrinsically bioactive hydrogel with on-demand drug release behaviors for diabetic wound healing. *Bioact Mater* 6, 4592–4606 (2021).
146. Thambi, T., Phan, V. H. G. & Lee, D. S. Stimuli-Sensitive Injectable Hydrogels Based on Polysaccharides and Their Biomedical Applications. *Macromol Rapid Commun* 37, 1881–1896 (2016).
147. Kolate, A. *et al.* PEG - A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 192, 67–81 (2014).
148. Ehrbar, M. *et al.* Cell-Demanded Liberation of VEGF121 from Fibrin Implants Induces Local and Controlled Blood Vessel Growth. *Circ Res* 94, 1124–1132 (2004).
149. Distler, T. *et al.* Ionically and Enzymatically Dual Cross-Linked Oxidized Alginate Gelatin Hydrogels with Tunable Stiffness and Degradation Behavior for Tissue Engineering. *ACS Biomater Sci Eng* 6, 3899–3914 (2020).
150. Salmaso, S. *et al.* Cyclodextrin/PEG based hydrogels for multi-drug delivery. *Int J Pharm* 345, 42–50 (2007).
151. Thoniyot, P., Tan, M. J., Karim, A. A., Young, D. J. & Loh, X. J. Nanoparticle–Hydrogel Composites: Concept, Design, and Applications of These Promising, Multi-Functional Materials. *Advanced Science* 2, 1–13 (2015).
152. Manzari, M. T. *et al.* Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nat Rev Mater* 6, 351–370 (2021).

153. Campea, M. A., Majcher, M. J., Loftis, A. & Hoare, T. A Review of Design and Fabrication Methods for Nanoparticle Network Hydrogels for Biomedical, Environmental, and Industrial Applications. *Adv Funct Mater* 31, (2021).
154. MacFarlane, L. R. *et al.* Functional nanoparticles through π-conjugated polymer self-assembly. *Nat Rev Mater* 6, 7–26 (2021).
155. Deng, S., Gigliobianco, M. R., Censi, R. & Di Martino, P. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: Current status, challenges and opportunities. *Nanomaterials* 10, (2020).
156. Hamidi, M., Azadi, A. & Rafiei, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 1638–1649 (2008).
157. Lavrador, P., Esteves, M. R., Gaspar, V. M. & Mano, J. F. Stimuli-Responsive Nanocomposite Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv Funct Mater* 31, 1–30 (2021).
158. Brouillard, C. *et al.* Silver absorption and toxicity evaluation of silver wound dressings in 40 patients with chronic wounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 32, 2295–2299 (2018).
159. Wei, S. *et al.* A composite hydrogel with co-delivery of antimicrobial peptides and platelet-rich plasma to enhance healing of infected wounds in diabetes. *Acta Biomater* 124, 205–218 (2021).
160. Tortorella, S. *et al.* Zein as a versatile biopolymer: different shapes for different biomedical applications. *RSC Adv* 11, 39004–39026 (2021).
161. Sun, C., Dai, L., Liu, F. & Gao, Y. Simultaneous treatment of heat and high pressure homogenization of zein in ethanol-water solution: Physical, structural, thermal and morphological characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 34, 161–170 (2016).
162. Paliwal, R. & Palakurthi, S. Zein in controlled drug delivery and tissue engineering. *Journal of Controlled Release* 189, 108–122 (2014).
163. Sharma, V. *et al.* Injectable hydrogel for co-delivery of 5-azacytidine in zein protein nanoparticles with stem cells for cardiac function restoration. *Int J Pharm* 603, 120673 (2021).
164. Bavya, M. C., Vimal Rohan, K., Gaurav, G. B. & Srivasatava, R. Synergistic treatment strategies to combat resistant bacterial infections using Schiff base modified nanoparticulate - hydrogel system. *Materials Science and Engineering C* 95, 226–235 (2019).

165. Correa, S. *et al.* Translational Applications of Hydrogels. *Chem Rev* 121, 11385–11457 (2021).
166. Alonso, J. M., Del Olmo, J. A., Gonzalez, R. P. & Saez-martinez, V. Injectable hydrogels: From laboratory to industrialization. *Polymers (Basel)* 13, 1–24 (2021).
167. Vedadghavami, A. *et al.* Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta Biomater* 62, 42–63 (2017).
168. Liu, J. *et al.* Sericin/Dextran Injectable Hydrogel as an Optically Trackable Drug Delivery System for Malignant Melanoma Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces* 8, 6411–6422 (2016).
169. He, Y. Y. *et al.* A double-network polysaccharide-based composite hydrogel for skin wound healing. *Carbohydr Polym* 261, 117870 (2021).
170. Silva, K. A. da. Síntese e caracterização morfológica, óptica e elétrica do compósito hidrogel/MBBA. (Universidade Estadual de Maringá, 2009).
171. Callister Jr., W. D. & Rethwisch, D. G. *Materials Science and Engineering - An Introduction*. Wiley (John Wiley & Sons, Ltd, 2014).
172. Kaberova, Z. *et al.* Microscopic structure of swollen hydrogels by scanning electron and light microscopies: Artifacts and reality. *Polymers (Basel)* 12, (2020).
173. Yan, C. & Pochan, D. J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. *Chem Soc Rev* 39, 3528 (2010).
174. von Lospichl, B. *et al.* Injectable hydrogels for treatment of osteoarthritis – A rheological study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 159, 477–483 (2017).
175. Loh, X. J. In-Situ Gelling Polymers. in *Series in BioEngineering* 226 (2015).
176. Mahato, K. *et al.* Nanomaterial Functionalization Strategies in Bio-Interface Development for Modern Diagnostic Devices. in *Biointerface Engineering: Prospects in Medical Diagnostics and Drug Delivery* 195–214 (Springer Singapore, Singapore, 2020). doi:10.1007/978-981-15-4790-4_9.
177. Qu, J. *et al.* Antibacterial adhesive injectable hydrogels with rapid self-healing, extensibility and compressibility as wound dressing for joints skin wound healing. *Biomaterials* 183, 185–199 (2018).
178. Qian, C. *et al.* Injectable and self-healing polysaccharide-based hydrogel for pH-responsive drug release. *Int J Biol Macromol* 123, 140–148 (2019).

179. Xu, J. H. *et al.* Intrinsic self-healing polymers for advanced lithium-based batteries: Advances and strategies. *Appl Phys Rev* 7, (2020).
180. Huang, H., Tsai, Y., Lin, S. & Hsu, S. Smart polymers for cell therapy and precision medicine. *J Biomed Sci* 26, 1–11 (2019).
181. Talebian, S., Mehrali, M., Taebnia, N. & Pennisi, C. P. Self-Healing Hydrogels : The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering? *Advanced Science* 1801664, 47 (2019).
182. Omidi, S., Pirhayati, M. & Kakanejadifard, A. Co-delivery of doxorubicin and curcumin by a pH-sensitive, injectable, and in situ hydrogel composed of chitosan, graphene, and cellulose nanowhisker. *Carbohydr Polym* 231, 115745 (2020).
183. Mukherjee, S., Hill, M. R. & Sumerlin, B. S. Self-healing hydrogels containing reversible oxime crosslinks. *Soft Matter* 11, 6152–6161 (2015).
184. Maiti, S., Khillar, P. S., Mishra, D., Nambiraj, N. A. & Jaiswal, A. K. Physical and self-crosslinking mechanism and characterization of chitosan-gelatin-oxidized guar gum hydrogel. *Polym Test* 97, 107155 (2021).
185. Zhang, X. *et al.* Thermoresponsive dendronized chitosan-based hydrogels as injectable stem cell carriers. *Polym Chem* 10, 2305–2315 (2019).
186. Zhang, M. *et al.* A pH-sensitive oxidized-dextran based double drug-loaded hydrogel with high antibacterial properties. *Int J Biol Macromol* 182, 385–393 (2021).
187. Karoyo, A. H. & Wilson, L. D. A review on the design and hydration properties of natural polymer-based hydrogels. *Materials* 14, 1–36 (2021).
188. Leena, M. M., Anukiruthika, T., Moses, J. A. & Anandharamakrishnan, C. Co-delivery of curcumin and resveratrol through electrosprayed core-shell nanoparticles in 3D printed hydrogel. *Food Hydrocoll* 124, 107200 (2022).
189. Lu, Y., Aimetti, A. A., Langer, R. & Gu, Z. Bioresponsive materials. *Nat Rev Mater* 2, (2016).
190. Poustchi, F. *et al.* Combination Therapy of Killing Diseases by Injectable Hydrogels: From Concept to Medical Applications. *Adv Healthc Mater* 10, 1–30 (2021).
191. Haugen, H. J., Basu, P., Sukul, M., Mano, J. F. & Reseland, J. E. Injectable biomaterials for dental tissue regeneration. *Int J Mol Sci* 21, (2020).

192. Daly, A. C., Riley, L., Segura, T. & Burdick, J. A. Hydrogel microparticles for biomedical applications. *Nat Rev Mater* 5, 20–43 (2020).
193. Gaharwar, A. K., Singh, I. & Khademhosseini, A. Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration. *Nat Rev Mater* 5, 686–705 (2020).
194. Carvalho, W. S. P., Wei, M., Ikpo, N., Gao, Y. & Serpe, M. J. Polymer-Based Technologies for Sensing Applications. *Anal Chem* 90, 459–479 (2018).
195. Asadi, N. et al. Multifunctional hydrogels for wound healing: Special focus on biomacromolecular based hydrogels. *Int J Biol Macromol* 170, 728–750 (2021).
196. Amsden, B. Solute diffusion within hydrogels. Mechanisms and models. *Macromolecules* 31, 8382–8395 (1998).
197. Portnov, T., Shulimzon, T. R. & Zilberman, M. Injectable hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Reviews in Chemical Engineering* 33, 91–107 (2017).
198. Siepmann, J. & Göpferich, A. Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 48, 229–247 (2001).
199. Truong, V. X. et al. Photodegradable gelatin-based hydrogels prepared by bioorthogonal click chemistry for cell encapsulation and release. *Biomacromolecules* 16, 2246–2253 (2015).
200. Alvarez-Lorenzo, C., Grinberg, V. Y., Burova, T. V. & Concheiro, A. Stimuli-sensitive cross-linked hydrogels as drug delivery systems: Impact of the drug on the responsiveness. *Int J Pharm* 579, 119157 (2020).
201. Norouzi, M., Nazari, B. & Miller, D. W. Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy. *Drug Discov Today* 21, 1835–1849 (2016).
202. Brazel, C. S. & Peppas, N. A. Modeling of drug release from swellable polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 49, 47–58 (2000).
203. Chen, X. et al. Magnetic and self-healing chitosan-alginate hydrogel encapsulated gelatin microspheres via covalent cross-linking for drug delivery. *Materials Science and Engineering C* 101, 619–629 (2019).
204. Yuan, F. Z. et al. Fabrication of injectable chitosan-chondroitin sulfate hydrogel embedding kartogenin-loaded microspheres as an ultrasound-triggered drug delivery system for cartilage tissue engineering. *Pharmaceutics* 13, 1–15 (2021).
205. Huebsch, N. et al. Ultrasound-triggered disruption and self-healing of reversibly cross-linked hydrogels for drug delivery and enhanced chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9762–9767 (2014).

206. Lee, K. Y., Peters, M. C., Anderson, K. W. & Mooney, D. J. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices. *Nature* 408, 998–1000 (2000).
207. Gatenby, R. A., Gawlinski, E. T., Gmitro, A. F., Kaylor, B. & Gillies, R. J. Acid-Mediated Tumor Invasion: a Multidisciplinary Study. *Cancer Res* 66, 5216–5239 (2006).
208. Cheng, C., Zhang, X., Meng, Y., Chen, L. & Zhang, Q. Development of a dual drug-loaded hydrogel delivery system for enhanced cancer therapy: In situ formation, degradation and synergistic antitumor efficiency. *J Mater Chem B* 5, 8487–8497 (2017).
209. Fasiku, V. O. et al. Polyethylene glycol–gum acacia-based multidrug delivery system for controlled delivery of anticancer drugs. *Polymer Bulletin* 76, 5011–5037 (2019).
210. Kavanagh, O. N., Albadarin, A. B., Croker, D. M., Healy, A. M. & Walker, G. M. Maximising success in multidrug formulation development: A review. *Journal of Controlled Release* 283, 1–19 (2018).
211. Murney, P. To mix or not to mix - Compatibilities of parenteral drug solutions. *Aust Prescr* 31, 98–101 (2008).
212. Farokhi, M. et al. Importance of dual delivery systems for bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release* 225, 152–169 (2016).
213. Mokhtari, R. B. et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* 8, 38022–38043 (2017).
214. He, C., Tang, Z., Tian, H. & Chen, X. Co-delivery of chemotherapeutics and proteins for synergistic therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 98, 64–76 (2016).
215. Yu, S., He, C. & Chen, X. Injectable Hydrogels as Unique Platforms for Local Chemotherapeutics-Based Combination Antitumor Therapy. *Macromol Biosci* 18, 1–13 (2018).
216. Kalyanaraman, B. Teaching the basics of the mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity: Have we been barking up the wrong tree? *Redox Biol* 29, 101394 (2020).
217. Pippa, L. F. Farmacocinética, metabolismo e excreção renal da doxorrubicina em pacientes com câncer de mama. 101 (2016) doi:10.11606/D.60.2017.tde-12122016-160641.

218. Xu, G. *et al.* Enhancing the anti-ovarian cancer activity of quercetin using a self-assembling micelle and thermosensitive hydrogel drug delivery system. *RSC Adv* 8, 21229–21242 (2018).
219. Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G. & Kyrodimos, E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin Exp Metastasis* 35, 309–318 (2018).
220. Huber, P. C., Maruiama, C. H. & Almeida, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Quim Nova* 33, 2148–2154 (2010).
221. Henidi, H. A. *et al.* Despite Blocking Doxorubicin-Induced Vascular Damage, Quercetin Ameliorates Its Antibreast Cancer Activity. *Oxid Med Cell Longev* 2020, (2020).
222. Chandran, H., Meena, M., Barupal, T. & Sharma, K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology Reports* 26, 0–9 (2020).
223. Shin, S.-A. *et al.* Structure-Based Classification and Anti-Cancer Effects of Plant Metabolites. *Int J Mol Sci* 19, 2651 (2018).
224. Fakhri, S., Moradi, S. Z., Farzaei, M. H. & Bishayee, A. Modulation of dysregulated cancer metabolism by plant secondary metabolites: A mechanistic review. *Semin Cancer Biol* (2020) doi:10.1016/j.semcancer.2020.02.007.
225. Carvalho, C. *et al.* Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr Med Chem* 16, 3267–3285 (2009).
226. Rivankar, S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 10, 853–858 (2014).
227. Li, S. *et al.* Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 100, 441–447 (2018).
228. Vafadar, A. *et al.* Quercetin and cancer: New insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell Biosci* 10, 1–17 (2020).
229. Almatroodi, S. A. *et al.* Potential therapeutic targets of quercetin, a plant flavonol, and its role in the therapy of various types of cancer through the modulation of various cell signaling pathways. *Molecules* 26, 1–38 (2021).
230. Amorati, R., Baschieri, A., Cowden, A. & Valgimigli, L. The antioxidant activity of quercetin in water solution. *Biomimetics* 2, 6–9 (2017).

231. Lesjak, M. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *J Funct Foods* 40, 68–75 (2018).
232. Tian, C. *et al.* Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *South African Journal of Botany* 137, 257–264 (2021).
233. Escribano-Ferrer, E., Queralt Regué, J., Garcia-Sala, X., Boix Montanés, A. & Lamuela-Raventos, R. M. In vivo anti-inflammatory and antiallergic activity of pure naringenin, naringenin chalcone, and quercetin in Mice. *J Nat Prod* 82, 177–182 (2019).
234. Murakami, A., Ashida, H. & Terao, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 269, 315–325 (2008).
235. Tang, S. M. *et al.* Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 121, 109604 (2020).
236. Kee, J. Y. *et al.* Inhibitory effect of quercetin on colorectal lung metastasis through inducing apoptosis, and suppression of metastatic ability. *Phytomedicine* 23, 1680–1690 (2016).
237. Hassan, S. *et al.* Quercetin potentializes the respective cytotoxic activity of gemcitabine or doxorubicin on 3D culture of AsPC-1 or HepG2 cells, through the inhibition of HIF-1 α and MDR1. *PLoS One* 15, 1–12 (2020).
238. Li, M. *et al.* Remodeling the tumor microenvironment to improve drug permeation and antitumor effects by co-delivering quercetin and doxorubicin. *J Mater Chem B* 7, 7619–7626 (2019).
239. Staedler, D., Idrizi, E., Kenzaoui, B. H. & Juillerat-Jeanneret, L. Drug combinations with quercetin: Doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 68, 1161–1172 (2011).
240. Wang, G., Zhang, J., Liu, L., Sharma, S. & Dong, Q. Quercetin Potentiates Doxorubicin Mediated Antitumor Effects against Liver Cancer through p53/Bcl-xl. *PLoS One* 7, (2012).
241. Xu, D., Qiu, C., Wang, Y., Qiao, T. & Cui, Y. L. Intranasal co-delivery of berberine and evodiamine by self-assembled thermosensitive in-situ hydrogels for improving depressive disorder. *Int J Pharm* 603, 120667 (2021).

242. Son, A. R. *et al.* Direct chemotherapeutic dual drug delivery through intra-articular injection for synergistic enhancement of rheumatoid arthritis treatment. *Sci Rep* 5, 1–12 (2015).
243. Haque, M. R., Lee, D. Y., Ahn, C. H., Jeong, J. H. & Byun, Y. Local Co-delivery of pancreatic islets and liposomal clodronate using injectable hydrogel to prevent acute immune reactions in a type 1 diabetes. *Pharm Res* 31, 2453–2462 (2014).
244. Gao, N. *et al.* Injectable shell-crosslinked F127 micelle/hydrogel composites with pH and redox sensitivity for combined release of anticancer drugs. *Chemical Engineering Journal* 287, 20–29 (2016).
245. Naghizadeh, Z., Karkhaneh, A. & Khojasteh, A. Simultaneous release of melatonin and methylprednisolone from an injectable in situ self-crosslinked hydrogel/microparticle system for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 106, 1932–1940 (2018).
246. Wen, N. *et al.* A polysaccharide-based micelle-hydrogel synergistic therapy system for diabetes and vascular diabetes complications treatment. *Materials Science and Engineering C* 100, 94–103 (2019).
247. Sadeghi-Abandansari, H., Pakian, S., Nabid, M. R., Ebrahimi, M. & Rezalotfi, A. Local co-delivery of 5-fluorouracil and curcumin using Schiff's base cross-linked injectable hydrogels for colorectal cancer combination therapy. *Eur Polym J* 157, 110646 (2021).
248. Cheng, H. *et al.* Long-term antibacterial and biofilm dispersion activity of an injectable in situ crosslinked co-delivery hydrogel/microgel for treatment of implant infection. *Chemical Engineering Journal* 433, 134451 (2022).
249. Dalei, G. *et al.* In situ crosslinked dialdehyde guar gum-chitosan Schiff-base hydrogels for dual drug release in colorectal cancer therapy. *Chem Eng Sci* 269, (2023).
250. Du, M., Jin, J., Zhou, F., Chen, J. & Jiang, W. Dual drug-loaded hydrogels with pH-responsive and antibacterial activity for skin wound dressing. *Colloids Surf B Biointerfaces* 222, (2023).
251. Duarte, D. & Vale, N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference models for future orientations in oncology. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery* vol. 3 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2022.100110> (2022).

252. Ferreira, C. R. *et al.* Synthesis and characterization of scaffolds produced under mild conditions based on oxidized cashew gums and carboxyethyl chitosan. *Int J Biol Macromol* 176, 26–36 (2021).
253. Solomevich, S. O. *et al.* Chitosan – dextran phosphate carbamate hydrogels for locally controlled co-delivery of doxorubicin and indomethacin: From computation study to in vivo pharmacokinetics. *Int J Biol Macromol* 228, 273–285 (2023).
254. Cui, B. *et al.* Emamectin benzoate-loaded zein nanoparticles produced by antisolvent precipitation method. *Polym Test* 94, (2021).
255. Alioghli Ziae, A., Erfan-Niya, H., Fathi, M. & Amiryaghoubi, N. In situ forming alginate/gelatin hybrid hydrogels containing doxorubicin loaded chitosan/AuNPs nanogels for the local therapy of breast cancer. *Int J Biol Macromol* 246, (2023).
256. Moreira, C. D. F. Hidrogéis injetáveis a base de quitosana/ gelatina/ nanopartículas de vidro bioativo com potencial para regeneração óssea: estudo in vitro e in vivo. (Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2018).
257. Salem, D. M. S. A., Sallam, M. A. E. & Youssef, T. N. M. A. Synthesis of compounds having antimicrobial activity from alginate. *Bioorg Chem* 87, 103–111 (2019).
258. Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. & Bryce, D. L. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. (2014).
259. Bouhadir, K. H. *et al.* Degradation of partially oxidized alginate and its potential application for tissue engineering. *Biotechnol Prog* 17, 945–950 (2001).
260. Zhou, T., Li, J., Jia, X., Zhao, X. & Liu, P. PH/Reduction Dual-Responsive Oxidized Alginate-Doxorubicin (mPEG-OAL-DOX/Cys) Prodrug Nanohydrogels: Effect of Complexation with Cyclodextrins. *Langmuir* 34, 416–424 (2018).
261. Sarker, B. *et al.* Fabrication of alginate-gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *J Mater Chem B* 2, 1470–1482 (2014).
262. Sirviö, J. A., Liimatainen, H., Visanko, M. & Niinimäki, J. Optimization of dicarboxylic acid cellulose synthesis: Reaction stoichiometry and role of hypochlorite scavengers. *Carbohydr Polym* 114, 73–77 (2014).
263. Huamani-Palomino, R. G. *et al.* Chemical modification of alginate with cysteine and its application for the removal of Pb(II) from aqueous solutions. *Int J Biol Macromol* 129, 1056–1068 (2019).

264. Huamani-Palomino, R. G., Córdova, B. M., Elvis Renzo Pichilingue, L., Venâncio, T. & Valderrama, A. C. Functionalization of an alginate-based material by oxidation and reductive amination. *Polymers (Basel)* 13, 1–15 (2021).
265. Kinh, C. D., Thien, T. V., Hoa, T. T. & Khieu, D. Q. Interpretation of ^1H -NMR spectrum of alginate by ^1H - ^1H TOCSY and COSY spectrum. *J Chem* 45, 772–775 (2007).
266. Oliver, S. et al. Tuneable catechin functionalisation of carbohydrate polymers. *Carbohydr Polym* 169, 480–494 (2017).
267. Afinjuomo, F. et al. Influence of oxidation degree on the physicochemical properties of oxidized inulin. *Polymers (Basel)* 12, 3–8 (2020).
268. Maia, J., Ferreira, L., Carvalho, R., Ramos, M. A. & Gil, M. H. Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. *Polymer (Gulf)* 46, 9604–9614 (2005).
269. Wang, H. et al. A Study on the Correlation between the Oxidation Degree of Oxidized Sodium Alginate on Its Degradability and Gelation. *Polymers (Basel)* 14, (2022).
270. Jiménez-Gómez, C. P. & Cecilia, J. A. Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. *Molecules* 25, (2020).
271. Chen, S. et al. Effect of molecular weight of hyaluronan on zein-based nanoparticles: Fabrication, structural characterization and delivery of curcumin. *Carbohydr Polym* 201, 599–607 (2018).
272. Zou, Y. et al. Encapsulation of quercetin in biopolymer-coated zein nanoparticles: Formation, stability, antioxidant capacity, and bioaccessibility. *Food Hydrocoll* 120, (2021).
273. Xu, H., Shen, L., Xu, L. & Yang, Y. Controlled delivery of hollow corn protein nanoparticles via non-toxic crosslinking: in vivo and drug loading study. *Biomed Microdevices* 17, (2015).
274. Reddy, N. & Rapisarda, M. Properties and applications of nanoparticles from plant proteins. *Materials* 14, (2021).
275. Chen, N. et al. Cellulose-based injectable hydrogel composite for pH-responsive and controllable drug delivery. *Carbohydr Polym* 225, 115207 (2019).
276. Silva, S. C. M., Fuzatto, R. H. S., Botrel, D. A., Ugucioni, J. C. & Oliveira, J. E. Development of zein nanofibers for the controlled delivery of essential amino acids for fish nutrition. *SN Appl Sci* 2, (2020).

277. Morsy, M. *et al.* Synthesis and characterization of freeze dryer chitosan nanoparticles as multifunctional eco-friendly finish for fabricating easy care and antibacterial cotton textiles. *Egypt J Chem* 62, 1277–1293 (2019).
278. Lu, S. *et al.* Preparation and Characterization of a Novel Natural Quercetin Self-Stabilizing Pickering Emulsion. *Foods* 12, (2023).
279. Khan, M. A., Chen, L. & Liang, L. Improvement in storage stability and resveratrol retention by fabrication of hollow zein-chitosan composite particles. *Food Hydrocoll* 113, (2021).
280. Hao, G., Xu, Z. P. & Li, L. Manipulating extracellular tumour pH: An effective target for cancer therapy. *RSC Adv* 8, 22182–22192 (2018).
281. Bashir, S. *et al.* Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and their applications. *Polymers (Basel)* 12, 1–60 (2020).
282. Figueiredo, G. P. de *et al.* Synthesis of MgAl₂O₄ by gelatin method: Effect of temperature and time of calcination in crystalline structure. *Materials Research* 20, 254–259 (2017).
283. Nasreen, Z., Khan, M. A. & Mustafa, A. I. Improved Biodegradable Radiation Cured Polymeric Film Prepared from Chitosan-Gelatin Blend. *Journal of Applied Chemistry* 2016, 1–11 (2016).
284. Campos, L. A. de A. *et al.* Ceftazidime/Tobramycin Co-Loaded Chitosan-Coated Zein Nanoparticles against Antibiotic-Resistant and Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmaceutics* 17, (2024).
285. El-Basheer, T. M., Shehap, A. M., Mahmoud, K. H. & Abd El-Kader, M. F. H. Preparation and Thermal Properties of Gelatin/TGS Composite Films. *Middle East Journal of Applied Sciences* 5, 157–170 (2015).
286. Noh, M. *et al.* Magnetic Nanoparticle-Embedded Hydrogel Sheet with a Groove Pattern for Wound Healing Application. *ACS Biomater Sci Eng* 5, 3909–3921 (2019).
287. Cui, T., Wu, Y., Ni, C., Sun, Y. & Cheng, J. Rheology and texture analysis of gelatin/dialdehyde starch hydrogel carriers for curcumin controlled release. *Carbohydr Polym* 283, (2022).
288. Zhang, Q. *et al.* Synthesis and Rheological Characterization of a Novel Salecan Hydrogel. *Pharmaceutics* 14, (2022).

289. Mohammadi, M., Karimi, M., Malaekeh-Nikouei, B., Torkashvand, M. & Alibolandi, M. Hybrid in situ- forming injectable hydrogels for local cancer therapy. *Int J Pharm* 616, (2022).
290. Zhang, P., Zhang, J., Zhao, L., Li, S. & Li, K. Quercetin attenuates the cardiotoxicity of doxorubicin–cyclophosphamide regimen and potentiates its chemotherapeutic effect against triple-negative breast cancer. *Phytotherapy Research* 36, 551–561 (2022).

Apêndice A

Informações Suplementares – Resultados Experimentais

Figura A1. Curva padrão da quercetina ($\lambda = 373$ nm).

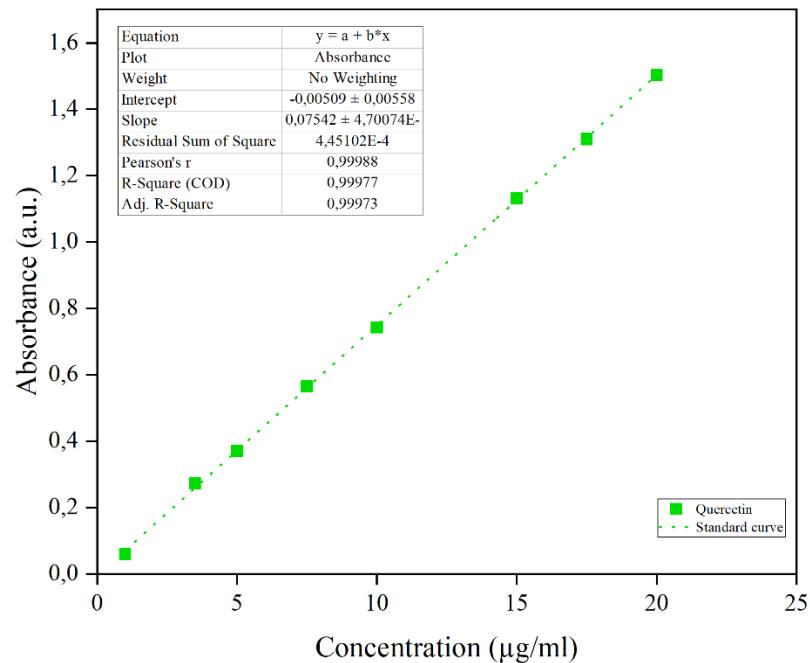


Figura A2. Curva padrão da Doxorrubicina ($\lambda = 478$ nm).

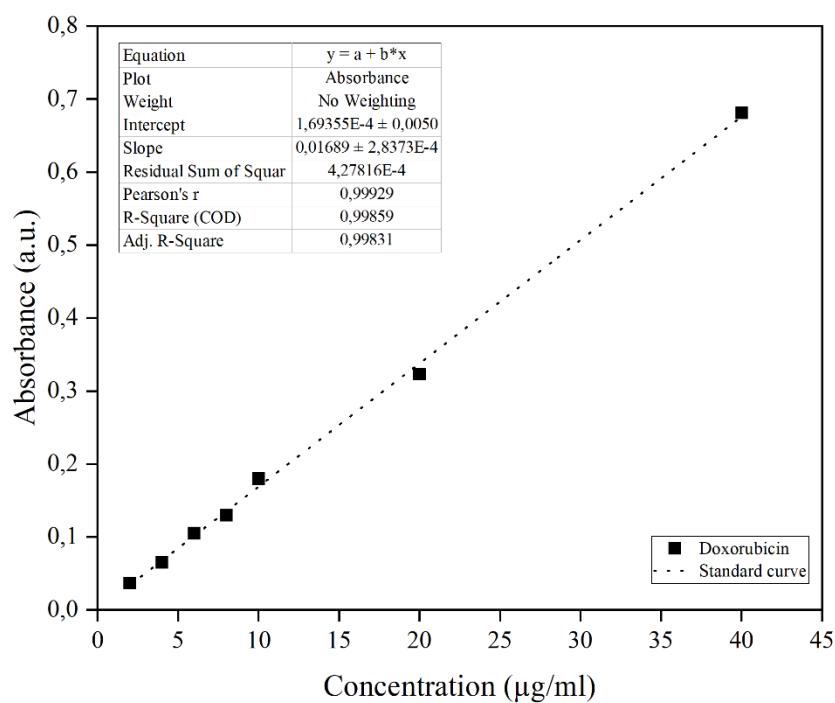


Figura A3. Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) alginatos oxidados (região anomérica).

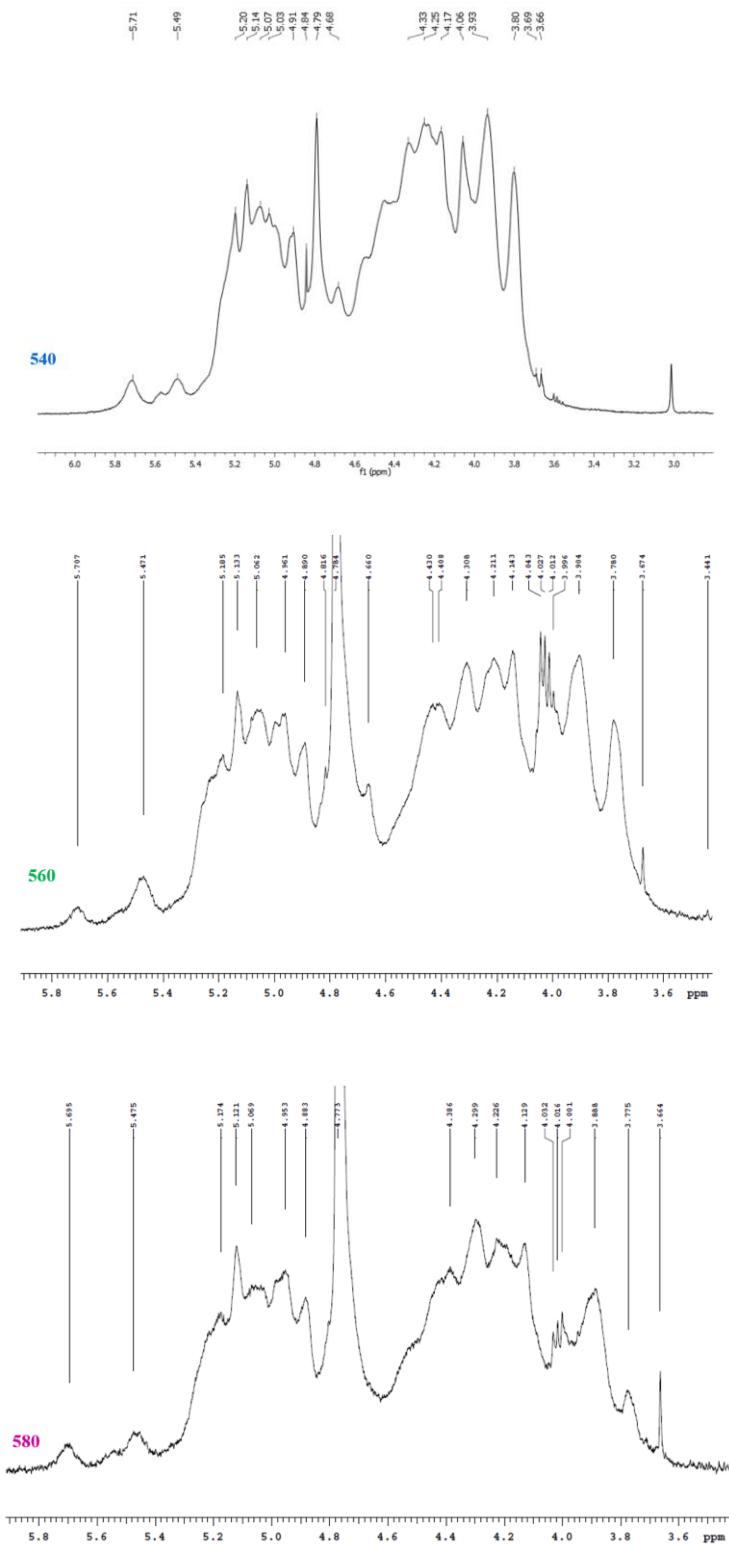


Figura A4. Modelos matematicos aplicados na liberação individual e simultanea de queracetina e doxorrubicina em pH 6,8 e 7,4.

| Drug release conditions | Zero order | | | First order | | | Higuchi | | | Korvsmeyer-Peppas | | | Peppas-Sahlin | | | Best fit model | | | |
|-------------------------|----------------|----------------|----------|----------------|----------------|----------|----------------|----------------|----------|-------------------|-------|-------|---------------|----------------|----------------|----------------|-------|----------|---------------|
| | R ² | k ₀ | SSR | R ² | k ₁ | SSR | R ² | K _H | SSR | R ² | n | k | SSR | R ² | k ₁ | k ₂ | m | SSR | |
| QUE pH 6,8 | 0.962 | 0.086 | 36.644 | 0.981 | 0.001 | 45.405 | 0.956 | 1.407 | 247.732 | 0.985 | 0.991 | 0.998 | 36.591 | 0.986 | 0.377 | 0.011 | 0.646 | 33.760 | Peppas-Sahlin |
| QUE pH 7,4 | 0.985 | 0.093 | 102.806 | 0.949 | 0.001 | 142.439 | 0.905 | 1.260 | 423.895 | 0.981 | 1.350 | 0.012 | 57.930 | 0.981 | 0.003 | 0.011 | 0.680 | 57.676 | Zero-order |
| DOX pH 6,8 | 0.964 | 0.204 | 1266.273 | 0.938 | 0.003 | 749.568 | 0.936 | 3.230 | 323.139 | 0.937 | 0.510 | 3.063 | 322.475 | 0.943 | 3.708 | 0.288 | 0.385 | 294.85 | Zero-order |
| DOX pH 7,4 | 0.948 | 0.235 | 25.346 | 0.912 | 0.004 | 1102.386 | 0.922 | 3.598 | 1398.097 | 0.942 | 0.837 | 0.583 | 741.799 | 0.948 | 1.053 | 0.018 | 0.642 | 669.238 | Zero-order |
| QUEsimult pH 6,8 | 0.798 | 0.031 | 84.404 | 0.795 | 0.000 | 80.967 | 0.778 | 0.509 | 25.785 | 0.762 | 0.247 | 1.940 | 12.906 | 0.764 | 1.736 | 0.331 | 0.189 | 12.78649 | Zero-order |
| DOXsimult pH 6,8 | 0.980 | 0.242 | 1293.901 | 0.956 | 0.004 | 583.331 | 0.964 | 3.819 | 299.836 | 0.968 | 0.567 | 2.666 | 261.888 | 0.972 | 3.516 | 0.232 | 0.422 | 231.353 | Zero-order |
| QUEsimult pH 7,4 | 0.861 | 0.024 | 25.708 | 0.856 | 0.000 | 25.346 | 0.790 | 0.375 | 17.466 | 0.798 | 0.546 | 0.293 | 17.327 | 0.812 | 0.351 | 0.022 | 0.423 | 16.376 | Zero-order |
| DOXsimult pH 7,4 | 0.967 | 0.236 | 673.388 | 0.913 | 0.004 | 998.153 | 0.916 | 3.617 | 1211.176 | 0.955 | 0.843 | 0.565 | 586.126 | 0.963 | 1.081 | 0.025 | 0.626 | 488.981 | Zero-order |

Apêndice B

Artigo Publicado



Open Access

This article is licensed under CC-BY 4.0

<http://pubs.acs.org/journal/acsofd>

Article

Gelatin-Oxidized Alginate and Chitosan-Coated Zein Nanoparticle Hydrogel Composite to Enhance Breast Cancer Cytotoxicity in Dual-Drug Delivery

Sanierly da Paz Do Nascimento, Ramon Ramos Marques de Souza, Marianna Vieira Sobral, Francisco Humberto Xavier-Junior, Marcus Vinícius Santos da Silva, Marcelo Machado Viana, Fausthon Fred da Silva, Michael J. Serpe, and Antonia L. de Souza*



Cite This: ACS Omega 2024, 9, 45190–45202



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: This study explores the combined delivery of doxorubicin and quercetin using a gelatin-oxidized alginate-based hydrogel as a promising strategy for localized breast cancer therapy. Our approach involves the incorporation of doxorubicin within the hydrogel matrix and loading quercetin into chitosan-coated zein nanoparticles. The hydrogel exhibited self-healing properties attributed to Schiff base cross-linking and demonstrated injectability. Characterization of its microstructural, mechanical, and textural properties revealed a porous and flexible structure, demonstrating its suitability for drug release applications. Both drugs exhibited distinct *in vitro* release profiles at pH 6.8 (typical of tumor tissue), with doxorubicin at 81.2% and quercetin at 9.7%. After 72 h of release, the cytotoxicity against MCF-7 breast cancer cells was assessed. The hydrogel formulation containing doxorubicin increased the cytotoxic action by 4.66-fold, whereas the hydrogel composite, containing both doxorubicin and quercetin-loaded nanoparticles, enhanced it by 20.7-fold compared with doxorubicin alone. Thus, the findings of our study highlight the enhancing effect of the dual release system, thereby expanding the utility of gelatin-oxidized alginate-based hydrogels as advanced drug delivery systems, as exemplified by the combined delivery of doxorubicin and quercetin.

