



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**FRANCISCO ALESSANDRO MARINHO RODRIGUES**

**BIOMATERIAIS POROSOS NANOESTRUTURADOS À BASE DE  
POLISSACARÍDEOS DE *Spondias purpurea* L. E *Calotropis procera* PARA SISTEMAS  
DE LIBERAÇÃO LOCAL DE ONCOCALIXONA A**

**FORTALEZA**

**2024**

FRANCISCO ALESSANDRO MARINHO RODRIGUES

BIOMATERIAIS POROSOS NANOESTRUTURADOS À BASE DE POLISSACARÍDEOS  
DE *Spondias purpurea* L. E *Calotropis procera* PARA SISTEMAS DE LIBERAÇÃO  
LOCAL DE ONCOCALIXONA A

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química.  
Área de concentração: Química.

Orientadora: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes  
Silva Ricardo.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

R613b Rodrigues, Francisco Alessandro Marinho.

Biomateriais porosos nanoestruturados à base de polissacarídeos de *Spondias purpurea* L. e *Calotropis procera* para sistemas de liberação local de onocalixona A / Francisco Alessandro Marinho Rodrigues. – 2024.

86 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo.

1. Nanofibrilas de celulose de *Calotropis procera*. 2. Amido quaternizado de ciriguela. 3. Nanoesferas ocas de sílica mesoporosa. 4. Compósitos porosos. 5. Onocalixona A. I. Título.

CDD 540

---

FRANCISCO ALESSANDRO MARINHO RODRIGUES

BIOMATERIAIS POROSOS NANOESTRUTURADOS À BASE DE POLISSACARÍDEOS  
DE *Spondias purpurea* L. E *Calotropis procera* PARA SISTEMAS DE LIBERAÇÃO  
LOCAL DE ONCOCALIXONA A

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química.  
Área de concentração: Química.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Nágila Maria Pontes Silva Ricardo (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dra. Larissa Moraes Ribeiro da Silva  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Ernani Alves Magalhães  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À minha mãe, irmãos e professores.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe e irmãos por todo o apoio incondicional ao longo dessa jornada.

À professora e minha orientadora Prof<sup>a</sup> Nágila Maria Pontes Silva Ricardo pela orientação acadêmica, pelo incentivo, pelo exemplo de dedicação na pesquisa, por sempre acreditar na minha capacidade, além de todo o carinho e cuidado que sempre dispensou a mim. Um imenso orgulho ter sido seu orientando.

Aos professores Marcos Mattos, Ernani Magalhães, Pablyana Rodrigues e Larissa Morais por aceitarem compor a banca examinadora e darem suas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Aos colegas do LabPIM que direta ou indiretamente auxiliaram para que esse trabalho de Tese e outros em paralelo pudessem ser concretizados, em especial ao Marlon Lemos, Kamila, Gabriel, Sarah, David Alves, Tatiana, André, André Luis, Carol, Louhana, Flávia, Wesley, Denise, Deyse, Cristine, Débora, Sâmia, Dande, Stefano, Karen e Tathilene.

À Universidade Federal do Ceará e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Ao professor Ernani Magalhães e seu grupo do Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBPNB) da UECE pela realização dos ensaios de segurança não clínica.

À professora Larissa Morais do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da UFC pela realização dos testes de toxicidade e antimicrobianos.

Ao Laboratório de Ligantes Asfálticos da UFC pelas análises de infravermelho e reologia.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará e à EMBRAPA pela realização das análises de microscopia.

Ao CENAUREMN pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear realizadas.

Ao Laboratório de Adsorção e Captura de CO<sub>2</sub> da UFC pelas análise de adsorção e dessorção.

Ao Laboratório de Raios X (LRX) da UFC pelas análises de difração de raio X.

Ao Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais (LAFIPLAM II) na pessoa da Professora Otilia Deusdênia por disponibilizar o bioativo usado nesse trabalho.

E a todos que contribuíram de alguma forma nesta jornada acadêmica. Muito obrigado a todos!!!

## RESUMO

Biomateriais nanoestruturados são de grande relevância para a ciência dos materiais e para a nanomedicina para o desenvolvimento de aplicações médicas inovadoras. Esses materiais fornecem uma plataforma versátil para engenharia de tecidos, medicina regenerativa e administração de fármacos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver compósitos nanoestruturados híbridos baseados em polissacarídeos de fontes vegetais de baixo valor agregado para serem aplicados no carreamento e liberação local de oncoalixona A (OncoA). Compósitos porosos nanoestruturados foram produzidos por liofilização utilizando matriz polimérica reticulada a partir de nanofibrilas de celulose de *Calotropis procera* (algodão de seda) e amido quaternizado de *Spondias purpurea* L. (ciriguela). As nanofibrilas de celulose, obtidas por hidrólise ácida e tratamento ultrassônico, apresentaram diâmetro de 29,4 nm e comprimento de 0,65  $\mu\text{m}$ , cristalinidade de 63,9% e um potencial  $\zeta$  de  $-30,8$  mV. O amido catiônico apresentou potencial  $\zeta$  de  $+23,0$  mV, percentual de nitrogênio de 0,52% e grau de substituição (GS) de 0,065. Paralelamente, nanocarreadores mesoporosos de sílica foram sintetizados em formato esférico com raio hidrodinâmico de 527,9 nm e tamanho de poro de 2,96 nm. A partir do método de equilíbrio de adsorção, as nanoesferas ocas de sílica mesoporosa (NOSM) apresentaram adsorção de  $26,07 \pm 1,36\%$  para OncoA. Ainda, as NOSM carregadas com OncoA (NOSM@OncoA), foram incorporadas nos compósitos porosos com diferentes proporções da matriz polimérica reticulada, os quais apresentaram percentual de reticulação entre 8,8 e 24,1% e porosidade de 19,8 a 25,6%. Ensaio *in vivo* utilizando modelo de Zebrafish mostraram que OncoA nanocarreada não apresentou toxicidade aguda nas concentrações testadas. Os compósitos porosos mostraram um perfil de liberação controlada com *burst* inicial de 20-25% de OncoA liberada nas primeiras 12 horas. Os perfis de liberação dos compósitos foram melhor ajustados ao modelo de Higuchi e Korsmeyer-Peppas, indicando um mecanismo de associação entre difusão e super caso de transporte II. Assim, os resultados preliminares sugerem que a arquitetura dos compósitos nanoestruturados incorporados com NOSM@OncoA pode ser suscetível a aplicação como implantes ósseos para carreamento e liberação local, além de fornecer estrutura biocompatível para regeneração tecidual.

**Palavras-chave:** nanofibrilas de celulose de *Calotropis procera*; ciriguela; ciameira; nanoesferas de sílica; compósitos porosos; oncoalixona A.

## ABSTRACT

Nanostructured biomaterials are highly relevant to materials science and nanomedicine for the development of innovative medical applications. These materials provide a versatile platform for tissue engineering, regenerative medicine and drug delivery. The aim of this work was to develop hybrid nanostructured composites based on polysaccharides from low value-added plant sources to be applied to the local loading and release of oncocalyxone A (OncoA). Nanostructured porous composites were produced by freeze-drying using a cross-linked polymer matrix based on cellulose nanofibrils from *Calotropis procera* (ciumeira) and quaternized starch from *Spondias purpurea* L. (ciriguela). The cellulose nanofibrils, obtained by acid hydrolysis and ultrasonic treatment, had a diameter of 29.4 nm and a length of 0.65  $\mu\text{m}$ , crystallinity of 63.9% and a  $\zeta$  potential of -30.8 mV. The cationic starch had a  $\zeta$  potential of +23.0 mV, a nitrogen percentage of 0.52% and a degree of substitution (GS) of 0.065. At the same time, mesoporous silica nanocarriers were synthesized in a spherical shape with a hydrodynamic radius of 527.9 nm and a pore size of 2.96 nm. Using the adsorption equilibrium method, the hollow mesoporous silica nanospheres (NOSM) showed adsorption of  $26.07 \pm 1.36\%$  for OncoA. In addition, NOSM loaded with OncoA (NOSM@OncoA) were incorporated into porous composites with different proportions of the crosslinked polymer matrix, which showed a crosslinking percentage of between 8.8 and 24.1% and porosity of between 19.8 and 25.6%. In vivo tests using a zebrafish model showed that nanocarried OncoA did not present acute toxicity at the concentrations tested. The porous composites showed a controlled release profile with an initial burst of 20-25% of OncoA released in the first 12 h. The release profiles of the composites were best fitted to the Higuchi and Korsmeyer-Peppas model, indicating a mechanism of association between diffusion and super-case II transport. Thus, the preliminary results suggest that the architecture of nanostructured composites incorporated with NOSM@OncoA may be susceptible to application as bone implants for local loading and release, as well as providing a biocompatible structure for tissue regeneration.

**Key-words:** cellulose nanofibrils from *Calotropis procera*; ciriguela; ciumeira; silica nanospheres; porous composites; oncocalyxone A.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estado da arte da produção científica envolvendo o termo " <i>Scaffold drug release</i> ", realizada no site SciFinder em 12 de dezembro de 2023. ....	16
Figura 2 – Principais vias de administração e mecanismos de liberação de fármacos em materiais nanoestruturados .....	21
Figura 3 – Síntese e composição de <i>scaffolds</i> para aplicações biomédicas.....	24
Figura 4 – Representação das regiões amorfas e cristalinas do grânulo de amido e métodos de obtenção de nanopartículas de amido .....	26
Figura 5 – Esquema representando fibrilas, microfibrilas e celulose em paredes celulares vegetais e a obtenção de nanofibrilas de celulose .....	28
Figura 6 – Algumas modificações químicas realizadas em polissacarídeos .....	30
Figura 7 – Estrutura química da (a) doxorubicina e da (b) oncolyxone A.....	32
Figura 8 – Biomoléculas obtidas de <i>Spondias purpurea</i> L. e <i>Calotropis procera</i> .....	33
Figura 9 – Preparação de nanofibrilas de celulose a partir de fibras de <i>Calotropis procera</i>	38
Figura 10 – Esquema de quaternização do amido de ciriguela.....	40
Figura 11 – Esquema mostrando a síntese de nanoesferas de sílica mesoporosa.....	42
Figura 12 – Esquema mostrando a remoção do <i>template</i> CTAB.....	42
Figura 13 – Esquema demonstrando a reação de reticulação de polissacarídeos nanoestruturados quimicamente modificados e a preparação dos compósitos porosos.....	44
Figura 14 – Sistema de estudo de liberação por difusão vertical em PBS pH 7,4.....	49
Figura 15 – Espectros de FTIR (a) e o padrão de DRX deconvoluído (b) de celulose nanofibrilada de <i>Calotropis procera</i> (CNFCp) obtidos após hidrólise ácida e tratamento por ultrassom .....	51
Figura 16 – Análise TG e DTG da celulose nanofibrilada de <i>Calotropis procera</i> (CNFCp) obtida após hidrólise ácida e pós tratamento ultrassônico .....	53
Figura 17 – Micrografias MEV (a) e MEVT (b) de CNFCp obtida após hidrólise ácida e pós tratamento ultrassônico. Ampliação de micrografias: MEV: 5,000× and MEVT:	

35,000×.....	53
Figura 18 – (a) Fotos de géis CNFCp, (b) viscosidade e tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento e (c) módulo de armazenamento G' e módulo de perda G'' versus frequência angular em diferentes concentrações.....	53
Figura 19 – GCP de amido de ciriguela ( <i>Spondias purpurea</i> L.) quaternizado (AQC).....	57
Figura 20 – (a) Espectros de FTIR e (b) RMN H <sup>1</sup> de amido de ciriguela (CS) e amido de ciriguela ( <i>Spondias purpurea</i> L.) quaternizado (AQC).....	58
Figura 21 – FTIR de NOSM antes e depois da remoção do <i>template</i> .....	59
Figura 22 – Isoterma de NOSM e distribuição de tamanho de poros pelo método NL-DFT.	61
Figura 23 – (a) Micrografias MEV e (b) distribuição de tamanho de partícula de NOSM por DSL .....	61
Figura 24 – (a) espectros UV-Vis de OncoA em diferentes concentrações em PBS (pH = 7,4) a 25 °C; (b) curva de calibração obtida de [OncoA] vs absorbância a 282 nm, e (c) micrografia MEV (50000×) de NOSM@OncoA (após adsorção).....	63
Figura 25 – Efeito das amostras na atividade locomotora do zebrafish adulto ( <i>Danio rerio</i> ) no Teste de Campo Aberto (0-5 min) .....	64
Figura 26 – Espectros de FTIR de <i>scaffolds</i> e materiais de partida.....	69
Figura 27 – Fotografias e micrografias MEV (1000×) de <i>scaffolds</i> em diferentes formulações: CP1, CP2, CP3 and CP4.....	70
Figura 28 – Porcentagem média (± desvio padrão) de OncoA liberada em pH 7,4 por 72 horas .....	71
Figura 29 – Modelos matemáticos ajustados para a cinética de liberação de OncoA nos nanocarreadores mesoporosos .....	74
Figura 30 – Modelos matemáticos ajustados para a cinética de liberação de OncoA nos <i>scaffolds</i> .....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de compósitos porosos preparados com diferentes concentrações de CNFCp e AQC graftizados .....	45
Tabela 2 – Parâmetros analisados para CNFCp .....	50
Tabela 3 – Parâmetros analisados para AQC .....	57
Tabela 4 – Parâmetros analisados para NOSM .....	60
Tabela 5 – Resultados de testes de toxicidade aguda em zebrafish adultos .....	65
Tabela 6 – Parâmetros analisados para CP em diferentes proporções de matriz polimérica	67
Tabela 7 – Parâmetros cinéticos de liberação para OncoA, NOSM@OncoA e CP1 a 4...	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Agente plastificante
AQC	Amido quaternizado de ciriguela
CHPTAC	cloreto de 3-cloro-2-hidroxipropil trimetilamônio
CMC	Concentração Micelar Crítica
CNFCp	Celulose nanofibrilada de <i>Calotropis procera</i>
CP	Compósitos Porosos
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DL	Carreamento de fármaco
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DRX	Difração de Raios-X
DTG	Termogravimetria derivada
FCp	Fibras de <i>Calotropis procera</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
GCP	Cromatografia de permeação em gel
GS	Grau de substituição
KPS	Persulfato de potássio
MBA	N,N'-Metilenobisacrilamida
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MEVT	Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão de
NL-DFT	Teoria do Funcional da Densidade
NOSM	Nanoesfera de Sílica Oca de Mesopourosa
NSM	Nanoesfera de Sílica de Mesoporosa
OncoA	Oncocalixona A
PDI	Índice de polidispersividade
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVA	Álcool Polivinílico
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
TEMPO	N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina
TEOS	Tetraetil Ortosilicato
TGA	Análise termogravimétrica
TMPDA	N,N,N',N'-Tetrametil-1,3-propanodiamina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	14
1.1	Introdução .....	14
1.2	Objetivos.....	17
1.1.1	<i>Geral</i> .....	17
1.1.2	<i>Específicos</i> .....	17
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	18
2.1	<b>Biomateriais nanoestruturados para aplicações biomédicas</b> .....	18
2.1.1	<i>Mecanismo de liberação controlada de fármacos usando biomateriais nanoestruturados</i> .....	20
2.1.2	<i>Biomateriais à base de sílica</i> .....	22
2.1.3	<i>Scaffolds e biocompósitos para liberação de fármacos</i> .....	23
2.2	<b>Polissacarídeos</b> .....	26
2.2.1	<i>Amido</i> .....	26
2.2.2	<i>Celulose</i> .....	27
2.2.3	<i>Funcionalização de polissacarídeos</i> .....	29
2.3	<b>Bioativos anticâncer</b> .....	31
2.3.1	<i>Oncocalixona A</i> .....	31
2.4	<i>Spondias purpurea L. e Calotropis procera como biomassa de baixo valor agregado</i> .....	32
<b>3</b>	<b>SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS À BASE DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE/AMIDO QUATERNIZADO E NANOESFERAS OCAS DE SÍLICA PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA LOCAL DE ONCOCALIXONA A</b> .....	35
3.1	<b>Introdução</b> .....	35
3.2	<b>Materiais e métodos</b> .....	37
3.2.1	<i>Reagentes</i> .....	37
3.2.2	<i>Celulose nanofibrilada (CNFCp) de Calotropis procera</i> .....	37
3.2.2.1	<i>Caracterização da celulose nanofibrilada (CNFCp)</i> .....	39
3.2.3	<i>Obtenção e quaternização do amido de ciriguela</i> .....	40
3.2.3.1	<i>Caracterização do amido quaternizado</i> .....	41
3.2.4	<i>Síntese de nanoesferas ocas de sílica mesoporosa (NOSM)</i> .....	41

3.2.4.1	<i>Caracterização das nanoesferas ocas de sílica mesoporosa (NOSM)</i> .....	43
3.2.5	<b><i>Preparação de compósito poroso CNFCp-gMBA-AQC/NOSM</i></b> .....	43
3.2.6	<b><i>Caracterização dos compósitos porosos (CP)</i></b> .....	45
3.2.6.1	<i>Análise por FTIR</i> .....	45
3.2.6.2	<i>Análise por MEV</i> .....	45
3.2.6.3	<i>Intumescimento e fração solúvel</i> .....	45
3.2.6.4	<i>Densidade e porosidade</i> .....	46
3.2.7	<b><i>Carreamento de OncoA pelo método do equilíbrio de adsorção</i></b> .....	46
3.2.8	<b><i>Avaliação da segurança não clínica in vivo</i></b> .....	47
3.2.8.1	<i>Teste de Campo Aberto (TCA)</i> .....	47
3.2.8.2	<i>Toxicidade aguda 96 h</i> .....	48
3.2.9	<b><i>Ensaio de liberação in vitro</i></b> .....	48
3.2.10	<b><i>Análise estatística</i></b> .....	50
3.3	<b>Resultados e discussão</b> .....	50
3.3.1	<b><i>Caracterização química e morfológica dos materiais de partida</i></b> .....	50
3.3.1.1	<i>Caracterização de nanofibrilas de celulose de Calotropis procera</i> .....	50
3.3.1.2	<i>Síntese e caracterização do amido quaternizado de Spondias purpurea L.</i> .....	56
3.3.1.3	<i>Caracterização de Nanoesferas de Sílica Oca Mesoporosa (NOSM)</i> .....	59
3.3.2	<b><i>Carreamento de bioativo OncoA</i></b> .....	62
3.3.3	<b><i>Avaliação da segurança não clínica in vivo</i></b> .....	63
3.3.4	<b><i>Caracterização de compósitos porosos CNFCp-gMBA-AQC/NOSM@OncoA</i></b> .....	66
3.3.4.1	<i>Síntese, intumescimento e porosidade dos compósitos porosos</i> .....	66
3.3.4.2	<i>Estrutura química</i> .....	68
3.3.4.3	<i>Análise morfológica</i> .....	69
3.3.5	<b><i>Ensaio de liberação in vitro</i></b> .....	71
4	<b>CONCLUSÃO</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

#### 1.1 Introdução

Os recentes avanços da nanotecnologia têm impulsionado o desenvolvimento de diversos materiais em nanoescala com aplicações em diversas áreas, como engenharia de materiais, indústria alimentícia, farmacológica e nanomédica. No campo médico e farmacológico, a nanotecnologia tem buscado uma maior eficiência na liberação de fármacos, bem como estratégias de diagnóstico, tratamento e mimetização de sistemas biológicos (CAI et al., 2017; CALDONAZO et al., 2021). Nas últimas décadas, tem havido uma demanda crescente por estratégias para o cuidado da saúde humana, devido à maior longevidade da população mundial prevista para os próximos anos. Nesse contexto, a nanomedicina tem ganhado importância devido ao esperado aumento na incidência de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e diversos tipos de câncer, geralmente mais incidentes com uma maior longevidade humana. Essa ciência médica busca, por meio da nanotecnologia, novas estratégias de diagnóstico e tratamento de doenças com maior eficiência terapêutica, apresentar métodos menos invasivos e apresentar uma maior taxa de sucesso no tratamento (MARIADOSS et al., 2020; MOZAFARINIA et al., 2021; RAHBAR et al., 2020).

Diferentes estratégias de liberação de fármacos podem utilizar biomateriais nanoestruturados para permitir uma liberação controlada, mantendo assim a concentração do fármaco na faixa terapêutica. Biomateriais nanoestruturados para liberação de fármacos utilizam principalmente arquiteturas como nanocápsulas, nanopartículas, hidrogéis, nanotubos, nanoemulsões e nanocompósitos. A viabilidade de produção e aplicação desses nanomateriais também está associada ao baixo custo de obtenção, bem como a ausência de efeitos adversos no organismo (RAHBAR et al., 2020; REBOUÇAS et al., 2022; SOUSA et al., 2021; SUFI-MARAGHEH et al., 2020; ZAWANI; FAUZI, 2021). Assim, a utilização de biomateriais de baixo custo, renováveis, biodegradáveis e não tóxicos torna-se vantajosa devido à redução dos custos de produção e de uma maior biocompatibilidade.

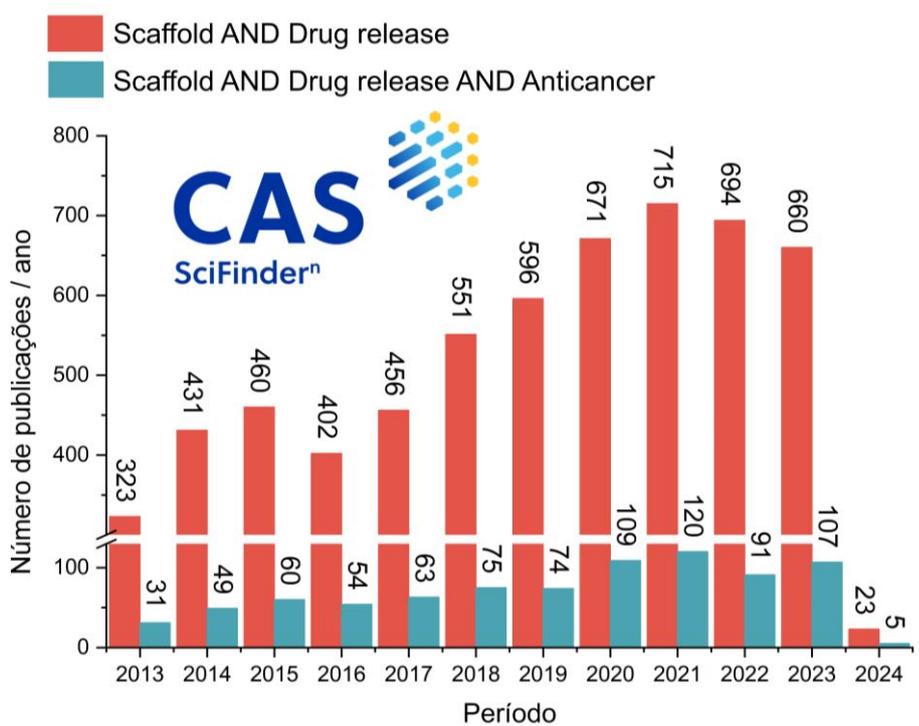
Biomacromoléculas como polissacarídeos (amido, quitina, celulose, alginato), lipídios (óleos e ceras) e proteínas (gelatinas e colágenos) são materiais vantajosos na produção de sistemas em nanoescala devido à sua disponibilidade natural e também as propriedades físicas e químicas biocompatíveis (LAUBACH et al., 2021; LI et al., 2022). Além disso, possuem grupos funcionais (hidroxila, amina e carboxila) que possibilitam a modificação química e a

grafitização de novos grupos químicos e moléculas que aumentem a versatilidade das aplicações. Esses biopolímeros também podem atuar como matriz polimérica em compósitos aplicados em engenharia de tecidos, bem como biocurativos e na liberação de fármacos (CHALITANGKON; WONGKITTISIN; MONVISADE, 2020; MENG et al., 2020; SUFI-MARAGHEH et al., 2020). A obtenção dessas biomoléculas a partir de resíduos de biomassa provenientes da agroindústria ou de fontes vegetais não convencionais torna-se bastante viável e atrativa ambientalmente para a produção de biomateriais.

*Scaffolds* poliméricos e híbridos são estruturas porosas tridimensionais que podem ser usadas em estratégias promissoras para o crescimento celular e regeneração de tecidos (por exemplo, ossos, cartilagens, nervos, músculos e pele), além disso, esses biomateriais também podem ser usados para o transporte e liberação de fármacos. Drogas antineoplásicas são amplamente utilizadas em estudos que utilizam biomateriais em macro e nanoescala para transporte, direcionamento e liberação controlada com o objetivo de aumentar a eficácia terapêutica, bem como reduzir efeitos adversos. Os *scaffolds* podem ser usados como estruturas que combinam a regeneração tecidual com a liberação controlada de fármacos (COLLINS et al., 2021; MENG et al., 2020; ZIELIŃSKA et al., 2023). *Scaffolds* e hidrogéis para liberação de fármacos podem ser combinados com estratégias cirúrgicas, na forma de implantes em tecidos afetados por tumores, promovendo a liberação de fármacos e auxiliando na regeneração e crescimento do tecido local. Esses implantes podem promover a entrega de fármacos diretamente no local do tumor, minimizando a exposição ao tecido saudável e potencialmente melhorando a eficácia do tratamento, reduzindo efeitos colaterais (HOPE et al., 2022; SANTANA et al., 2022).

Nesse contexto, dados reportados na Base de Dados na Plataforma científica SciFinder® (<https://scifinder-n.cas.org>) mostram um aumento gradativo nas buscas envolvendo os termos "Scaffold drug release" e "Anticancer" de 2013 a 2024, como mostra a Figura 1. Nesse período foi registrado 6.089 publicações no site referentes ao uso de *scaffolds* no carreamento e liberação de fármacos, além de 838 referentes a liberação de fármacos com ação anticâncer. Esses números refletem uma crescente aplicação de scaffolds no transporte e liberação de fármacos na última década, como uma plataforma multifuncional no tratamento de neoplasias.

Figura 1 – Estado da arte para as produções científicas envolvendo o termo "Scaffold drug release", realizada no site SciFinder em 12 de dezembro de 2023.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, este trabalho tem como objetivo desenvolver compósitos nanoestruturados do tipo *scaffold* à base de polissacarídeos obtidos de fontes vegetais alternativas e de baixo valor agregado (*Calotropis procera* e *Spondias purpurea* L.). Os polissacarídeos foram obtidos a partir dos frutos de *S. purpurea* L. e das fibras sedosas de *Calotropis procera*, dos quais foram obtidos amido e nanocelulose, respectivamente. Inicialmente, no **CAPÍTULO 2**, será apresentado um embasamento teórico sobre biomateriais e compósitos nanoestruturados, bem como métodos de produção baseados em polímeros naturais, com ênfase nos polissacarídeos amido e celulose. O mesmo capítulo apresentará tópicos relacionados à modificação química de polissacarídeos, ao uso de fontes vegetais de baixo valor agregado além de algumas informações sobre as aplicações biológicas e a ação anticâncer da oncolixona A. No **CAPÍTULO 3** será apresentado o desenvolvimento de compósitos porosos à base de amido quaternizado dos frutos de *S. purpurea* L. (ciriguela) e nanofibrilas de celulose de *C. procera* (bombardeira) contendo nanoesferas ocas de sílica mesoporosa. Este sistema nanoestruturado será utilizado como compósito liberador de fármacos e como sistema de adsorção (pelas nanoesferas de sílica porosa) para a oncolixona A. Este bioativo será analisado quanto à sua toxicidade em zebrafish e também será submetido a ensaios de liberação.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Geral

Desenvolver compósitos porosos nanoestruturados baseados em biomassa de baixo valor agregado a partir das espécies *Spondias purpurea* L. e *Calotropis procera* aplicados ao carregamento e liberação local de onocalixona A.

### 1.2.2 Específicos

- a) Obter e caracterizar nanofibrilas a partir das fibras sedosas das sementes de *C. procera*;
- b) Modificar quimicamente o amido dos frutos de *S. purpurea* L. e realizar caracterização estrutural;
- c) Sintetizar e caracterizar nanoesferas ocas de sílica porosa para adsorção e liberação de onocalixona A;
- d) Reticular a matriz polimérica usando metilenobisacrilamida como agente de grafitização;
- e) Desenvolver e caracterizar compósitos nanoestruturados na forma de scaffolds à base de amido quaternizado e celulose nanofibrilada com inserção de nanoesferas ocas de sílica mesoporosa;
- f) Analisar a eficiência de carregamento e a toxicidade *in vivo* para onocalixona A adsorvida nos nanocarreadores à base de sílica mesoporosa;
- g) Realizar ensaio de liberação *in vitro* da onocalixona A presente nos compósitos porosos e nanocarreadores à base de sílica mesoporosa.

## CAPÍTULO II

### 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 2.1 Biomateriais nanoestruturados para aplicações biomédicas

Nos últimos anos, os nanomateriais têm atraído atenção considerável devido ao seu pequeno tamanho, superfície funcionalizável, solubilidade aprimorada além de outras múltiplas funcionalidades. Os nanomateriais apresentam propriedades únicas, incluindo excepcionalmente maior resistência e durabilidade, melhor difusibilidade, estabilidade coloidal, melhorias mecânicas de compósitos e também propriedades ópticas específicas. Ao longo do desenvolvimento da nanotecnologia, a arquitetura de nanomateriais e compósitos nanoestruturados baseados em biopolímeros tem mostrado ampla diversificação, bem como inúmeras possibilidades de aplicação (SOLANGI et al., 2023).

Nas aplicações médicas, os biomateriais nanoestruturados são projetados para finalidades como ação antimicrobiana, diagnóstico por imagem, scaffolds, biossensores, crescimento celular, medicina regenerativa, liberação controlada e direcionada de fármacos e para a engenharia de tecidos (JACOB et al., 2018). As nanoestruturas para liberação de fármacos incluem mecanismos de liberação controlada que permitem a liberação contínua de agentes terapêuticos, mantendo a faixa de ação terapêutica, minimizando os efeitos colaterais e otimizando a eficácia do tratamento. Para isso, os biomateriais nanoestruturados devem ser biocompatíveis e garantir o mínimo de efeitos adversos nos tecidos vivos ou incorporar modificações superficiais que reduzam a toxicidade e imunogenicidade (ZIELIŃSKA et al., 2023).

Existem muitos métodos para o preparo de materiais nanoestruturados, tais como, dessolvatação, *electrospinning*, secagem por *spray dryer*, automontagem, nanoemulsão e liofilização (SOLANGI et al., 2023). Normalmente, a produção de materiais nanoestruturados ocorre por meio de duas estratégias principais que incluem as abordagens "*bottom-up*" e "*top-down*". Na abordagem *bottom-up* uma nanoestrutura é construída a partir da montagem de pequenas unidades (por exemplo, dendrímeros), enquanto na abordagem de *top-down* uma unidade maior é reduzida de um tamanho macro a uma nanoestrutura (por exemplo, nanocristais a partir de polissacarídeos). Muitas técnicas para a produção de materiais nanoestruturados usam uma combinação de ambas as abordagens, onde uma abordagem produz nanopartículas que, em seguida são montados formando compósitos, filmes e/ou macroestruturas hierárquicas por diferentes tipos de interações (NOAH, 2020).

Recentemente, nanoestruturas hierárquicas compostas por diferentes arquiteturas e múltiplos constituintes têm despertado grande interesse na área de biomateriais. Essas estruturas podem ser construídas em blocos a partir de uma nanoescala e estendidos em mais de uma dimensão usando múltiplos componentes. O uso de dimensões estendidas (2D e 3D) fornece uma elevada área superficial e um maior arranjo ordenado do material. Além disso, diferentes combinações de nanoestruturas podem levar a múltiplas funcionalidades proporcionando uma melhor aplicabilidade e especificidade do biomaterial (REN et al., 2013).

Os nanomateriais e biocompósitos podem ser produzidos a partir de vários tipos de materiais orgânicos (por exemplo, polissacarídeos, lipídios e proteínas) e materiais inorgânicos (por exemplo, sílica, metais, argilas, grafeno). O uso de compósitos e scaffolds produzidos a partir de biopolímeros (para implantes e suportes em engenharia de tecidos, aplicações odontológicas, cicatrização de feridas e medicina regenerativa) oferece na maioria dos casos perspectivas limitadas em relação às propriedades mecânicas e suas aplicações (MALIK; MUHAMMAD; WAHEED, 2023). No entanto, essas propriedades podem ser melhoradas quando combinadas com nanomateriais inorgânicos para formar compósitos híbridos com propriedades mecânicas e químicas melhoradas (SOLANGI et al., 2023). Além da melhoria da resistência e das propriedades físicas, os biomateriais necessitam possuir características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, além de possuir uma baixa imunogenicidade.

Dentre os biopolímeros, os polissacarídeos podem ser utilizados como matriz polimérica para o desenvolvimento de nanopartículas, nanocompósitos e outros sistemas nanoestruturados. Essas macromoléculas são compostas por unidades de monossacarídeos glicosídicos de origem natural (plantas, animais e microrganismos) e apresentam propriedades como baixa imunogenicidade e biocompatibilidade. Essas propriedades tornam os nanomateriais à base de polissacarídeos opções atraentes para aplicações farmacêuticas e nanomédicas (AYED et al., 2020). Parte do interesse no uso de polissacarídeos em nanotecnologia (aplicada nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética) reside na relativa abundância desses materiais na natureza, além de sua fácil obtenção, baixo custo, atoxicidade e biodegradabilidade (WEI; CAI; TIAN, 2018). Os polissacarídeos também possuem propriedades de formação de filmes e propriedades gelificantes que proporcionam uma ação emulsificante e estabilizante de sistemas coloidais. Além disso, é possível realizar diversas modificações químicas, que conferem uma maior versatilidade e ampliação das aplicações farmacêuticas.

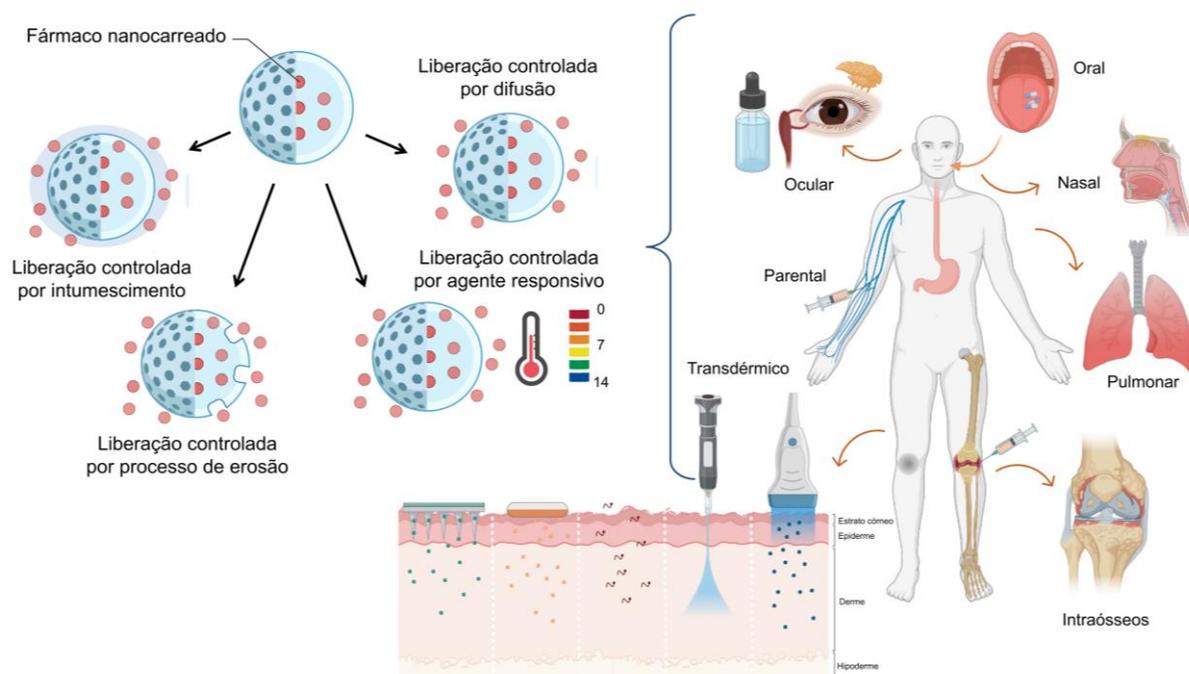
### ***2.1.1 Mecanismo de liberação controlada de fármacos através de biomateriais nanoestruturados***

Os fármacos podem ser liberados de forma controlada a partir de sistemas poliméricos do tipo matricial ou reservatório onde basicamente os mecanismos de intumescimento, erosão e difusão estão envolvidos. No sistema reservatório o fármaco é envolto por um revestimento polimérico, enquanto que no sistema matricial o fármaco é disperso uniformemente na matriz polimérica. A predominância de um destes mecanismos depende invariavelmente das propriedades do polímero utilizado no sistema. De forma geral, quando as estruturas poliméricas entram em contato com o meio de dissolução (ou fluido biológico) sua estrutura é mantida parcialmente íntegra ao longo do processo de dissolução do fármaco ou sofrem intumescimento e posteriormente erosão da estrutura polimérica. Em ambos os casos, o processo de difusão ocorre seguindo um gradiente de concentração. No processo erosivo, o controle de liberação ocorre através da degradação da matriz, sendo a taxa de liberação dependente da escolha da matriz polimérica e de sua solubilidade (BRUSCHI, 2015). A eficácia desses sistemas de liberação controlada está relacionada ainda com o tipo de material estrutural, com a velocidade de degradação da matriz polimérica, com a cinética de liberação e com os mecanismos envolvidos no controle da liberação. Outras estratégias para liberação de fármacos consistem em utilizar estímulos como alterações no pH, temperatura, uso de enzimas, reações redox, entre outros, para ativar a liberação do fármaco no meio desejado (FANG et al., 2023).

Os nanossistemas para liberação de fármacos podem ainda ser divididos em sistemas de entrega ativa e passiva. Na liberação ativa de fármacos, os nanossistemas são direcionados para o local alvo da ação terapêutica por meio de diferentes estratégias, tais como por meio de moléculas alvo (biomarcadores), magnetismo, ultrassom, ou através de alterações de pH e de temperatura. Na liberação passiva o fármaco depende principalmente de uma alta permeabilidade, tamanho reduzido das partículas, características adequadas de superfície e da solubilidade do fármaco para se atingir o alvo terapêutico (BHARATHI et al. 2022; FANG et al., 2023; MALIK; MUHAMMAD; WAHEED, 2023). Diante disso, a nanotecnologia oferece algumas possibilidades para melhorar a entrega controlada assim como aumentar a biodisponibilidade de moléculas bioativas de acordo com o mecanismo de liberação esquematizado na Figura 2. Os desafios dos biomateriais na nanomedicina consistem na possibilidade de biomimetizar e modular as propriedades de superfície de nanossistemas impulsionando o direcionamento, carreamento e liberação controlada de fármacos com maior eficácia e especificidade ao alvo (BHARATHI et al. 2022; MOZAFARINIA et al., 2021;

SOUSA et al., 2021).

Figura 2 – Principais vias de administração e mecanismos de liberação de fármacos em materiais nanoestruturados.



Fonte: Adaptado de Bharathi et al (2022) utilizando Biorender.

O uso de sistemas poliméricos de carreamento e liberação de fármacos baseados em polissacarídeos, apresenta vantagens adicionais para biomateriais nanoestruturados devido a versatilidade no transporte de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos, possibilidade de funcionalização da superfície de nanoestruturas e de cadeias poliméricas. Essas modificações químicas podem ajudar na modulação de propriedades físico-químicas e reológicas das formulações de liberação controlada. Além disso, biomateriais nanoestruturados podem oferecer meios estratégicos de entrega de genes e anticorpos em abordagens inovadoras como a imunoterapia, voltada para doenças como o câncer, ou ainda o desenvolvimento de novos métodos de entrega, como pulverizações nasais, adesivos com microagulhas, nanossistemas magnéticos entre outros (MALIK; MUHAMMAD; WAHEED, 2023). A entrega de fármacos por meio de nanopartículas e outros sistemas hierarquicamente nanoestruturados pode revolucionar o tratamento, diagnóstico e prevenção de diversas doenças de alta complexidade em um futuro relativamente próximo.

### 2.1.2 Biomateriais à base de sílica

Biomateriais a base de sílica constituem uma classe de materiais que combinam as propriedades únicas da sílica com a biocompatibilidade e funcionalidade de biomoléculas. Os materiais a base de sílica são sintetizados usando uma variedade de métodos, incluindo síntese sol-gel, uso de *biotemplates* e ainda síntese por microfluidos. O método de *biotemplate* usa biomoléculas e bioestruturas (por exemplo, proteínas, DNA ou células) como *template* para direcionar a formação de estruturas a base de sílica que mimetizam a arquitetura complexa de tecidos e órgãos. Enquanto a técnica por microfluidos manipula fluidos a partir de reagentes precursores, em uma micro e nanoescala para promover um controle preciso sobre tamanho, forma e composição de materiais à base de sílica (HAO; NIE; ZHANG, 2019; PAL; LEE; CHO, 2020). A preparação desses materiais pode ser realizada por síntese sol-gel (hidrólise de silicatos e processos de condensação) sendo um método amplamente investigado e com estrutura básica facilmente obtida usando diferentes agentes silanos, tais como o tetraetoxissilano, 3-aminopropil trietoxissilano e 3-mercaptopropil trietoxissilano. E a partir desses precursores com diferentes grupos funcionais acoplados pode-se ajustar propriedades e funcionalidades dos materiais produzidos (BEAUMONT et al., 2022; PAL; LEE; CHO, 2020). Materiais sólidos e porosos a base de sílica com características avançadas, tais como alta estabilidade térmica, resistência mecânica e possibilidade de funcionalização da superfície são atraentes para aplicações biomédicas (biossensores, carreamento de fármacos e ação teranóstica) (BEAGAN et al. 2020).

Outro meio de síntese consiste no uso de surfactantes como *templates*. Em solução, a automontagem das moléculas de surfactante orgânicos sob condições alcalinas ou ácidas ocorre em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC). Os precursores de sílica inorgânica são hidrolisados e se organizam em torno das micelas moldes para formar compósitos de sílica orgânico-inorgânica. Dependendo do tipo de *template*, os compósitos assumem um arranjo ordenado cúbico ou hexagonal (PAL; LEE; CHO, 2020). Na etapa subsequente de síntese, o tensoativo é removido através de calcinação ou extração por solvente, levando a formação de microporos e mesoporos com diâmetro específico. Materiais ordenados de sílica mesoporosa (MSM) tem sido amplamente aplicados em sistemas de liberação de fármacos (MOHAMED; ELMOTASEM; SALAMA, 2020; SKWIRA et al., 2023). A estrutura ordenada, o volume e o tamanho dos poros, bem como a elevada área superficial, resultam na alta capacidade de adsorção por nanopartículas de sílica mesoporosa (NSM). No entanto, o perfil de liberação do fármaco em NSM é caracterizado por uma rápida liberação inicial

relacionada à dissolução da porção do fármaco localizado próxima às entradas dos poros. Algumas técnicas permitem que o perfil cinético de liberação seja modificado através da funcionalização superficial e mistura em matrizes poliméricas (MOHAMED; ELMOTASEM; SALAMA, 2020; PAL et al., 2020; SKWIRA et al., 2023).

Além das nanopartículas de sílica micro e mesoporosa, nanopartículas ocas de sílica mesoporosa (NOSM) têm sido utilizadas como nanocarreadores promissores, principalmente devido às suas vantagens como elevada área superficial e volume de poros que possibilitam uma alta capacidade de carregamento de fármacos (LI et al., 2019). Parte dessas vantagens devem-se à presença de uma cavidade oca central que pode atuar como armazenamento, enquanto a casca mesoporosa fornece vias estreitas para o transporte do fármaco, favorecendo a liberação lenta e sustentada. As NOSM são nanocarreadores promissores para melhorar a biodisponibilidade de fármacos hidrofílicos e lipofílicos por técnicas de adsorção melhorada combinados ou não com matrizes poliméricas (BEAGAN et al. 2020; DAI et al., 2016; LI et al., 2019).

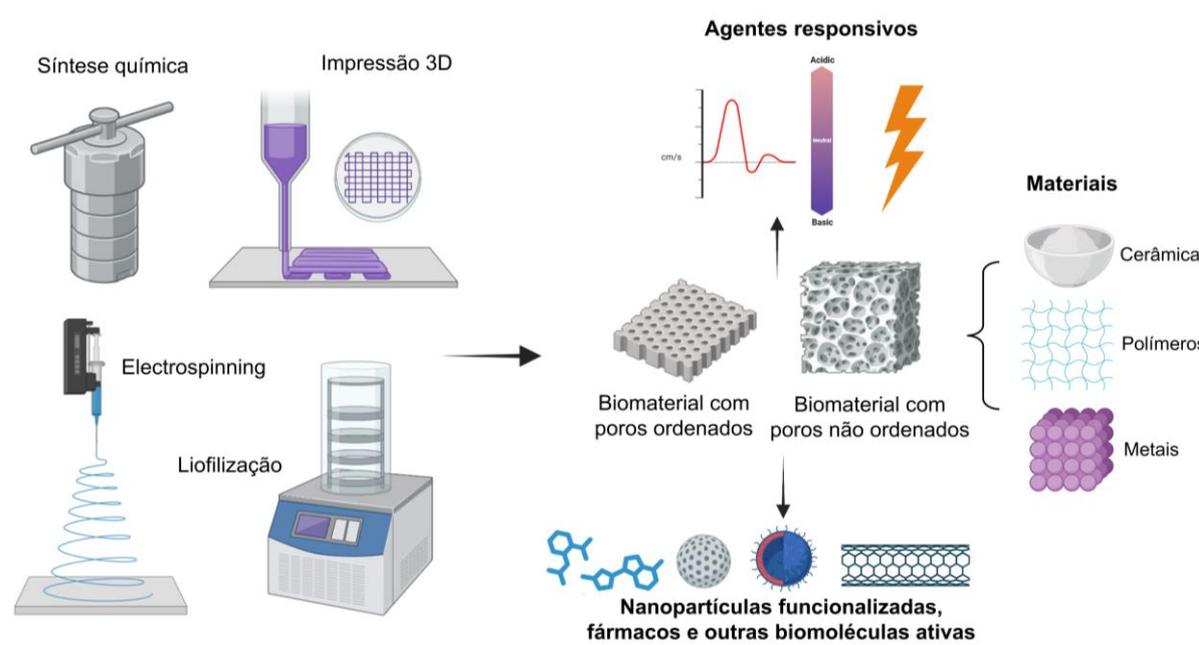
### ***2.1.3 Scaffolds e biocompósitos para liberação de fármacos***

Uma grande variedade de métodos está disponível para a fabricação de *scaffolds* e outros biosuportes, incluindo técnicas de processamento mais tradicionais para compósitos porosos como extrusão, moldagem, produção de esponjas, separação de fases, lixiviação, bem como abordagens como eletropulverização e impressão 3D (FIGURA 3). A preparação de *scaffolds* por liofilização é muito vantajosa quando biomoléculas sensíveis ao calor são incorporadas à matriz polimérica dos scaffolds, pois altas temperaturas podem levar à redução ou perda total de sua atividade biológica (ABDELAZIZ et al., 2023; BHARATHI et al., 2022). Existe uma ampla variedade de polímeros e materiais biocompatíveis, bem como técnicas de funcionalização (por exemplo, inclusão de nanopartículas, bioativos, nanomateriais, agentes estimulantes, reticulação química e física) que podem ser usadas no desenvolvimento de *scaffolds*. A seleção do material e a funcionalização a ser realizada determinam as propriedades mecânicas, físicas e biológicas do produto final, além de ditar o uso de técnicas específicas no preparo (ABDELAZIZ et al., 2023; COLLINS et al., 2021; JODATI; YILMAZ; EVIS, 2020).

O desenvolvimento de biomateriais à base de matéria-prima de origem natural atóxica tem sido foco de estudo de muitos pesquisadores nos últimos anos. Compósitos e outros biomateriais tridimensionais também podem atuar como substitutos teciduais temporários, como a pele, especialmente no manejo de feridas (ZIELIŃSKA et al., 2023). Os biomateriais tridimensionais para aplicações biomédicas precisam ser biocompatíveis e atóxicos, ter

resistência mecânica adequada, ter química de superfície que favoreça a adesão e proliferação celular e mimetizar a morfologia da matriz extracelular (BHARATHI et al., 2022). Além disso, a existência de poros uniformes e interconectados facilita a infiltração celular, a vascularização e o transporte de nutrientes. Geometrias porosas hierárquicas contribuem com melhores propriedades biológicas para o uso em medicina regenerativa (COLLINS et al., 2021).

Figura 3 – Síntese e composição de *scaffolds* para aplicações biomédicas.



Fonte: Adaptado de Jodati, Yilmaz e Evis (2020) utilizando Biorender.

Considerando o tamanho médio dos poros, os *scaffolds* são classificados em macroporosos ( $>100\ \mu\text{m}$ ), microporosos ( $<10\ \mu\text{m}$ ) e mesoporosos ( $<100\ \text{nm}$ ). Normalmente, o tamanho ideal dos poros para *scaffolds* está na faixa de 100 a 900  $\mu\text{m}$ . Os macroporos ( $\geq 300\ \mu\text{m}$ ) favorecem a vascularização, o crescimento celular e facilitam o transporte de nutrientes e oxigênio (ABDELAZIZ et al., 2023; COLLINS et al., 2021). Quanto ao tipo de geometria, os *scaffolds* podem ser hidrogéis (rede polimérica tridimensional interligada ou não covalentemente), fibrosos (rede de nanofibras com alta biomimetização), porosos ou esponjas (alto grau de poros interconectados) e microesferas (aplicados principalmente como carreadores de biomoléculas e medicamentos). Além disso, em termos de composição, podem ser classificados em poliméricos, cerâmicos bioativos, compósitos (dois ou mais materiais orgânicos ou inorgânicos diferentes) (ABDELAZIZ et al., 2023; ZIELIŃSKA et al., 2023).

Sistemas 3D baseados em biopolímeros como filmes, compósitos, aerogéis e *scaffolds* têm sido propostos como plataformas para incorporação de fármacos de liberação controlada ou prolongada, o que garante que a dosagem permaneça dentro da faixa terapêutica por um

maior tempo, além de proporcionar um tratamento mais confortável e funcional de tecidos corporais (ZIELIŃSKA et al., 2023). Os biopolímeros mais comumente usados para síntese de *scaffolds* são proteínas (por exemplo, colágenos e gelatina) e polissacarídeos (por exemplo, quitosana e alginato). Diferentes estratégias de reticulação ou modificações químicas são frequentemente empregadas para melhorar as propriedades físicas e mecânicas de *scaffolds*, bem como ampliar aplicações biológicas. O processo de reticulação física ou química pode ser realizado durante as etapas de processamento ou pós processamento. A reticulação física depende de interações moleculares entre grupos funcionais na cadeia polimérica, como o uso de íons divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Sr}^{2+}$ ) para reticular polímeros com grupos carboxilatos ( $-\text{COO}^-$ ) ou outros grupos carregados negativamente. Na reticulação química, formam-se ligações covalentes entre cadeias poliméricas por meio de agentes de acoplamento que reagem com grupos funcionais presentes em polímeros como os grupos carboxila ( $-\text{COOH}$ ), hidroxila ( $-\text{OH}$ ) e amina ( $-\text{NH}_2$ ) (BHARATHI et al., 2022; COLLINS et al., 2021; JODATI; YILMAZ; EVIS, 2020).

Vários estudos recentes têm utilizado essas macromoléculas como matrizes de filme, compósitos e *scaffolds* para incorporar fármacos e outros bioativos com ações cicatrizantes, anti-inflamatórias, regenerativas e até mesmo anticancerígenas (ZIELIŃSKA et al., 2023). Compósitos e *scaffolds* podem ser preparados utilizando praticamente qualquer tipo de material biocompatível (metais, cerâmicas, polímeros) e suas combinações. Estes materiais inorgânicos podem melhorar a funcionalidade de matrizes poliméricas, modulando propriedades mecânicas e físico-químicas exclusivas. No entanto, para estruturas biomédicas, os biopolímeros são particularmente atraentes devido às suas propriedades de biodegradação, imunogenicidade, facilidade de processamento e biocompatibilidade, que melhoram a qualidade da regeneração e reduzem o risco de prolongamento de processos inflamatórios (LI et al., 2022).

Os *scaffolds* podem fornecer plataformas para a entrega e liberação prolongada de medicamentos e outras moléculas com potencial terapêutico para determinadas doenças que afetam pele, ossos, cartilagens, artérias, nervos, entre outras. A liberação convencional de fármacos tem alguns impactos negativos relacionados à não manutenção da concentração do fármaco na zona terapêutica, além de afetar órgãos e tecidos saudáveis. O uso de *scaffolds* porosos com alta compatibilidade e bioatividade com o organismo pode ser uma opção promissora para o transporte e liberação de fármacos, aliado a uma estrutura que favoreça a adesão e o crescimento celular. A cinética de liberação de fármaco em *scaffolds* é um ponto fundamental para essa aplicação, pois o ideal é que ocorra uma liberação constante por um período prolongado. E assim, a afinidade da droga com o *scaffold* é outro ponto importante a

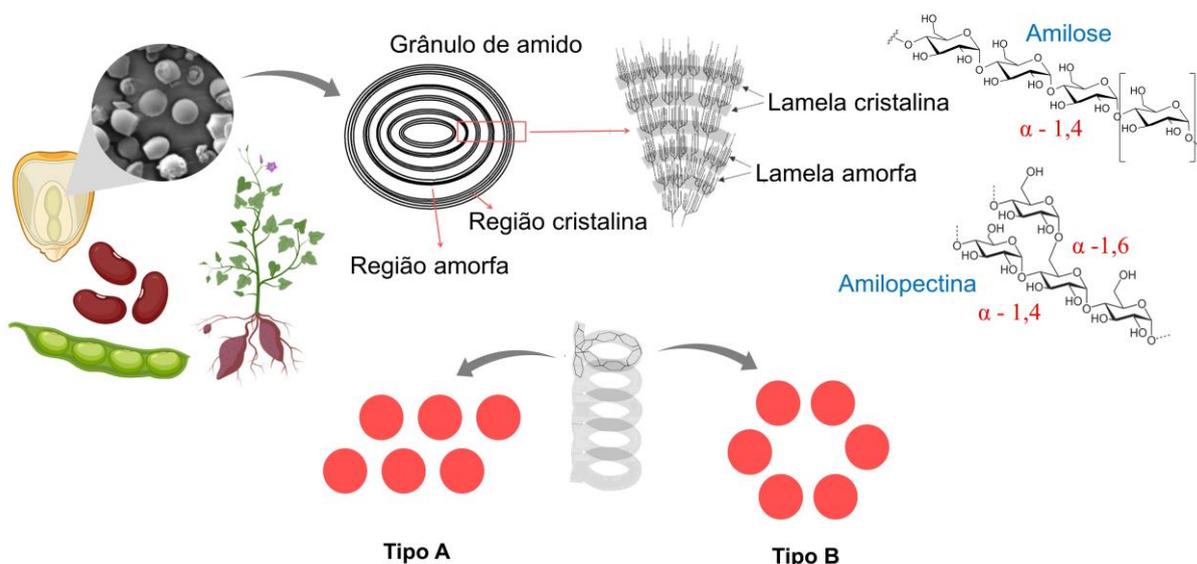
ser levado em consideração. Uma alta afinidade entre fármaco e matriz polimérica pode favorecer a não liberação, enquanto uma baixa afinidade pode resultar em liberação precoce e uma alta quantidade do fármaco. Ambas as situações são desfavoráveis ao organismo receptor. Além disso, os fármacos devem ser quimicamente estáveis e exibir atividade biológica durante todo o tempo de liberação (rápida, sustentada ou sequencial) (YANG et al., 2022; ZIELIŃSKA et al., 2023).

## 2.2 Polissacarídeos

### 2.2.1 Amido

O amido é o polissacarídeo de armazenamento mais abundante em plantas, facilmente renovável, biodegradável, atóxico e biocompatível (WANG et al., 2020). O amido é produzido durante a fotossíntese como grânulos semicristalinos que variam em diâmetro de 1 a 100  $\mu\text{m}$ . Os grânulos de amido são estruturados hierarquicamente em cristais concêntricos alternados juntamente com camadas amorfas (LE CORRE; BRAS; DUFRESNE, 2010). Essa macromolécula é um complexo formado por unidades de glicose, contendo principalmente os polímeros amilose e amilopectina compondo diferentes regiões cristalinas e amorfas do grânulo (FIGURA 4).

Figura 4 – Esquema que representa os grânulos de amido, regiões amorfas e cristalinas e constituintes principais.



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

A amilose é um polissacarídeo linear de ligações  $\alpha(1-4)$  glicosídicas, enquanto a amilopectina é altamente ramificada, com 5-6% das posições de  $\alpha(1-6)$  em intervalos de 10 nm ao longo do eixo das cadeias de glicose (ODENIYI et al., 2018; PINTO et al., 2021). A proporção de amilose e amilopectina varia de acordo com a fonte botânica e está diretamente relacionada a propriedades como grau de cristalinidade, temperatura de gelatinização, retrogradação e transição vítrea (ODENIYI et al. 2018). Modificações químicas na cadeia do amido permitem maior diversificação das aplicações desses polissacarídeos (TORRES; DE-LA-TORRE, 2022).

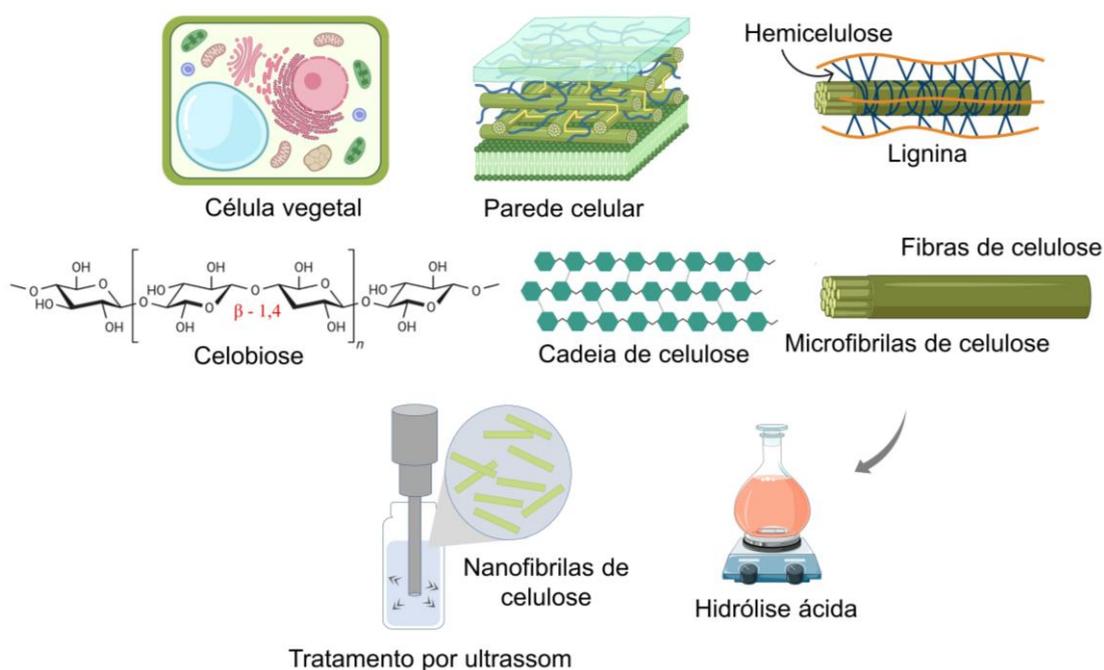
Os grânulos de amido exibem diferentes padrões de cristalinidade, determinados por difração de raios X, chamados polimorfos A (padrão observado em cereais), B (padrão observado em tubérculos e raízes) e C (vegetais e frutas). O polimorfo do tipo A consiste em uma unidade monocíclica cristalina altamente condensada de amilopectina, o tipo B tem unidades de cadeia básicas embaladas em um arranjo hexagonal, e o polimorfo do tipo C é uma estrutura sobreposta dos padrões A e B e pode ser encontrado em certos vegetais, frutas e raízes (HOYOS-LEYVA et al., 2017; LOURDIN et al., 2015; SILVA et al., 2019). Nanopartículas de amido com maior grau de cristalinidade (nanocristais) podem ser obtidas a partir da hidrólise ácida que remove a parte amorfa (mais suscetível ao processo de hidrólise) dos grânulos nativos (VELÁSQUEZ-CASTILLO et al., 2020).

### **2.2.2 Celulose**

As fibras naturais têm uma composição e estrutura complexas, e suas características diferem das partes das plantas das quais são obtidas. As fibras vegetais são compósitos naturais formados por nanofibrilas de celulose reforçadas em uma matriz amorfa de hemicelulose e lignina, conforme ilustrado na Figura 5 (NORONHA et al., 2021). A celulose é um dos principais constituintes das fibras naturais, sendo o biopolímero mais abundante na superfície terrestre. As fibras celulósicas ou lignocelulósicas exibem propriedades mecânicas, térmicas e físicas distintas dependendo da cristalinidade da fração de celulose (GONG et al, 2017). Fibras de celulose com alta cristalinidade (forma de bastão ou nanofibrila) podem ser obtidas por técnicas que removem as regiões amorfas sob severas condições de hidrólise ácida (FIGURA 5). Os principais ácidos fortes utilizados na hidrólise de fibras naturais são o ácido sulfúrico, o ácido clorídrico e o ácido fosfórico. Aliado a isso, técnicas de ultrassom também podem ser utilizadas para a preparação de nanomateriais de celulose compostos por regiões amorfas e cristalinas com diâmetros inferiores a 100 nm e comprimentos de até 500 nm (MARCHETTI et al., 2020; NORONHA et al., 2021; SOUZA et al., 2019).

A celulose é um biopolímero composto por unidades de glicose com ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  que compõem a parede celular das plantas e estão fisicamente ligadas à lignina e hemicelulose (MARCHETTI et al., 2020). A celulose possui quatro polímeros principais denominados celulose I (nativa), II, III e IV. A celulose II é o polímero regenerado, após tratamento com hidróxido de sódio, a qual é considerada o polímero mais estável e cristalino. A celulose III é obtida a partir do tratamento da celulose I e II com amônia. E por fim, a celulose IV surge através da modificação da celulose III (FRENCH 2014; JIN et al., 2016). Os nanomateriais de celulose ou nanocelulose (NC) consistem em fibrilas de celulose em tamanho nanométrico e com diâmetro entre 5 a 50 nm e comprimento de até 2  $\mu\text{m}$ . As NCs com alta cristalinidade são chamados de nanocristais e são altamente ordenados e ricos em ligações de hidrogênio entre cadeias, que oferecem alta rigidez e boa resistência mecânica para serem utilizados como reforço em matrizes poliméricas (JIN et al., 2016; SILVA et al., 2019). De modo geral, materiais nanocelulósicos têm sido empregados em diversas áreas da ciência de materiais para melhorar propriedades como viscosidade, tensão de cisalhamento, limite de escoamento, módulo de elasticidade e propriedades elásticas e de barreira de compósitos poliméricos. As propriedades mecânicas da nanocelulose dependem de muitos fatores, como a maturidade da planta, os processos de aquisição e o processo químico ou mecânico usado para isolar a nanocelulose (SILVA et al., 2019).

Figura 5 – Esquema que representa a obtenção de nanofibrilas de celulose a partir de fibras de celulose e fibrilas.



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

Atualmente, há uma tendência crescente para o uso de materiais celulósicos nanométricos em várias áreas devido à sua alta uniformidade de morfologia cristalina, grande área superficial e propriedades mecânicas aprimoradas. A celulose e seus nano derivados (nanocristais e nanofibrilas), ao longo dos últimos anos, também têm chamado a atenção para aplicações nanomédicas na engenharia de materiais por serem materiais biodegradáveis, atóxicos, renováveis e biocompatíveis (SOUZA et al., 2019; TAHER et al., 2020). Esses nanomateriais à base de celulose também são amplamente utilizados como agentes de reforço em compósitos (nos quais a orientação da fibra melhoraria as propriedades mecânicas, térmicas e de barreira à água do compósito) aplicados em diversas áreas (por exemplo, farmacêutica e alimentícia). Dentro da nanomedicina, esses nanomateriais celulósicos têm sido amplamente utilizados em aplicações para regeneração de tecidos e em processos de biocurativos (JABBARI; BABAEIPOUR; BAKHTIARI, 2022; TAHER et al., 2020).

### ***2.2.3 Funcionalização de polissacarídeos***

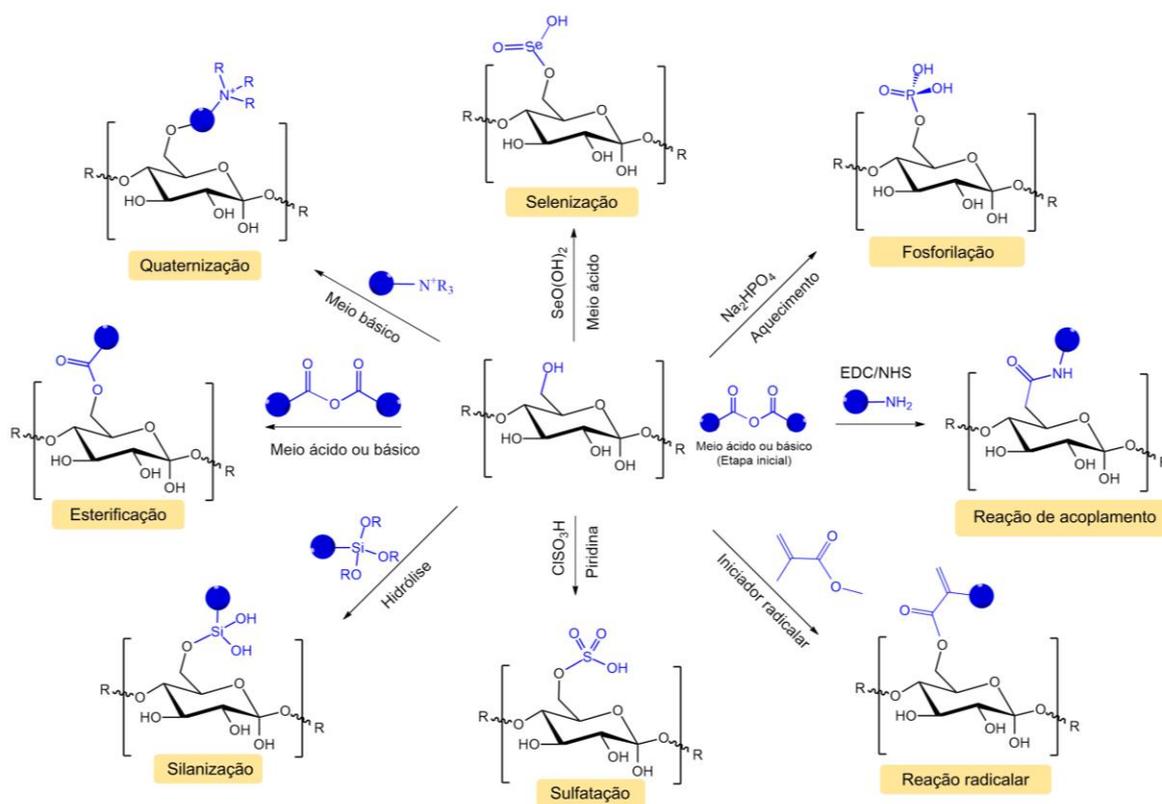
A modificação química de polissacarídeos é uma estratégia utilizada para melhorar as propriedades físico-químicas e propiciar uma bioatividade específica (liberação de fármacos, engenharia de tecidos, cicatrização de feridas e outras aplicações biomédicas) desses biopolímeros. Polissacarídeos, incluindo quitina, quitosana, amido, celulose, ácido hialurônico e alginato, são biomoléculas valiosas em aplicações biomédicas devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, imunogenicidade e baixa toxicidade (LUO et al., 2021; TUDU; SAMANTA, 2023). No entanto, as propriedades nativas desses polissacarídeos muitas vezes possuem limitações e requerem modificações para alcançar funcionalidades específicas (WANG et al., 2018). A modificação química inclui mudanças nos grupos funcionais nativos e grafitação de novos grupos funcionais ou outras moléculas, regulação da massa molecular, modificações na hidrofílicidade e hidrofobicidade e ligações cruzadas entre cadeias do mesmo polissacarídeo ou entre diferentes cadeias poliméricas. Estudos recentes sugerem que polissacarídeos quimicamente modificados apresentaram inibição da proliferação de células cancerígenas, aumento da imunidade, além de ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antidiabético e de eliminação de radicais livres (LUO et al., 2021; XIE et al., 2020; ZHANG; LAN; XIE, 2022).

O método a ser adotado para a modificação depende dos grupos funcionais existentes no polissacarídeo e quais novos grupos funcionais ou moléculas devem ser inseridos. Os polissacarídeos possuem cadeias ricas em hidroxilas, sendo considerados quimicamente estáveis e, portanto, menos propensos a reações de modificação direta. Além disso, as cadeias

polissacarídicas são estericamente pouco disponíveis, o que também contribui para baixos graus de substituição. Melhorar a reatividade de grupos hidroxila ou introduzir grupos funcionais mais reativos pode ampliar a aplicação biológica de diversos polissacarídeos (DESBRIERES et al., 2018; GARCIA-VALDEZ; CHAMPAGNE; CUNNINGHAM, 2018; ZHANG; LAN; XIE, 2022). Grupos carboxila, amino, hidroxilas primárias, aldeídicos e outros grupos conjugados em polissacarídeos fornecem alta reatividade química para funcionalização, enquanto amidas e ésteres só são favoráveis sob condições específicas. Estes últimos são interessantes para uso em sistemas de carreamento e liberação controlada de fármacos (GARCIA-VALDEZ; CHAMPAGNE; CUNNINGHAM, 2018; LUO et al., 2021; XIE et al., 2020).

Os métodos de modificação mais comuns para polissacarídeos estão esquematizados na Figura 6, consistindo em processos de oxidação, sulfatação, carboximetilação, esterificação, fosforilação, selenização, amidação, silanação, *click chemistry* (reações modulares que seguem os princípios da química verde), polimerização via radical, bem como a inserção de cargas positivas por meio de grupos catiônicos (FIORITO et al., 2018; GARCIA-VALDEZ; CHAMPAGNE; CUNNINGHAM, 2018; WANG et al., 2018; LUO et al., 2021).

Figura 6 – Algumas modificações químicas realizadas em polissacarídeos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Polissacarídeos carregados positivamente têm maior interação com a interface da parede celular bacteriana (carregados negativamente), promovendo assim, atividade antibacteriana. Esta atividade é possível pela interferência com a parede celular ou síntese da membrana por grupos funcionais carregados positivamente. Esses grupos funcionais combinam-se com o DNA e interferem na replicação e transcrição do DNA, impedindo assim a síntese de mRNA e proteínas. As propriedades antibacterianas da quitosana podem ser explicadas pela presença de grupos amino que protonam-se em meio ácido, apresentando carga positiva ( $-NR_3^+$ ) (ZHANG; LAN; XIE, 2022).

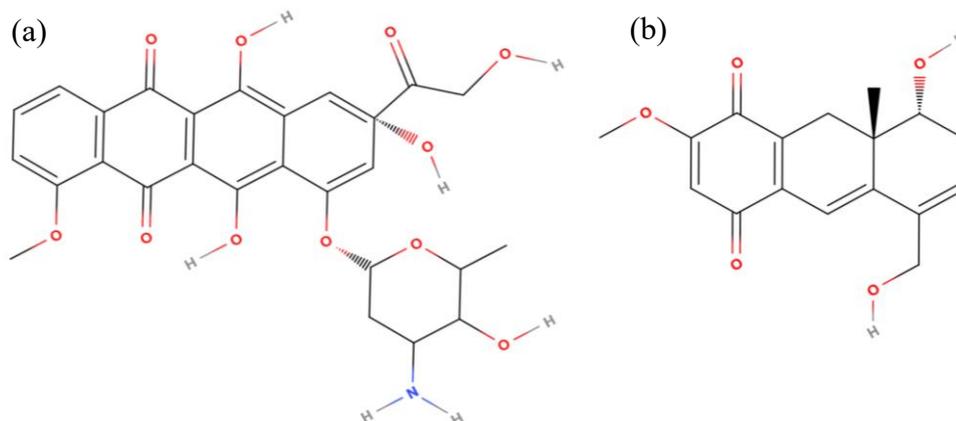
Assim, a modificação de polissacarídeos representa uma área crescente de pesquisa com vasto potencial para aplicação em nanomedicina. As propriedades e potenciais aplicações dos polissacarídeos modificados são determinadas pela escolha da molécula ou polímero graftizado, pelos grupos funcionais inseridos e pela massa molecular ou composição do produto final. Avanços contínuos provavelmente impactarão positivamente no uso de polissacarídeos para a preparação de compósitos, *scaffolds* e nanoestruturas para a liberação controlada de fármacos, anticorpos e genes, regeneração tecidual e outras aplicações terapêuticas diversas. Os polissacarídeos graftizados são comumente anfifílicos, facilitando a formação de estruturas automontáveis nas escalas macro, micro e nano (DESBRIERES et al., 2018; GARCIA-VALDEZ; CHAMPAGNE; CUNNINGHAM, 2018).

## 2.3 Bioativos anticâncer

### 2.3.1 *Oncocalixona A*

A oncocalexona A (OncoA) é uma quinona isolada do caule da planta *Auxemma oncocalyx* (Allem) Taub., sendo o composto majoritário nos extratos etanólicos (cerca de 80% de OncoA na fração hidrossolúvel do extrato). *A. oncocalyx* é uma planta endêmica do bioma da Caatinga, predominante no semiárido brasileiro e ainda pouco explorada economicamente (FERREIRA et al., 2023; SOUSA et al., 2021). A OncoA tem efeitos biológicos conhecidos, como atividade antioxidante, antiplaquetária, analgésica, anti-inflamatória e citotóxica contra algumas linhagens de células cancerígenas (CAVALCANTI et al., 2021; SILVA et al., 2020). A OncoA tem estrutura química semelhante à doxorrubicina (FIGURA 7), medicamento usado para tratamento de câncer, e tem relatado atividade antiproliferativa contra linhagens de câncer de pulmão, ovário e reto, além de glioblastoma, próstata, cólon, sarcomas e leucemia (CAVALCANTI et al., 2021; SOUSA et al., 2021).

Figura 7 – Estrutura química da (a) doxorubicina e da (b) oncoalyxone A.



Fonte: Elaborado pelo autor usando MolView<sup>®</sup>.

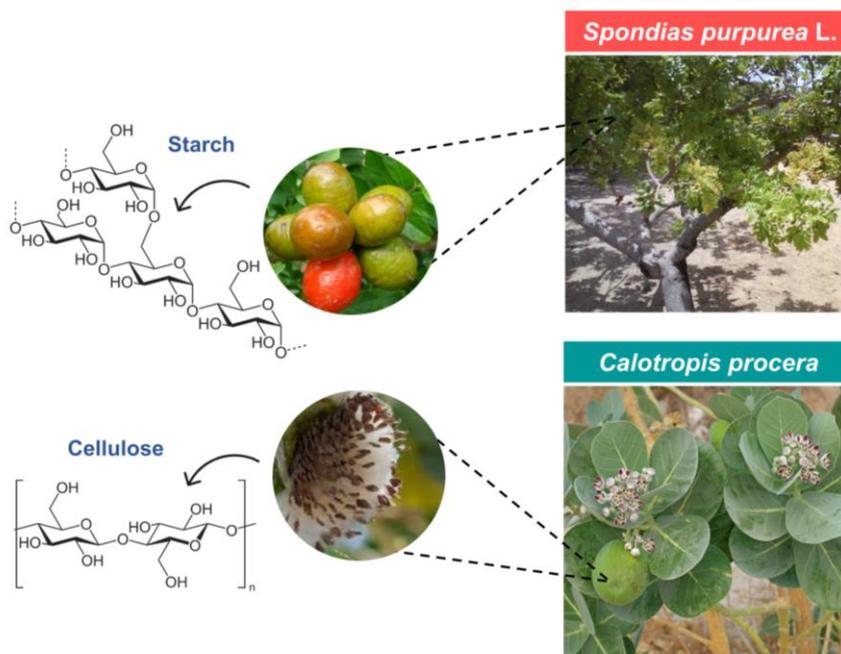
A OncoA apresenta reatividade frente ao DNA principalmente devido aos grupos carbonílicos eletrofílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados que podem interagir com bases nucleofílicas e apresentar comportamento aceptor de Michael em meio prótico. Além disso, a OncoA possui uma estrutura policíclica com um anel aromático plano que pode atuar como um agente intercalante de DNA, o que promove a inibição do crescimento celular. Esta propriedade é de grande interesse na pesquisa do tratamento contra o câncer (CAVALCANTI et al., 2021; COSTA et al, 2012; FERREIRA et al., 2023). Assim, o uso de nanossistemas para o carregamento e liberação controlada de OncoA poderia fornecer uma rota promissora para o tratamento direcionado de várias linhagens de câncer, bem como superar algumas limitações relatadas devido aos possíveis efeitos tóxicos que esse agente bioativo pode ter em alguns órgãos, como pulmões, rins e coração (CAVALCANTI et al., 2021; SOUSA et al., 2021).

#### **2.4 *Spondias purpurea* L. e *Calotropis procera* como biomassa de baixo valor agregado**

A bioeconomia está emergindo como uma alternativa promissora e ambientalmente amigável que utiliza recursos de base biológica (biomassa) como substitutos viáveis aos equivalentes de base fóssil para a produção de químicos e biomateriais. A biomassa pode ser tratada utilizando diversas técnicas biológicas, químicas e termoquímicas para produzir biomateriais e biomoléculas de alto valor agregado. Diversas espécies vegetais têm potencial para utilização econômica de sua biomassa e bioativos em uma ampla variedade de setores, desde alimentícios até energia, fármacos e também desenvolvimento de materiais avançados (MAHARI et al., 2022). No entanto, algumas espécies vegetais ainda são pouco exploradas e são consideradas de baixo valor agregado. Espécies não convencionais podem ter vantagens como não competir com espécies importantes para a dieta humana e também se adaptar melhor

a ambientes climáticos desafiadores (ESTRADA-LEÓN et al., 2016). No contexto regional brasileiro, as espécies *Spondias purpurea* L. e *Calotropis procera* podem fornecer opções para a produção de biomateriais de alto valor agregado a partir de uma biomassa não convencional (FIGURA 8). Além disso, essas espécies apresentam adaptações ao clima e ao solo regional que possibilitam o uso de recursos hídricos e insumos de forma eficiente e sustentável.

Figura 8 – Biomoléculas obtidas de *Spondias purpurea* L. e *Calotropis procera*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A ciriguela (*Spondias purpurea* L.) é uma árvore caducifólia pertencente à família Anacardiaceae, nativa da América Central e amplamente distribuída no semiárido do Nordeste do Brasil, além de outros países da América do Sul, bem como na África e Ásia, onde sua introdução foi mais recente (CANCINO-LABRA et al., 2023). Seus frutos possuem características sensoriais e nutricionais muito apreciadas com alto teor de polifenóis (SILVA et al., 2016). O fruto é uma drupa elipsoide climatérica, contendo apenas um caroço (predominantemente celulose), com epicarpo formado por polpa amarelada e uma pele fina amarelada ou avermelhada, rica em pectinas e com alto teor de polifenóis (VARGAS-SIMÓN, 2018). A polpa possui sabor amiláceo (contendo cerca de 15% de amido) em sua fase de pré-amadurecimento, antes de atingir seu estágio climatérico final (RODRIGUES et al., 2021).

*Calotropis procera* (ciumeira) é um arbusto lactífero e xerófito com flores perenes da família Apocynaceae, amplamente distribuído em regiões áridas e semiáridas da Ásia e África. No Brasil, é considerada uma espécie invasora (não nativa) e com fácil adaptação à região

Nordeste do Brasil com seu clima semiárido característico (GONÇALVES-OLIVEIRA; RODRIGUES; BENKO-ISEPPON, 2022; MALHAB et al., 2023). Pode tolerar, adaptar-se e manter a produtividade em condições severas como elevada aridez, salinidade, secas prolongadas e se desenvolve facilmente nos mais diversos tipos de solo (IQBAL; HAMEED; AHMAD, 2023). Esta espécie tem suas folhas cobertas por uma cera (o que ajuda a evitar a perda de umidade) e seus frutos possuem sementes cobertas por uma fibra branca e sedosa que favorece sua propagação pelo vento (anemocoria) (THAMER et al. 2022). Algumas pesquisas relatam atividades anti-inflamatórias, gastroprotetoras, antioxidantes, antifúngicas, anti-helmínticas e anticancerígenas de extratos preparados a partir de *C. procera* embora existam ainda poucas pesquisas publicadas para essa espécie (MALHAB et al., 2023).

## CAPÍTULO III

### 3. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* À BASE DE NANOFIBRILAS DE CELULOSE/AMIDO QUATERNIZADO E NANOESFERAS OCAS DE SÍLICA PARA LIBERAÇÃO LOCAL CONTROLADA DE ONCOCALIXONA A

#### 3.1 Introdução

Biomateriais nanoestruturados aplicados a engenharia e regeneração de tecidos são recursos promissores para o tratamento de feridas, produção de biocurativos, reparo de tecidos ósseos, e até no tratamento de doenças de alta complexidade como o câncer (JABBARI; BABAEIPOUR; BAKHTIARI, 2022). Os biomateriais podem estar na forma de hidrogéis, hidrocoloides, filmes, membranas, aerogéis, scaffolds e nanocompósitos (KAR et al., 2022). Além disso, os biomateriais podem ser utilizados como sistemas de carreamento e liberação de fármacos. Biomateriais a partir de matriz polimérica de fonte natural são vantajosos por suas características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e atoxicidade (SOUSA, et al., 2021). Polissacarídeos como amido, celulose, pectina, alginato, quitosana têm sido amplamente estudados como matéria-prima de biomateriais devido aos benefícios já citados, além do seu baixo custo de obtenção (CHALITANGKON; WONGKITTISIN; MONVISADE, 2020). Os polissacarídeos possuem grupos funcionais (por exemplo, grupos hidroxila, carboxilato ou amina) que podem ser usados em modificações químicas com o objetivo de melhorar as propriedades de biomateriais (QUELEMES et al., 2017). Esses polissacarídeos funcionalizados podem auxiliar nos mecanismos de cicatrização, combate de agentes patogênicos, apresentar resposta anti-inflamatória e auxiliar também na liberação ativa e passiva de fármacos (RAHBAR et al. 2020; LI et al., 2022).

Materiais porosos (micro, meso e macroporosos) são utilizados em compósitos para aplicações biomédicas (MENG et al., 2020). Os compósitos podem ser formados por compostos orgânicos e inorgânicos. Materiais inorgânicos também têm sido utilizados em conjunto com biomoléculas para melhorar características físico-químicas e também ampliar a aplicação biológica de biomateriais produzidos (SAWERES-ARGÜELLES et al., 2023). Materiais híbridos nanoestruturados podem conter nanopartículas metálicas (CHALITANGKON; WONGKITTISIN; MONVISADE, 2020), sílica (HECK et al., 2017) e argilas (MENEGUIN et al., 2021; MENG et al., 2020) na constituição da matriz estrutural do compósito. Esses compostos inorgânicos podem servir como agentes de adsorção e proteção de fármacos em sistemas de liberação controlada, agentes vetores de fármacos (por exemplo, nanopartículas

magnéticas) e também como agentes bactericidas (MENG et al., 2020; SOUSA, et al., 2021).

Estratégias de liberação controlada de fármacos utilizando polímeros biodegradáveis são geralmente preferíveis aos polímeros não biodegradáveis. Geralmente, os biomateriais biodegradáveis permanecem no organismo por algumas semanas, dependendo do processo de intumescimento, erosão e difusão do fármaco (HOPE et al., 2022). Estruturas à base de polissacarídeos podem ser opções atraentes devido à sua biodegradabilidade, bem como outras características como atoxicidade e biocompatibilidade (SUFU-MARAGHEH et al., 2020).

Polissacarídeos obtidos a partir de fontes vegetais alternativas são promissores devido à não competição de fontes vegetais alimentícias, além de possibilitar a valorização regional de biomassas pouco valorizadas transformando-as em materiais de alto valor agregado (ESTRADA-LEÓN et al., 2016). Nesse contexto, os espécimes *Spondias purpurea* L. e *Calotropis procera* são fontes de polissacarídeos não convencionais para obtenção de amido e nanocelulose, respectivamente. Ambas as espécies são pouco exploradas na região nordeste do Brasil, apesar de serem comuns e facilmente adaptadas ao clima e solo da região. *Calotropis procera* é uma espécie arbustiva lactífera pertencente à família Apocynaceae com folhas revestidas de cera e frutos contendo sementes com fibras sedosas brancas (THAMER et al. 2022). Esta planta é considerada uma espécie invasora e apresenta ampla disseminação e adaptações no território brasileiro e na América do Sul (GONÇALVES-OLIVEIRA; RODRIGUES; BENKO-ISEPPON, 2022). *Spondias purpurea* L. é uma árvore nativa da América Central e amplamente distribuída em toda a América do Sul, sendo comum na região nordeste brasileira. Esta planta possui frutos elipsóides com epicarpo e mesocarpo ricos em polifenóis e pectina em sua fase climatérica e ricas em amido em sua etapa pré-climatérica (VARGAS-SIMÓN, 2018).

A oncoalexona A (OncoA) é uma quinona isolada do caule da planta *Auxemma oncoalex* Taub. Essa planta é endêmica do bioma Caatinga, predominante no semiárido brasileiro e ainda pouco explorada economicamente (FERREIRA et al., 2023; SOUSA et al., 2021). A OncoA possui atividade antiproliferativa relatada contra várias linhagens de células cancerígenas, além de apresentar atividade antioxidante, antiplaquetária, analgésica, anti-inflamatória (CAVALCANTI et al., 2021; SILVA et al., 2020; SOUSA et al., 2021).

Portanto, a utilização comercial destas espécies pode representar uma fonte de bioprodutos de alto valor agregado. Além disso, há poucos estudos na literatura sobre o uso da biomassa de *C. procera* e *S. purpurea* L. no desenvolvimento de biomateriais direcionados principalmente à nanotecnologia. Assim torna-se essencial o desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados que utilizem matéria-prima biodegradável e que forneçam novas

funcionalidades e estratégias para o tratamento de doenças como o câncer. Dessa forma, o objetivo do presente estudo consiste em preparar e caracterizar *scaffolds* à base de celulose nanofibrilada (CNFCp) de *C. procera* reticulado com amido quaternizado (AQC) de *S. purpurea* L. Ainda, utilizar a matriz polimérica reticulada contendo nanoesferas ocas de sílica mesoporosa (NOSM) carregadas com oncocalixona A na forma de enxertos ósseos para liberação local controlada no tratamento de neoplasias ósseas. Além disso, espera-se obter um biomaterial porosos que possa ser utilizado em processos de regeneração tecidual.

### 3.2 Materiais e métodos

#### 3.2.1 Reagentes

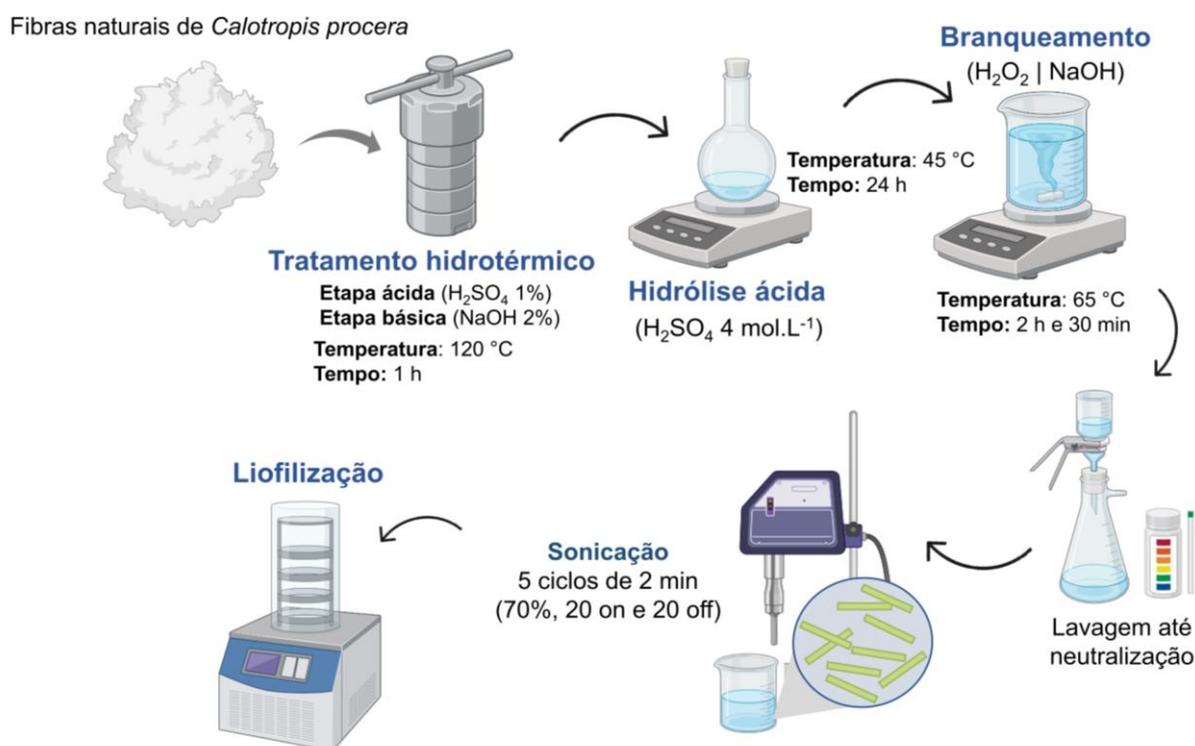
O agente de quaternização cloreto de (3-cloro-2-hidroxipropil)trimetilamônio (CHPTAC), *N,N'*-Metilenobisacrilamida (MBA), *N,N,N',N'*-Tetrametil-1,3-propanodiamina (TMPDA), tetraetil ortosilicato (TEOS) e álcool polivinílico (PVA) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Saint Louis, EUA). O brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi utilizado como *template* e foi adquirido da Vetec (Duque de Caixias, Brasil). Outros reagentes como ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido clorídrico (HCl), hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH) e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Synth (Diadema, Brasil). A água deionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q Millipore® Corporation (Watford, Reino Unido). As matérias-primas orgânicas (amido de *S. purpurea* L. e a celulose nanofibriladas de *C. procera*) foram isoladas segundo método de nosso grupo de pesquisa em Rodrigues et al. (2021). A oncocalixona A utilizada neste trabalho foi fornecida pelo Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Mediciniais II (LAFIPLAM II) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

#### 3.2.2 Celulose nanofibrilada de *Calotropis procera* (CNFCp)

A celulose nanofibrilada foi obtida a partir das fibras de *Calotropis procera* (FCp) por hidrólise ácida e tratamento por ultrassom conforme ilustrado na Figura 9. As FCp foram tratadas previamente por processo hidrotérmico em 2 etapas usando um reator autoclave de PTFE, de acordo com metodologia descrita por NORONHA et al. (2021). O primeiro tratamento hidrotérmico foi realizado em condições ácidas. Resumidamente, 1,0 g de FCp foi adicionado a 100 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v) e submetido à aquecimento a 120 °C em reator durante 60 min. Em seguida, as FCp tratadas com ácido foram lavadas com água destilada até pH neutro e secas em estufa. O segundo tratamento hidrotérmico foi realizado em 100 mL de NaOH 2% (m/v) nas mesmas condições aplicadas durante o tratamento ácido (120 °C

durante 60 min). Esta etapa inicial foi realizada com o objetivo de remover hemicelulose e lignina presente nas fibras naturais. O material obtido foi lavado até pH neutro e seco a 40°C. A CNFCp foi preparada utilizando hidrólise ácida e posterior sonicação. A hidrólise ácida das FCp foi realizada em solução de ácido sulfúrico 4,0 mol L<sup>-1</sup>. A solução ácida (100 mL) foi misturada lentamente com a amostra (1,0 g) em banho de gelo sob agitação por 20 min. Em seguida, a mistura foi aquecida a 40 °C e mantida sob agitação por 24 h. Ao final foi lavada com água destilada até pH neutro e seco em estufa a 40°C. Após, a amostra hidrolisada foi branqueada usando uma mistura de 40 mL de solução de NaOH a 4% juntamente com 12 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35%) sob gotejamento. A mistura foi aquecida a 65°C por 2,5 h. Em seguida, o material foi filtrado, lavado com água destilada até pH neutro e seco em estufa a 40 °C. A suspensão das fibras de celulose branqueada foi homogeneizada utilizando-se um dispersor Ultra Turrax (IKA T25, Alemanha) a 10.000 rpm por 10 min. Após, a suspensão das fibras foi sonicada, usando sonifier Modelo W-450D (Branson, EUA), em ciclos de 2 min (70% de amplitude) com 20s on/20s off até o total de 10 min. O rendimento da CNFCp foi determinado pelo teor de sólidos totais na suspensão final.

Figura 9 – Preparação de nanofibrilas de celulose a partir de fibras de *Calotropis procera*.



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

### 3.2.2.1 Caracterização da celulose nanofibrilada (CNFCp)

Os espectros de infravermelho das amostras foram obtidos em um espectrômetro Frontier FTIR/NIR (PerkinElmer, EUA) operando na região do infravermelho com transformada de Fourier. Os espectros foram adquiridos entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  usando resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As análises TGA das amostras foram obtidas com um STA 6000 (PerkinElmer, EUA) sob um fluxo de  $\text{N}_2$  de 40,0  $\text{mL min}^{-1}$  com uma taxa de aquecimento de 10  $^\circ\text{C min}^{-1}$  na faixa de 25 a 800  $^\circ\text{C}$ . A carga superficial das NFCCp foi avaliada pelo potencial  $\zeta$  usando um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido) a 25  $^\circ\text{C}$ .

A análise morfológica da celulose nanofibrilada foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de varredura por transmissão (MEVT). As micrografias das CNFCp foram obtidas por MEV em microscópio QUANTA FEG-FEI 450 (Oregon, EUA). As amostras foram previamente revestidas por uma camada de ouro de 20 nm usando um metalizador Quorum QT150ES, e examinadas usando uma tensão de aceleração de 10 kV e uma ampliação de até 100.000 $\times$ . As amostras foram examinadas também por MEVT usando um microscópio Tescan Vega 3 (Tescan, Brno, República Tcheca) a uma tensão de aceleração de 30 kV. Os diâmetros e comprimentos (média de 100 medidas) foram obtidos utilizando-se o software ImageJ<sup>®</sup>.

As análises de DRX foram realizadas usando um difratômetro PANalytical X'Pert PRO (Malvern, Reino Unido), usando radiação  $\text{Cu K}\alpha_1$  ( $\lambda = 0,154$  nm), operado a 40 kV e 40 mA, na faixa  $2\theta$  de 5 a 40 $^\circ$ . Os difratogramas foram deconvoluídos usando o software Origin 9.8. O índice de cristalinidade foi calculado a partir da razão entre a soma da área da região cristalina pela área total nos espectros DRX. Os tamanhos dos cristalitos foram estimados pela equação de Scherrer:

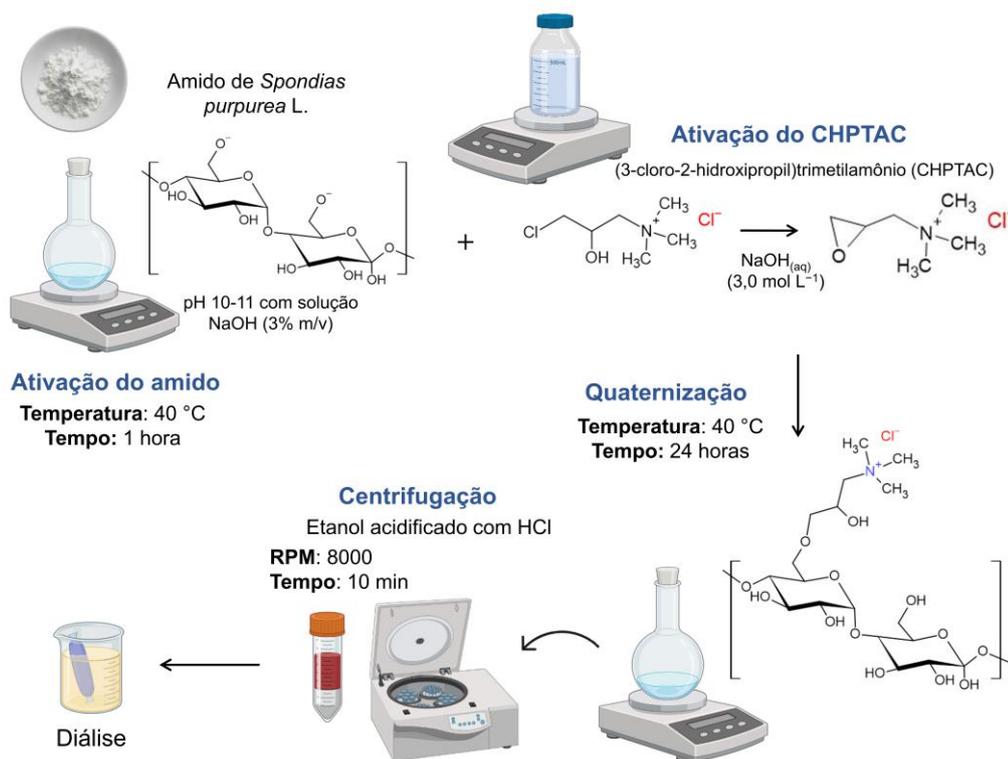
$$\text{Tamanho dos cristalitos} = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

As análises reológicas das suspensões de CNFCp (0,5 a 2,0%) foram realizadas com sistema Peltier em reômetro TA Instrument AR 2000 utilizando a geometria de cone e placa (40 mm de diâmetro, ângulo 1 $^\circ$ 0'47" e gap de 27  $\mu\text{m}$ ). A varredura de deformação (1-10% a 1 Hz) foi aplicada para medir as regiões viscoelásticas lineares. Curvas de fluxo com taxa de cisalhamento (0,01–100  $\text{s}^{-1}$ ) foram medidas a 37  $^\circ\text{C}$ . Além disso, medidas oscilatórias foram utilizadas para determinar o módulo de armazenamento ( $G'$ ) e o módulo de perda ( $G''$ ).

### 3.2.3 Obtenção e quaternização do amido de ciriguela (AQC)

O método de extração do amido do endocarpo de ciriguela (*S. purpurea* L.) foi previamente descrito por nosso grupo (RODRIGUES et al., 2021). Os frutos foram triturados, processados, filtrados e a suspensão aquosa obtida foi ressuspensa em água e posteriormente o amido foi obtido por precipitação em etanol e posteriormente seco em estufa. O amido quaternizado de ciriguela (AQC) foi sintetizado de acordo com procedimento previamente descrito por Amar-Lewis et al. (2021) e Zhu, Zhang e Feng (2016) com adaptações, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Esquema de quaternização do amido de ciriguela.



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

O amido de ciriguela (1,0 g) foi misturado em 5 mL de água ultrapura. A suspensão foi ajustada para pH 10 a 11 com uso de solução de hidróxido de sódio a 3% (m/m) e em seguida foi aquecida a 40 °C sob agitação constante. Em seguida, o reagente de quaternização CHPTAC (7,8 mL) foi misturado a 10 mL de solução de NaOH (3,0 mol L<sup>-1</sup>) e a mistura foi adicionada imediatamente à suspensão de amido. A mistura foi mantida sob agitação a 40 °C durante 24 h. Ao final, a mistura foi centrifugada (6.080 g por 15 min) em solução de etanol-acetona (3:1) acidificada com HCl 1%. O precipitado foi dialisado por 72 h em água destilada com trocas

realizadas a cada 12 h. O produto final dialisado foi então seco por liofilização e armazenado para posterior caracterização.

### 3.2.3.1 Caracterização química do amido de ciriguela quaternizado

A caracterização estrutural do amido catiônico foi realizada por FT-IR, RMN <sup>1</sup>H e por análise elementar. O grau de substituição (GS) do amido quaternizado foi avaliado pela seguinte Equação (2) usando o percentual de nitrogênio obtido por análise elementar (QUELEMES et al., 2017):

$$GS = \frac{162 \times \%N}{(1400 - 188,1 \times \%N)} \quad (2)$$

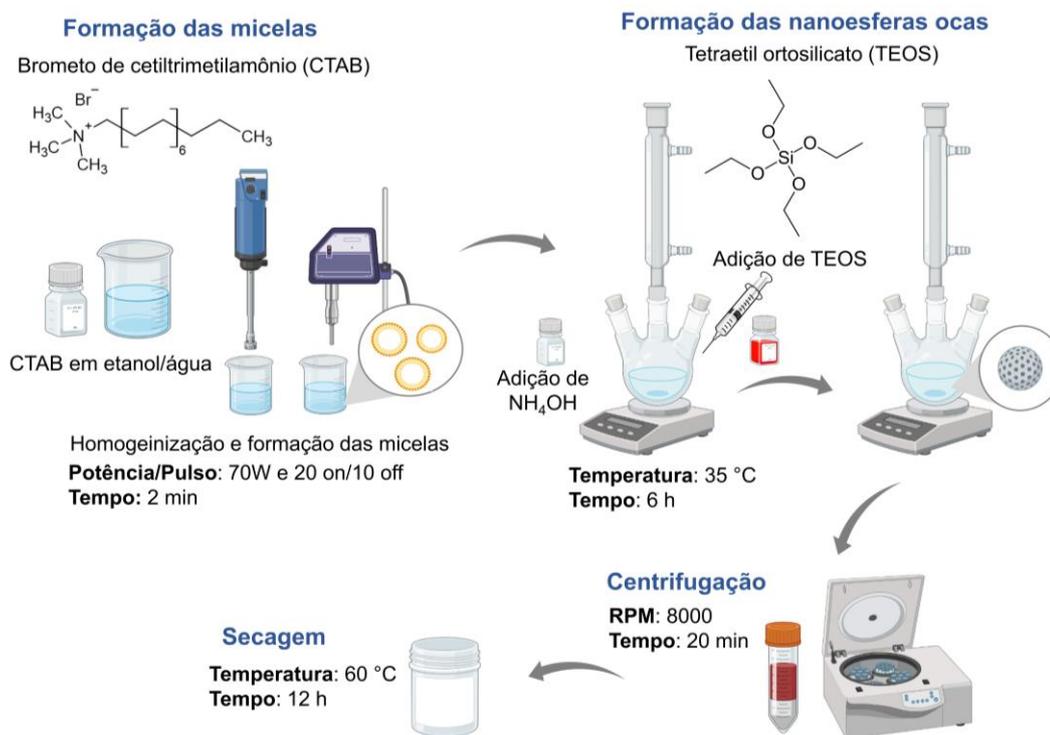
onde N é o percentual de nitrogênio (%) determinado por análise elementar, 162 é a massa molecular das unidades de anidroglicose, 188,1 é a massa molecular do grupo catiônico (CHPTAC) e 1400 é a massa molar do nitrogênio multiplicado por 100.

A Mw do AQC foi determinada por Cromatografia de permeação em gel (GPC) usando equipamento SHIMADZU LC-10AD com detector de índice de refração RID-10A a 40 °C, com colunas lineares PolySEp-GFC de 7,8 × 300 mm. A amostra de AQC foi solubilizada na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup> com fase móvel (0,1 mol NaNO<sub>3</sub> L<sup>-1</sup> com NaN<sub>3</sub> a 0,02% p/v filtrada em filtro 0,45 µm). O fluxo foi fixado em 1,0 mL min<sup>-1</sup>. As massas molares Mn e Mw foram determinadas utilizando-se padrões de pululanas (Shodex Denko<sup>®</sup>) (MM de 5,9 × 10<sup>3</sup> a 7,88 × 10<sup>5</sup> g mol<sup>-1</sup>).

### 3.2.4 Síntese de nanoesferas ocas de sílica porosa (NOSM)

O processo de síntese das nanoesferas de sílica mesoporosa usando como *template* o surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e como precursor de silício o tetraetil ortosilicato (TEOS) é ilustrado na Figura 11 a seguir. Resumidamente para a síntese das nanoesferas ocas de sílica mesoporosa, foram utilizados 0,9 g de CTAB dissolvidos em 300 mL de água destilada e 180 mL de etanol. A mistura foi homogeneizada por 20 min em Ultra Turrax (IKA T25, Alemanha) até que o CTAB estivesse totalmente dissolvido. Após, a mistura foi levada para sonicação por 2 min (70% de amplitude, 20 on e 20 off). Em seguida, 8 mL de amônia (NH<sub>4</sub>OH) foi adicionado a mistura sob agitação constante durante 1 h. Após, 6 mL de TEOS foi adicionado à solução sob gotejamento e mantido sob agitação constante por 6 h na temperatura de 35 °C. As nanoesferas de sílica, como produto final foram obtidas por centrifugação (6.080 g por 15 min) usando água destilada e o precipitado seco a 60 °C em estufa.

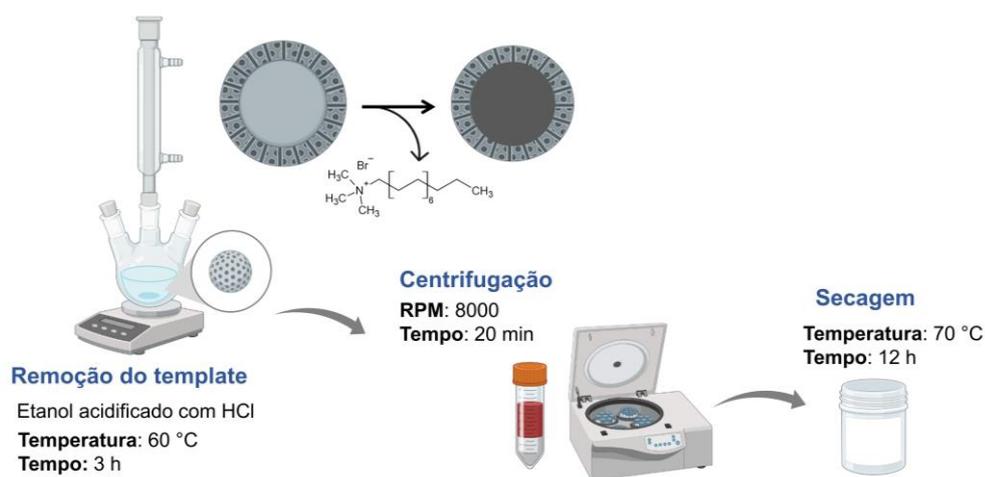
Figura 11 – Esquema mostrando a síntese de nanoesferas de sílica mesoporosa.



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

Para o processo de extração do CTAB (*template*), as nanoesferas de sílica foram misturadas em 120 mL de etanol contendo 240 uL de HCl (37%) e mantidas sob agitação a 60 °C sob refluxo durante 3 h. As nanoesferas ocas de sílica mesoporosa (NOSM) obtidas foram centrifugadas com etanol e depois secas em estufa a 70 °C. Esse processo de remoção do *template* com formação do núcleo oco é demonstrado na Figura 12.

Figura 12 – Esquema mostrando o processo de remoção do *template* CTAB.



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

### 3.2.4.1 Caracterização das nanoesferas ocas de sílica mesoporosa (NOSM)

As NOSM foram caracterizadas por FTIR (antes e após a remoção do CTAB) e a morfologia e estrutura porosa foi avaliada por MEV. As isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio (N<sub>2</sub>) foram medidas usando Autosorb-iQ3 (Surface Area and Pore Size Analyzer, Quantachrome, EUA) a 77 K (desgaseificada a 200 °C por 14 h antes da análise). As áreas de superfície, a distribuição e o tamanho dos poros das NOSM foram calculados usando teoria funcional de densidade não local (NL-DFT). O volume total dos poros foi determinado a partir da quantidade adsorvida a pressão relativa P/P<sub>0</sub> de 0,98.

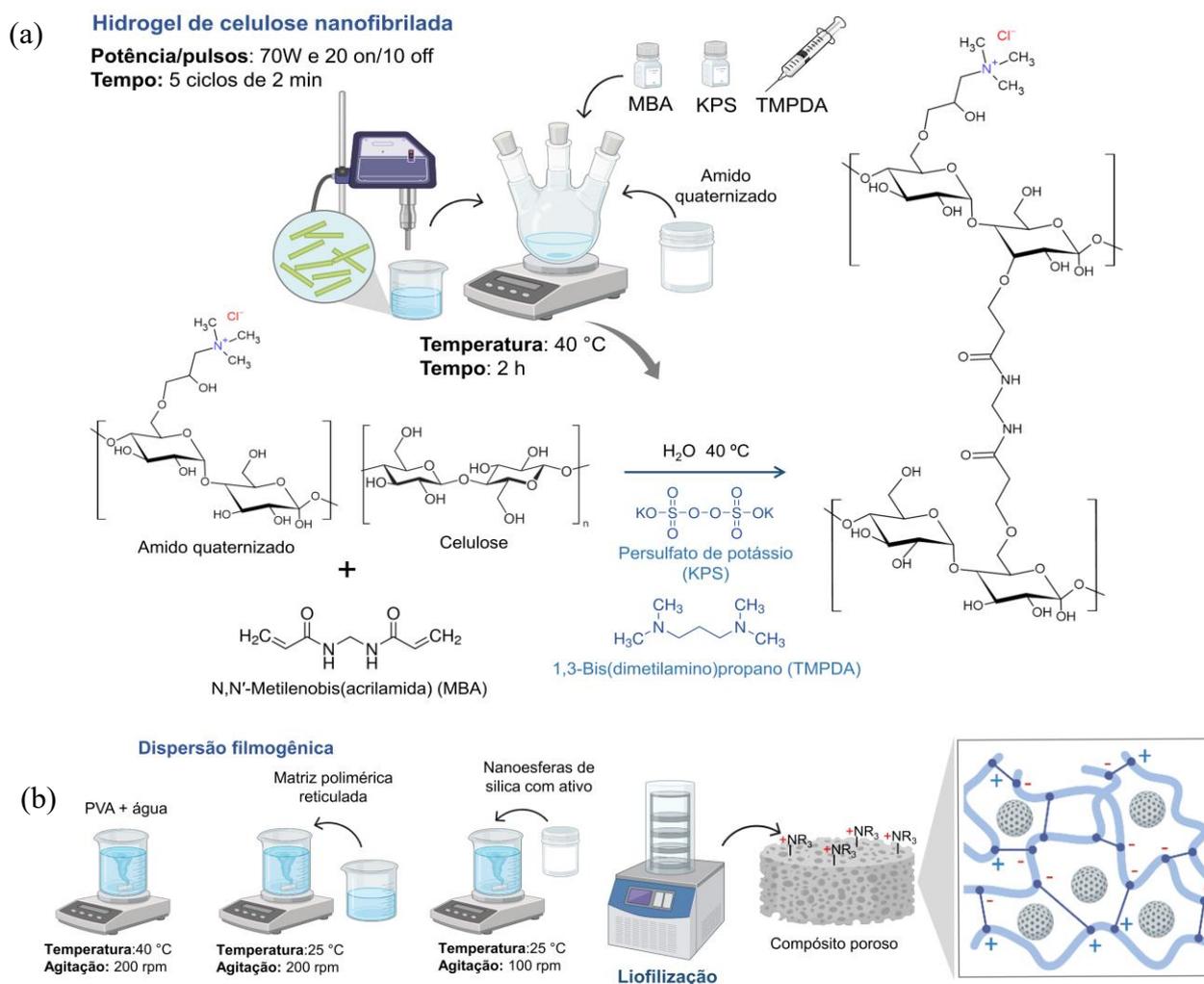
### 3.2.5 Preparação do compósito poroso CNFCp-gMBA-AQC/NOSM

No processo de reticulação do amido quaternizado de *S. purpurea* L. e das nanofibrilas de celulose de *C. procera* com metilenobisacrilamida (MBA) foi realizado de acordo com Lin et al (2023) com algumas adaptações. O processo de síntese e o mecanismo reacional proposto são apresentados na Figura 13. Inicialmente a CNFCp liofilizada foi adicionada em 10 mL de água ultrapura e nanofibrilada usando um sonicador Qsonica Q700 (Newtown, Reino Unido) em 5 ciclos de 2 min (70% de amplitude, 20 on e 10 off) até a formação de um hidrogel. Separadamente, o AQC foi adicionado sob agitação por 10 min (200 rpm à temperatura ambiente até a formação de um gel). As suspensões foram adicionadas em balão e mantidas sob agitação até completa homogeneização. Após, foi adicionado no balão 40 mg de MBA, o agente reticulante e mantido sob agitação constante. Em seguida, 12 mg de persulfato de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) foram adicionados, como iniciador radicalar, juntamente com 7,5 µL de TMPDA, como catalisador. Em seguida a mistura foi purgada com nitrogênio durante 10 min. A reação de reticulação ocorreu durante 2,5 h a temperatura de 40 °C sob agitação constante. Após a reação, o excesso de MBA e K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> foi removido por diálise durante 72 h. Por fim, a suspensão dialisada foi liofilizada (Equipamento Martins Christ Alpha 1-2 LD plus, Alemanha). O compósito CNFCp-gMBA-AQC resultante foi pesado e a porcentagem de reticulação do compósito foi então calculada usando a seguinte equação (LIN et al., 2023):

$$\text{Reticulação (\%)} = \frac{(W_{CP} - W_1)}{W_1} \times 100 \quad (3)$$

Sendo que W<sub>1</sub> a massa seca de celulose nanofibrilada e amido quaternizado e W<sub>CP</sub> a massa do compósito CNFCp-gMBA-AQC após liofilização.

Figura 13 – Esquema mostrando a reação de reticulação de polissacarídeos nanoestruturados e quimicamente modificados (a) e o processo de preparação dos compósitos porosos (b).



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

Os compósitos porosos do tipo *scaffold* foram preparados com base nas proporções dos polissacarídeos reticulados conforme Tabela 1 o procedimento ilustrado na Figura 13 e. No preparo dos compósitos, a matriz polimérica foi constituída pelos polissacarídeos reticulados juntamente com álcool polivinílico (PVA). Separadamente, o agente plastificante (PVA) foi solubilizado em água sob aquecimento e agitação constante (40 °C e 200 rpm) e posteriormente, em temperatura ambiente, foi adicionado a massa de CNFCp-gMBA-AQC. Após, as NOSM, previamente com o ativo adsorvido, foram adicionadas na matriz polimérica sob leve agitação até formação de suspensão homogênea. A mistura foi congelada usando nitrogênio líquido e em seguida liofilizada em molde de poliestireno com volume do 0,4 mL para cada compartimento. Os compósitos porosos obtidos foram denominados CP1, CP2, CP3 e CP4 de acordo com a composição da matriz polimérica (CNFCp e AQC) apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição dos compósitos porosos preparados com diferentes concentrações de CNFCp e AQC reticulados.

Compósitos	Composição da matriz polimérica (%)			
	Matriz polimérica reticulada		AP	NOSM
	AQC	CNFCp		
CP1	75	25	40	20
CP2	50	50	40	20
CP3	25	75	40	20
CP4	0	100	40	20

CP: Compósitos porosos; AQC: Amido quaternizado de ciriguela (*S. purpurea* L.); CNFCp: Celulose nanofibrilada de *C. procera*; PA: Agente plastificante (álcool polivinílico); NOSM: Nanoesferas ocas de sílica mesoporosa. A porcentagem de AP e NOMS foi calculada com base na massa da matriz polimérica

### 3.2.6 Caracterização dos compósitos porosos (CP)

#### 3.2.6.1 Análise por FTIR

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro Frontier FTIR/NIR (PerkinElmer, EUA) na faixa de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.2.6.2 Análise por MEV

A morfologia foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando microscópio QUANTA FEG-FEI 450 (Oregon, EUA). As amostras foram fixadas em fita de carbono e revestidas por uma camada de ouro de 20 nm de espessura usando um metalizador Quorum QT150ES, e posteriormente examinadas usando uma tensão de aceleração de 10 kV e uma ampliação de 1.000 $\times$ .

#### 3.2.6.3 Intumescimento e fração solúvel

CPs liofilizados (sem ativo; n = 3) foram pesados ( $W_1$ ) e colocados individualmente em frasco contendo 1,5 mL de tampão fosfato (PBS) e deixados a 37 °C por 24 h. Em seguida, os CPs foram colocados em papel de filtro para remoção do excesso de água superficial, e em seguida a sua massa foi pesada e denominada de  $W_2$ . A taxa de intumescimento foi calculada pela Equação 4:

$$I\% = \frac{[W_2 - W_1]}{W_1} \times 100 \quad (4)$$

Paralelamente, a massa perdida (fração solúvel) dos CPs durante a incubação foi calculada a partir da massa inicial e da massa final após liofilização e pesagem ( $W_3$ ). A perda de massa ou fração solúvel dos CPs foi calculada a partir da seguinte equação 5:

$$FS\% = \frac{[W_3 - W_1]}{W_1} \times 100 \quad (5)$$

As medidas de intumescimento e de fração solúvel foram realizadas em triplicata.

#### 3.2.6.4 Densidade e porosidade

A densidade e a porosidade dos CPs foram medidas pelo método de deslocamento de líquido. Primeiro, amostras secas foram pesadas ( $W_1$ ) e, em seguida, mergulhadas em um cilindro contendo um volume conhecido ( $V_1$ ) de etanol e deixadas em repouso até que nenhuma bolha de ar fosse observada (24 h). Assim, todo o volume de etanol e da amostra foi registrado como  $V_2$ . As amostras foram retiradas do etanol e o volume restante de etanol foi anotado como  $V_3$ . As medidas foram realizadas em triplicata.

A densidade ( $\rho$ ) dos CPs foi calculada pela Equação 6:

$$\rho = \frac{W_1}{[V_2 - V_3]} \quad (6)$$

A porosidade ( $\varepsilon$ ) dos CPs foi calculada pela Equação 7 de acordo com Sharma, Swetha e Roy (2019).

$$\varepsilon = \left[ \frac{(W_2 - W_1)}{\rho_{ethanol}} / V_1 \right] \times 100 \quad (7)$$

#### 3.2.7 Carreamento de OncoA pelo método do equilíbrio de adsorção

A OncoA foi carregada nas NOSM pelo método de equilíbrio de adsorção. Resumidamente, a OncoA foi dissolvida em água ultrapura e, em seguida, o carreador (NOSM) foi disperso na solução sob agitação constante (200 rpm a 25 °C). A proporção molar estabelecida para o bioativo e o nanocarreador foi de 1:10. Após 24 h, essa suspensão foi centrifugada (7000 rpm por 30 min) obtendo um precipitado que foi liofilizado e armazenado para posterior incorporação na matriz polimérica dos compósitos. O sobrenadante foi usado para determinar a quantidade de bioativo adsorvido usando um espectrofotômetro modelo UV-

2600 (Shimadzu, Japão) no comprimento de onda de 282 nm (previamente obtido por varredura da oncoalexona A de 200 a 800 nm). A OncoA (0,5-25 µg mL<sup>-1</sup>) foi utilizada para a construção da curva de calibração (Absorbância = 0,01142 + 0,0429[OncoA]; com R<sup>2</sup> = 0,9989). A porcentagem de carregamento do bioativo (% DL) foi calculada por meio da Equação 8:

$$DL\% = \frac{[D_1 - D_2]}{D_1} \times 100 \quad (8)$$

Onde D<sub>1</sub> é a quantidade total de bioativo adicionado e D<sub>2</sub> é a quantidade de bioativo presente no sobrenadante.

### 3.2.8 Avaliação da segurança não clínica in vivo

Os testes foram realizados em zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa) no Laboratório de Bioprospecção de Produtos Naturais e Biotecnologia (LBNPB-UECE), conforme protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE N° 04009489/2023). Zebrafish (*Danio rerio*), com idade entre 60 e 90 d, de ambos os sexos (fenótipo de nadadeira curta), com tamanho de 3,5 ± 0,5 cm e peso de 0,4 ± 0,1 g e adquiridos da Agroquímica Comércio de Produtos Veterinários LTDA (fornecedora em Fortaleza, Ceará, Brasil). Os ZFa foram aclimatados por 24 h a 25 °C em aquários de vidro pH = 7,0 contendo água desclorada (ProtecPlus®) e bombas de ar com filtros submersos, e com ciclo circadiano de 14:10 h (claro/escuro). Os ZFa receberam ração *ad libitum* 24 h antes dos experimentos. Após os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada (4 °C) por 10 min até a perda dos movimentos operculares. O estudo de toxicidade aguda (96 h) foi realizado de acordo com as metodologias propostas pela OECD (1992) e Silva et al (2023). O teste de campo aberto (MAGALHÃES et al., 2017) foi realizado para avaliar alterações na coordenação motora dos animais.

#### 3.2.8.1 Teste de Campo Aberto (TCA)

O TCA foi realizado para avaliar alterações ou não da coordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular (MAGALHÃES et al., 2017). ZFa (n = 6 grupo<sup>-1</sup>) foram tratados com 20 µL, via oral (*v.o.*), de OncoA ou NOSM ou NOSM@OncoA, ambos de concentrações 0,1 ou 0,5 ou 1,0 mg mL<sup>-1</sup> ou veículo (água bidestilada; 20 µL; *v.o.*). Um outro grupo de animais (n = 6 grupo<sup>-1</sup>) foi tratado com 20 µL, via oral, com diazepam (DZP; 10 mg mL<sup>-1</sup>), bem como foi incluso um grupo de animais (n = 6 grupo<sup>-1</sup>) sem tratamento (Naive). Após 1 hora dos tratamentos via oral de ambos os experimentos, os animais foram,

individualmente, adicionados em placas de Petri de vidro (10 × 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes e analisada a atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas (CL) durante 0-5 minutos. Os resultados foram expressos como valores da média ± erro padrão da média para cada grupo de 6 animais. Depois de confirmar a normalidade de distribuição e homogeneidade dos dados, as diferenças entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA unidirecional), seguido do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism v. 8.4.3. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.8.2 Toxicidade aguda 96h

A toxicidade aguda foi realizada frente aos ZFa conforme metodologias propostas pela OECD (OECD, 1992) e Silva et al. (2023). Os ZFa ( $n = 6 \text{ grupo}^{-1}$ ) foram tratados conforme descrito no item 3.2.9.1. O grupo veículo foi utilizado como controle. Após 96 h dos tratamentos, foi anotado o número de ZFa mortos em cada grupo e determinado a concentração letal capaz de matar 50% dos animais ( $CL_{50}$ ) através do método matemático Trimmed Spearman-Kärber com intervalo de confiança de 95% (ARELLANO-AGUILAR et al., 2015).

### 3.2.9 Ensaio de liberação *in vitro*

O perfil de liberação de OncoA adsorvida nas NOSM-CPs foi avaliado por meio de um sistema de difusão vertical, adaptado a partir de Almeida et al. (2017). Uma membrana de celulose para diálise (diâmetro médio:  $1,18 \pm 0,02$  cm e área de permeação:  $1,09 \pm 0,03$ ) com peso molecular em torno de 12 kDa foi fixada entre o compartimento receptor e o doador (FIGURA 14). As membranas foram imersas no meio receptor (tampão fosfato) por 24 h antes de serem usadas no experimento. NOSM@OncoA e amostras de CP1 a CP4 foram adicionadas ao compartimento doador com 2 mL de solução de tampão fosfato (PBS) pH = 7,4. O ensaio de liberação também foi realizado para OncoA livre na mesma solução tamponada (2 mL). O compartimento receptor foi preparado com 10 mL de PBS (pH = 7,4). As liberações de OncoA foram analisadas por espectroscopia UV-Vis (UV-2600, Shimadzu, Japão) usando a curva de calibração citada anteriormente na seção 3.2.7. As condições *Sink* foram mantidas para o estudo de liberação que foram realizados em triplicata na temperatura de  $37,0 \pm 0,20$  °C durante 72 h.

Para analisar o perfil de liberação de OncoA *in vitro* (a partir de CPs, NOSM@OncoA e OncoA livre) os dados foram ajustados aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira

ordem, Higuchi, Elovich (Eq. 9-12) e para identificar o mecanismo de liberação, o ensaio também foi ajustado ao modelo de Korsmeyer-Peppas (Eq. 13).

$$\text{Modelo de ordem zero: } Q = Kt + Q_0 \quad (9)$$

$$\text{Primeira ordem: } \ln Q = \ln Q_0 + kt \quad (10)$$

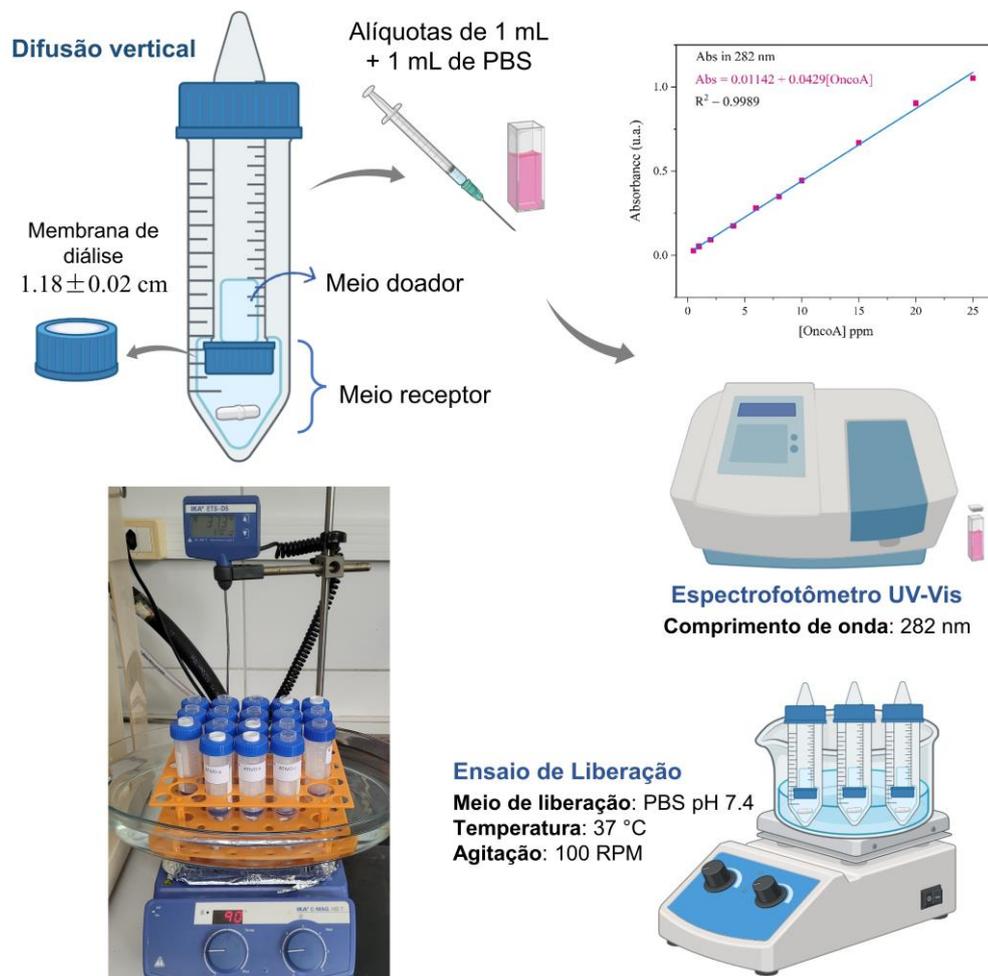
$$\text{Modelo de Higuchi: } Q = kt^{\frac{1}{2}} \quad (11)$$

$$\text{Modelo de Elovich: } 1 - Q = k \ln t + b \quad (12)$$

$$\text{Modelo de Korsmeyer-Peppas: } \frac{Q_t}{Q_\infty} = Kt^n \quad (13)$$

onde  $Q$  é a porcentagem de liberação de OncoA no tempo  $t$ ,  $Q_t / Q_\infty$  representa a fração de OncoA liberada no tempo  $t$ ,  $k$  é a constante de liberação e o expoente  $n$  representa o mecanismo de transporte do bioativo e pode ser usado para identificar o tipo de mecanismo de difusão.

Figura 14 – Sistema de estudo de liberação por difusão vertical em PBS pH 7,4.



Fonte: Elaborado pelo autor com BioRender.com

### 3.2.10 Análise estatística

Os dados das medidas foram avaliados em triplicata e os resultados obtidos foram reportados como valores médios  $\pm$  desvios-padrão. Todos os resultados foram analisados por meio do software e GraphPad Prism v. 8.0.

## 3.3 Resultados e discussão

### 3.3.1 Caracterização química e morfológica dos materiais de partida

#### 3.3.1.1 Caracterização de nanofibrilas de celulose de *Calotropis procera*

As amostras de nanofibrilas de *C. procera* após as etapas de tratamento térmico em meio ácido e básico, hidrólise em meio fortemente ácido ( $H_2SO_4$ ), branqueamento em solução de  $H_2O_2/NaOH$  e após tratamento por ultrassom, apresentaram rendimento em torno de 14% em massa seca após liofilização. O tratamento térmico e químico foi utilizado nas etapas iniciais para promover o inchamento e quebra das fibras, além de solubilizar hemiceluloses e lignina (NORONHA et. al., 2021). As suspensões de CNFCp após a última etapa de desfibrilação por ultrassom mostraram uma aparência em forma de gel com boa estabilidade coloidal. Os resultados de parâmetros analisados para a celulose nanofibrilada de *C. procera* são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros analisados para CNFCp.

Amostra	Parâmetros	Resultados ( $\pm$ DP)
CNFCp	Rendimento (%)	14,84 $\pm$ 0,48
	Comprimento ( $\mu$ m)	0,65 $\pm$ 0,32
	Diâmetro (nm)	29,40 $\pm$ 2,91
	Relação C/d	22,10
	Potencial $\zeta$ (mV)	-30,80 $\pm$ 0,90
	Grau de cristalinidade (%)	63,91
	Tamanho dos cristalitos (nm)	2,71

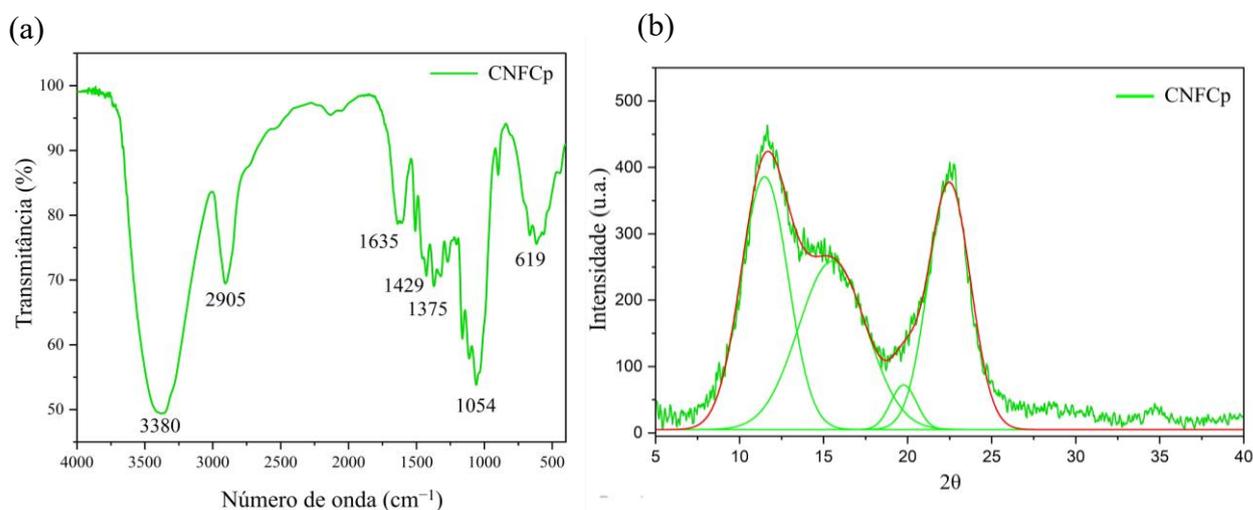
CNFCp: Celulose nanofibrilada de *C. procera*.

A análise de potencial  $\zeta$  foi realizada com o objetivo de avaliar a carga superficial presente na CNFCp (TABELA 2). As nanofibrilas exibiram um potencial  $\zeta$  em torno de -30 mV, indicando assim uma concentração significativa de grupos funcionais carregados negativamente na superfície da CNFCp. Essa carga superficial negativa nas microfibrilas de

celulose pode contribuir para a estabilidade coloidal desses materiais, possibilitando seu uso em uma ampla variedade de nanossistemas coloidais. Essas cargas podem ser atribuídas, de acordo com Noronha et al. (2021), a grupos sulfatos carregados negativamente ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) que estariam presentes na superfície das nanofibrilas após o processo de hidrólise ácida com  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

A análise por FTIR foi realizada com o intuito de identificar grupos funcionais presentes na estrutura da celulose nanofibrilada típicas para polissacarídeos (FIGURA 15a). A banda em  $3380\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento de grupos  $-\text{OH}$  em ligações de hidrogênio. A banda observada entre  $3000$  e  $2700\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento assimétrico e simétrico de  $\text{C}-\text{H}$  (KHANJANZADEH et al. 2018). A banda em  $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$  está associada com a deformação angular de água associada. Bandas características de polissacarídeos podem ser observados em  $1170$  a  $1033\text{ cm}^{-1}$  que são atribuídas a estiramentos  $\text{C}-\text{O}$  e deformações angulares  $\text{C}-\text{H}$  da estrutura do anel piranosídico. Em  $1054\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas bandas referentes ao estiramento de grupos éter ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ) nas ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  (SILVA et al. 2019). Além disso, em  $\sim 1375\text{ cm}^{-1}$  está presente uma banda associada à flexão no plano dos grupos hidroxila ( $\text{O}-\text{H}$ ). A presença de resíduos lignocelulósicos pode ser observada pela banda de baixa intensidade em  $1509\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento  $\text{C}=\text{C}$  dos anéis aromáticos de lignina (KHANJANZADEH et al. 2018; SILVA et al., 2019). No geral, os resultados de FTIR apresentaram bandas típicas para polissacarídeos.

Figura 15 – Espectros de FTIR (a) e o padrão de DRX deconvoluído (b) de celulose nanofibrilada de *Calotropis procera* (CNFCp) obtidos após hidrólise ácida e tratamento por ultrassom.

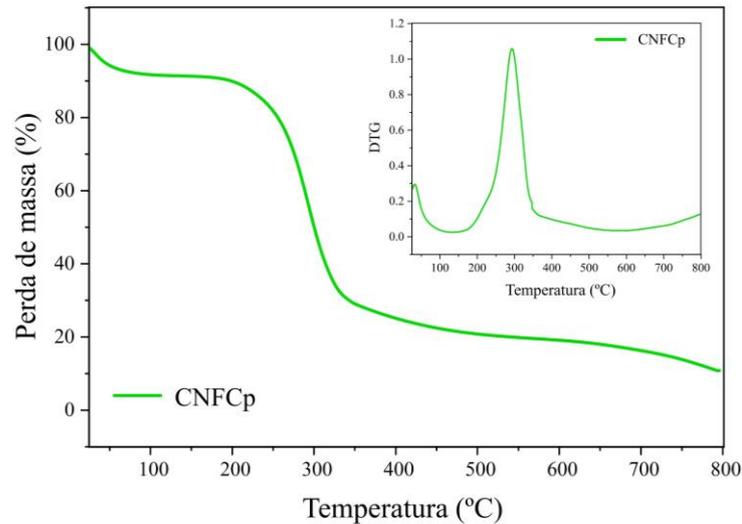


Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 15b é apresentado o difratograma de raios X para a CNFCp e na Tabela 2 é mostrado os dados de índice de cristalinidade (IC) e tamanho dos cristalitos determinado pela equação de Scherrer. O padrão DRX da CNFCp exibiu dois domínios cristalinos principais em  $2\theta$ , sendo em  $12^\circ$  (plano 110) e  $22^\circ$  (plano 020) (FRENCH, 2014; GONG et al., 2017). Resultados semelhantes foram observados para nanocristais de celulose obtidos de amêndoa de manga por Silva et al., (2019). Uma maior cristalinidade da CNFCp foi evidenciada (63,91%), assim como a formação de polimorfos de celulose II (com ângulos característicos entre  $13^\circ \leq 2\theta \leq 15^\circ$  e  $18^\circ \leq 2\theta \leq 22^\circ$ ) possivelmente decorrente do tratamento alcalino (etapa de pré-tratamento e de branqueamento) ou da alta concentração de ácido sulfúrico no processo de hidrólise (GONG et al., 2017). A partir da equação Scherrer o tamanho médio calculado dos cristalitos do CNFCp foi de 2,71 nm. De acordo com Gong et al. (2017) durante a hidrólise ácida pode haver um rearranjo das moléculas de celulose II, reduzindo o tamanho dos cristalitos em amostras que sofreram hidrólise demoradas em ácido sulfúrico. No trabalho de Jin et al (2016), foi evidenciado a correlação entre o tamanho dos cristalitos de celulose e as transformações polimórficas induzidas por processos de redução ao tamanho nanométrico e de diferentes concentrações de soluções alcalinas às quais as fibras foram tratadas.

As curvas de TG e DTG para a CNFCp é mostrada na Figura 16. A amostra apresentou perda de massa na temperatura de  $\sim 100^\circ\text{C}$ , que corresponde à perda de água adsorvida no material. Degradações significativas da amostra de CNFCp iniciaram em aproximadamente  $200^\circ\text{C}$  ( $T_{\text{on}}$ ), e a temperatura máxima de degradação ocorreu em torno de  $308^\circ\text{C}$ . Essa temperatura é geralmente atribuída à quebra das ligações químicas nos anéis piranosídicos das cadeias de celulose (ZHAO et al., 2023). As degradações térmicas foram finalizadas a aproximadamente  $360^\circ\text{C}$  ( $T_{\text{end}}$ ), com resíduo de cinzas variando em torno de 10%. No geral, a amostra de CNFCp apresentou um perfil típico de degradação térmica observado em outros trabalhos com nanocelulose (SILVA et al., 2019). No geral a amostra de CNFCp apresentou uma significativa estabilidade térmica que pode ser atribuído pela elevada cristalinidade promovida pela hidrólise ácida. Zhao et al (2023) estudaram nanocelulose com lignina incorporada em filmes bloqueadores de radiação UV. A análise térmica das nanofibrilas de celulose pura mostrou duas temperaturas máximas de degradação térmica atribuídas à presença de carboxilato de sódio e à quebra de ligações químicas na cadeia da celulose. A presença de carboxilatos deveu-se ao método de oxidação por TEMPO (N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina) utilizado na síntese das nanofibrilas. De acordo com a análise de FTIR, grupos carboxilatos não estão presentes na amostra, o que poderia explicar o pico único no DTG para a CNFCp.

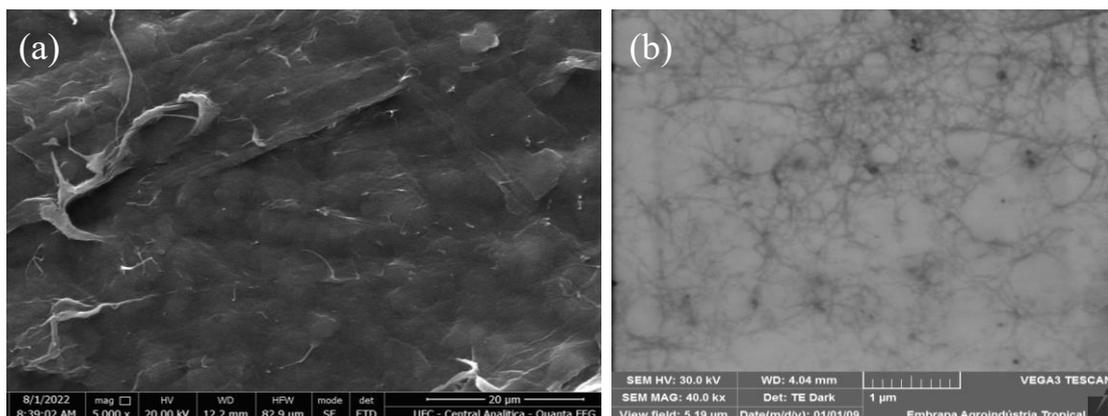
Figura 16 – Análise de TGA e DTG de celulose nanofibrilada de *Calotropis procera* (CNFCp) obtida após hidrólise ácida e tratamento por ultrassom.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Micrografias MEV e MEV (FIGURAS 17a e b) da amostra de CNFCp confirmam a formação de uma rede de micro e nanofibrilas de celulose após o processo de desfibrilação por ultrassom. As interações de ligação de hidrogênio são intensificadas após a desfibrilação mecânica, resultando em uma suspensão gelatinosa (SOUZA, et. al., 2019). A dimensão média do diâmetro da CNFCp foi de 29 nm e o comprimento em torno de 0,65  $\mu\text{m}$  por meio de medições usando o software ImageJ<sup>®</sup>. Assim, a combinação do tempo de hidrólise ácida e o tratamento por ultrassom auxiliou na redução das dimensões das fibrilas de celulose à nanoescala. Assim, foi possível obter um nanomaterial fibroso a partir das fibrilas naturais de *C. procera* em um processo que envolve etapas mais ambientalmente aceitáveis.

Figura 17 – Micrografias de MEV(a) e STEM (b) de CNFCp obtidas após 24 h de hidrólise ácida e tratamento por ultrassom. Ampliação de micrografias: MEV: 5.000 $\times$  e STEM: 35.000 $\times$ .



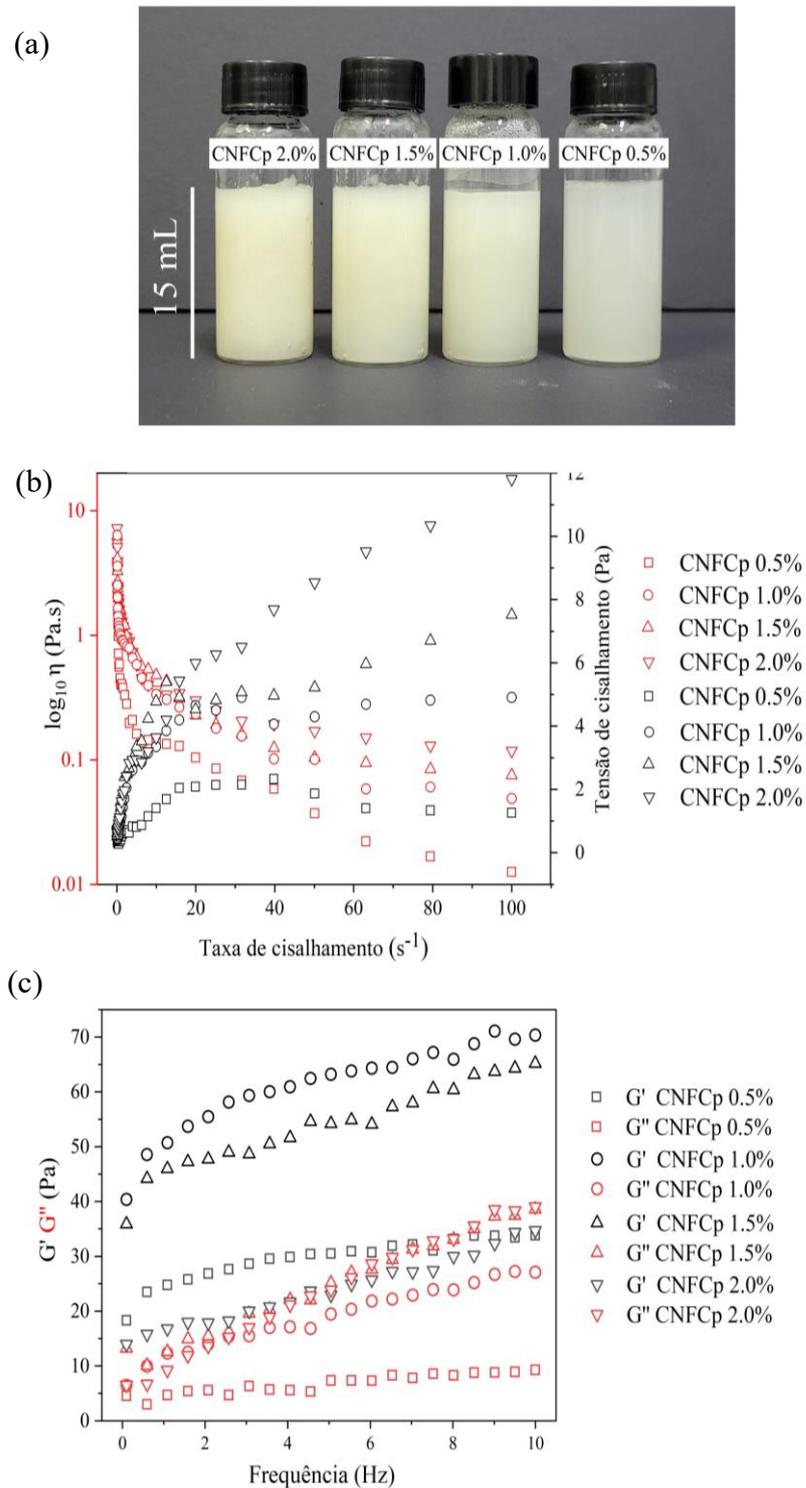
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os géis de CNFCp (FIGURA 18a) apresentaram aspecto gelatinoso a pastoso com maior opacidade em concentrações mais elevadas (1,0 a 2,0% em massa). Em testes preliminares, concentrações superiores a 2,0% apresentaram dificuldades de homogeneização, devido à formação de um material fortemente pastoso. O mesmo comportamento foi observado por Zhu et al. (2017) para dispersões de celulose de algodão na produção de géis estabilizadores de emulsão Pickering. De acordo como observado na Figura 18b a tensão de cisalhamento e a viscosidade dos géis de CNFCp foram afetadas pelo aumento da concentração da celulose nanofibrilada. O comportamento das curvas de tensão de cisalhamento e viscosidade dos géis CNFCp sugere um comportamento não Newtoniano, do tipo pseudoplástico, o que está de acordo com as propriedades reológicas de hidrogéis e soluções poliméricas. A viscosidade elevada dos hidrogéis pode ser benéfica em algumas aplicações, como liberação controlada de fármacos e na engenharia de tecidos (SOUZA et al. 2019; STOJKOV et al., 2021). A tensão de cisalhamento aumentou com a taxa de cisalhamento mostrando valores crescentes à medida que a concentração de CNFCp aumentava. Por outro lado, a viscosidade diminuiu com a taxa de cisalhamento (0,01 a 0,12 Pa s<sup>-1</sup> a uma taxa de cisalhamento de 100 s<sup>-1</sup>) mostrando menores valores de viscosidade de acordo com a menor concentração de CNFCp utilizada. Esse comportamento típico não Newtoniano pode ser explicado pela perturbação na rede de nanofibrilas (moléculas desordenadas) que, após serem submetidas a uma tensão, as moléculas são direcionadas na mesma direção da tensão aplicada, reduzindo assim a viscosidade do hidrogel (BOUHOUTE; NAKAJIMA; ISODA, 2021).

As suspensões de CNFCp foram submetidas também a uma varredura de frequência oscilatória para avaliar os módulos de armazenamento (G') e de perda (G'') (FIGURA 18c). Tanto G' quanto G'' são ligeiramente dependentes da frequência aplicada, aumentando à medida que a frequência também é aumentada. Esse comportamento indica um aumento das interações interpartículas e o aumento da elasticidade da rede do hidrogel (SOUZA et al. 2019). Através dos gráficos observa-se um comportamento predominantemente elástico para a CNFCp nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% dentro da faixa de frequência analisada (G' > G''). O gel CNFCp 2,0% apresentou cruzamento entre os módulos G' e G'' (~5,0 Hz e ~23,0 Pa), indicando uma possível predominância de forças de viscosidade sobre forças elásticas ao redor da tensão de escoamento. Dessa forma, as suspensões coloidais nessa concentração de CNFCp podem apresentar baixa estabilidade e uma tendência à processos de sedimentação (STOJKOV et al., 2021; ZHU et al., 2017). Com base nos resultados reológicos e em outros parâmetros apresentados anteriormente (potencial  $\zeta$ , cristalinidade e tamanho das nanofibrilas), as suspensões de CNFCp apresentam potencial estabilizante em suspensões coloidais além de

potencial aplicação estrutural e como reforço em biocompósitos.

Figura 18 – (a) Fotos de géis CNFCp, (b) viscosidade e tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento e (c) módulo de armazenamento  $G'$  e módulo de perda  $G''$  versus frequência angular com diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.1.2 Síntese e caracterização do amido quaternizado de *Spondias purpurea* L.

Neste trabalho, a inserção de uma carga positiva na cadeia do amido de ciriguela (*S. purpurea* L.) foi realizada introduzindo um agente catiônico contendo uma amina quaternária como ilustrado na Figura 10. Na reação, o amido foi previamente alcalinizado com solução de NaOH e, em seguida, misturado com o agente catiônico (3-cloro-2-hidroxi-propil-trimetil amônio) previamente ativo por formação do anel epóxido. A formação do anel epóxido ocorre pelo ataque nucleofílico intramolecular da hidroxila no carbono 2, catalisado em meio básico. Após o término da reação, o excesso de agente catiônico que não reagiu foi removido por diálise. Essa modificação na cadeia do amido foi realizada com o intuito de melhorar a interação eletrostática (reticulação física) com polímeros carregados negativamente na composição da matriz polimérica dos compósitos propostos neste trabalho (MENG et al., 2020).

O amido catiônico apresentou potencial  $\zeta$  igual a +23,0 mV, indicando que grupos positivos estavam presentes na cadeia do amido (TABELA 3). A quantidade de nitrogênio observada por análise elementar foi de 0,52% e o GS calculado a partir da Equação 2 foi de 0,065, sendo considerado um amido de baixa substituição de acordo com Chatterjee et al. (2023). O amido catiônico pode ser classificado como de baixo ( $GS < 0,1$ ), médio ( $0,1 < GS < 0,5$ ) e alto ( $GS > 0,5$ ) grau de substituição (CHATTERJEE et al. 2023; RANA et al., 2021). Ainda de acordo com Chatterjee et al. (2023) amidos catiônicos com baixo grau de substituição são muito utilizados para fins comerciais principalmente na indústria de papel, têxtil ou ainda como agentes aglutinantes em revestimentos e em tecnologias aplicadas em água residuais. Na área biomédica, o uso de amido catiônico vem sendo empregado no carregamento e entrega de fármacos, genes e bioativos devido à sua não toxicidade e baixo custo (AMAR-LEWIS et al., 2021; CHATTERJEE et al. 2023).

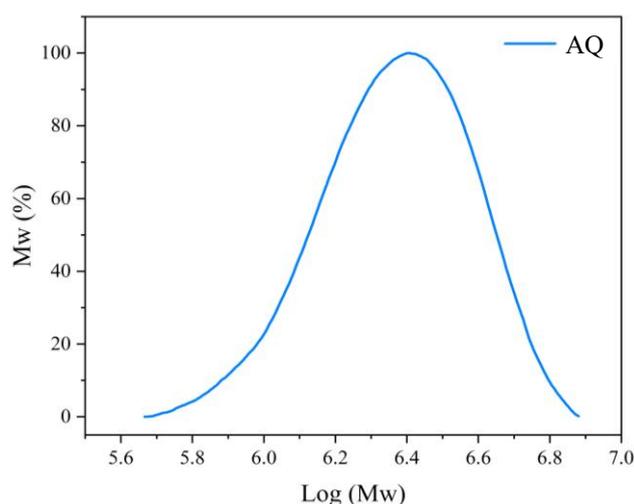
Embora o amido tenha apresentado baixo GS, a substituição foi suficiente para promover uma carga positiva na cadeia do polímero, como observado pelo potencial  $\zeta$ . Rahbar et al. (2020) relataram a melhoria da permeação transdérmica de fármacos através da interação eletrostática de quitosana carregada positivamente, usada como revestimento em nanopartículas sólidas, com a superfície da pele carregada negativamente. Assim, além do AQC auxiliar nas propriedades estruturais do compósito por interações entre cargas distintas, este polissacarídeo modificado pode facilitar a liberação do fármaco por mecanismos de interação e repulsão eletrostática. A adição de grupos de carga positiva promove ainda a interferência na síntese da membrana celular, síntese de proteínas, bem como replicação e transcrição de DNA em células bacterianas (ZHANG; LAN; XIE, 2022).

Tabela 3 – Parâmetros analisados para AQC.

Amostra	Parâmetro	Resultados ( $\pm$ DP)
AQC	Potential $\zeta$ (mV)	$+23,0 \pm 1,78$
	Nitrogênio (%) <sup>a</sup>	0,52
	Grau de substituição	0,065
	Mw	$2,07 \times 10^6$
	Mn	$2,60 \times 10^6$
	PDI	1,25

AQC: Quaternização do amido de ciriguela; <sup>a</sup>Análise elementar do amido de ciriguela quaternizado: N = 0,52% (antes da reação, 0%).

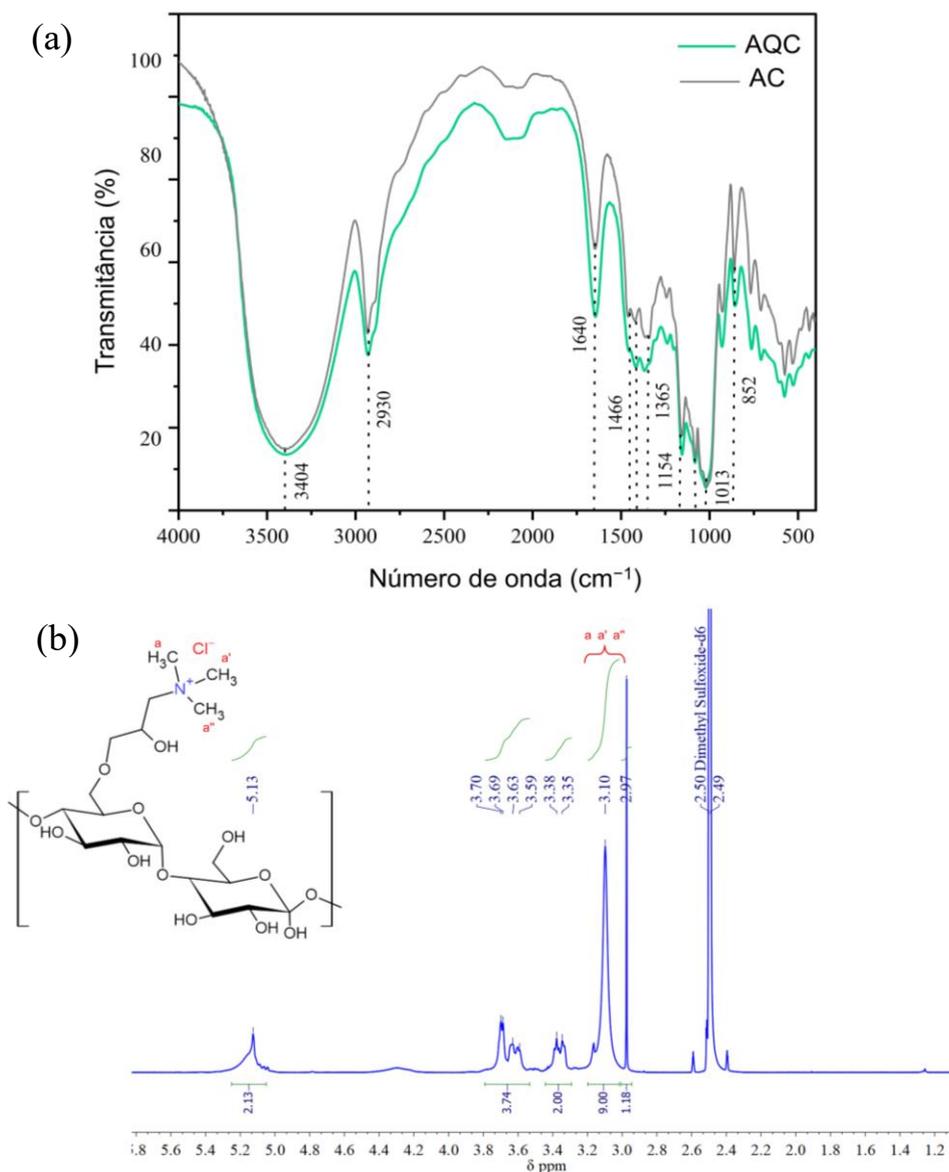
A partir da análise de GPC (TABELA 3 e FIGURA 19), a massa molar média para o AQC foi de  $2,07 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup>. Em comparação com trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, este foi um valor de massa molar médio maior em comparação com o amido de ciriguela nativo ( $9,70 \times 10^5$ ). A amostra apresentou apenas um pico de distribuição e índice de polidispersividade (PDI) de 1,25, sendo considerada moderadamente polidispersa. De acordo com Hoyos-Leyva et al. (2017), polímeros monodispersos possuem índice de polidispersividade (Mw/Mn) igual a 1,0. Índices maiores que 1,0 indicam polidispersividade e, portanto, maior heterogeneidade nas massas molares. Cui et al. (2023) em seu trabalho, modificaram o amido de mandioca com o mesmo agente quaternizante utilizado neste trabalho e as medidas de GPC mostraram um aumento na massa molar média, bem como um aumento na distribuição de massa molecular.

Figura 19 – GPC do amido quaternizado de ciriguela (*Spondias purpurea* L.)

Fonte: Elaborado pelo autor.

O AQC também foi caracterizado por FTIR e RMN  $^1\text{H}$  com o objetivo de identificar a presença do grupo ( $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ) em sua estrutura.

Figura 20 – (a) Espectros de FTIR e (b)  $^1\text{H}$  RMN de amido quaternizado de ciriguela (*Spondias purpurea* L.)



Fonte: Elaborado pelo autor.

No espectro FTIR (FIGURA 20a) foram observadas bandas de baixa intensidade entre 1365 a 1466  $\text{cm}^{-1}$  (estiramentos C–N) que podem indicar a presença do grupo quaternário (AMAR-LEWIS et al., 2021; CORREIA et al., 2021; ZHU; ZHANG; FENG, 2016). Além disso, as outras bandas presentes, como em 3404 ( $\nu\text{O-H}$ ), 2930 ( $\nu\text{C-H}$ ), 1154 ( $\nu\text{C-O}$ ) e 1013

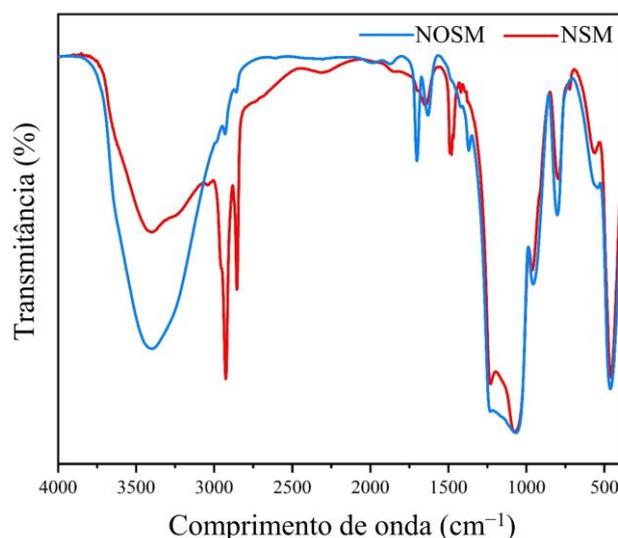
( $\nu\text{C-O-C}$ )  $\text{cm}^{-1}$ , são tipicamente cadeia polissacarídica do amido (CUI et al., 2023). As bandas características atribuídos ao estiramento C-N seriam em torno de  $1460 \text{ cm}^{-1}$ . Todavia, devido à presença de outras bandas mais intensas, diversos grupos funcionais podem apresentar sobreposição de bandas dificultando a identificação do agente catiônico. Além disso, o baixo grau de substituição também contribuiria para a baixa intensidade dessas bandas.

No espectro a de RMN de  $^1\text{H}$  do AQC na Figura 20b, o deslocamento em 3,10 ppm pode ser atribuído aos prótons metílicos do grupo  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  presente no grupo catiônico (CHPTAC). Os prótons do anel piranosídico são representados pelos deslocamentos de prótons H2 a H6 (unidade glicosídica) entre 3,70 a 3,35 ppm, deslocamento em 4,3 ppm para OH6 e em cerca de 5,13 para os prótons de OH2 e OH3 (AMAR-LEWIS et al., 2021; CUI et al., 2023; HAO; NIE; ZHANG, 2019; MARIADOSS et al., 2020). Assim, a introdução do grupo catiônico foi confirmada sendo corroborado juntamente com outros parâmetros analisados para o AQC.

### 3.3.1.3 Caracterização de nanoesferas ocas de sílica mesoporosa (NOSM)

As nanoestruturas responsáveis pela adsorção do bioativo OncoA no interior do compósito poroso são as nanoesferas ocas de sílica mesoporosa (NOSM). As NOSM foram sintetizadas utilizando CTAB como *template* e o processo de remoção do surfactante (CTAB) foi confirmado por FT-IR da amostra antes e após remoção (FIGURA 21).

Figura 21 – FTIR das NOSM antes e depois da remoção do *template*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma banda importante no grupo do surfactante ocorre em  $2800\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$  referente a estiramentos assimétricos e simétricos do grupo C-H e deslocamentos angulares C-H entre

1400 a 1500  $\text{cm}^{-1}$  (LI et al, 2019; MOZAFARINIA et al., 2021). Esta banda é muito intensa na amostra de NSM e a ausência dessas bandas na amostra de NOSM é observada após a remoção do *template*. Dessa forma, a remoção do *template* CTAB foi realizada eficientemente utilizando uma solução etanólica ácida sob aquecimento e refluxo. Além disso, outras bandas de estiramento características para ligações Si–O (400 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ ) e Si–OH (3000 a 3800  $\text{cm}^{-1}$ ) são observados em ambos os espectros típicas para materiais a base de sílica (CAI et al., 2017; MOZAFARINIA et al., 2021).

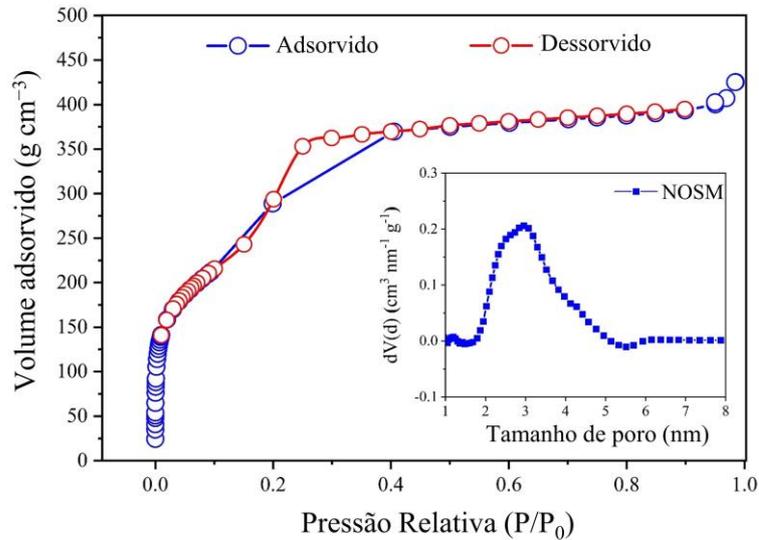
A formação de material com mesoporos foi confirmada por meio da isoterma de adsorção-dessorção de  $\text{N}_2$  a 77 K (FIGURA 22). A isoterma das NOSM apresentou padrão IV indicando a presença de materiais mesoporosos e histerese do tipo H2 indicando poros cilíndricos com gargalo estreito e morfologia do tipo garrafa, conforme classificação da IUPAC. As isotermas do tipo IV são típicas de materiais mesoporosos (associados ou não a microporos) com diâmetros de poros entre 2 e 50 nm (MOHAMED; ELMOTASEM; SALAMA, 2020; MOZAFARINIA et al., 2021). A curva de distribuição de tamanho de poros (FIGURA 22), mostrou apenas um único pico na curva de distribuição, demonstrando que as NOSM sintetizadas possuem mesoporos com tamanhos relativamente estreitos e bem definidos, assim como microporos pela região inicial da isoterma (LI et al., 2019). A amostra de NOSM apresentou área superficial elevada de 1703,62  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ , com volume de poro de 0,564  $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$  e com diâmetro de 2,96 nm calculados por meio de NL-DFT (TABELA 4). Dessa forma, as NOSM com área superficial elevada e um núcleo oco proporcionam materiais promissores para o carregamento e liberação controlada de fármacos e outras moléculas bioativas.

Tabela 4 – Parâmetros analisados para as NOSM.

Amostra	Parâmetros	Resultados ( $\pm$ DP)
NOSM	Tamanho médio (nm)	527,90 $\pm$ 37,40
	Índice de polidispersividade (PDI)	0,455 $\pm$ 0,072
	Volume total dos poros ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	425,31
	Volume do poro ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	0,56
	Área superficial ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	1703,62
	Tamanho de poro (nm) <sup>b</sup>	2,96

NOSM: Nanoesferas ocas de sílica porosa. <sup>b</sup> Os parâmetros de adsorção-dessorção de  $\text{N}_2$  da amostra NOSM pelo método moderno da teoria do funcional de densidade não local (NL-DFT).

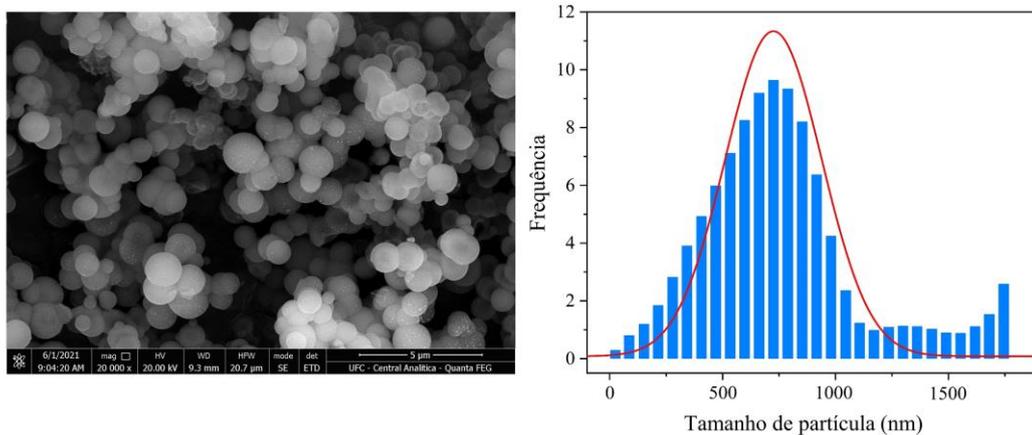
Figura 22 – Isoterma de NOSM e distribuição de tamanho de poros pelo método NL-DFT.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise de micrografia por MEV mostrou que as NOSM possuem estrutura esférica bem definida com superfície lisa e tamanhos variando de 500 nm a 1,6  $\mu\text{m}$ , sendo assim um material polidisperso (FIGURA 23).

Figura 23 – (a) micrografia por MEV e (b) distribuição granulométrica do NOSM por DSL.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O tamanho e a distribuição das nanopartículas (TABELA 3) foram determinados usando espalhamento de luz dinâmico (DLS) apresentando raio hidrodinâmico médio de  $527,90 \pm 37,40$  nm e índice de polidispersão de  $0,455 \pm 0,072$ . Assim, as nanoesferas de sílica podem ser consideradas como sendo moderadamente polidispersa. O tamanho de partícula obtido por DLS é diretamente influenciado pelo fenômeno de solvatação das moléculas de água, onde o diâmetro da partícula é medido a partir da camada de moléculas de água que estão

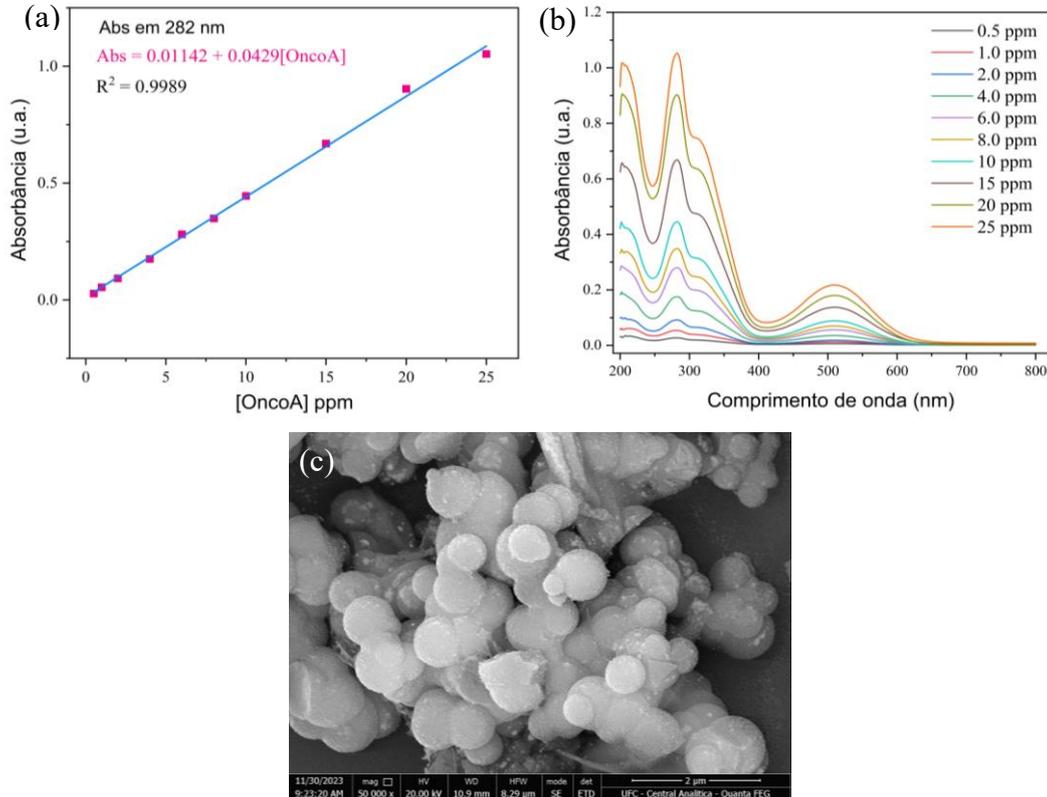
aderidas à superfície). Além disso, fenômenos de agregação também contribuem nas medidas de tamanho de partícula pelo método de espalhamento de luz dinâmico (MOHAMED; ELMOTASEM; SALAMA, 2020; MOZAFARINIA et al., 2021).

Li e colaboradores (2019) desenvolveram um novo método de síntese de nanoesferas ocas de sílica mesoporosa baseado em meio aquoso aquecido a 90 °C sob refluxo para eliminação do *template* CTAB. Em seu trabalho, eles obtiveram faixa de tamanho de partícula, tamanho de poro similar aos encontrados neste trabalho. No entanto, a área superficial foi consideravelmente menor do que a obtida neste trabalho, o que pode indicar uma menor eficácia na formação de núcleos ocas pelo método adotado. Assim, as nanoesferas ocas de sílica produzidas podem fornecer um meio de adsorção interessante para carreamento de fármacos em sistemas de liberação controlada, além de proteger fisicamente fármacos fotossensíveis (como a oncolixona A) ou passíveis de rápida degradação química em meios fisiológicos ou gastrointestinais.

### 3.3.2 Carreamento de bioativo OncoA

As nanoesferas ocas de sílica mesoporosa foram utilizadas como nanocarreadores de oncolixona A (NOSM@OncoA) para posterior incorporação em compósitos macroporosos 3D à base de nanofibrilas de celulose e amido catiônico reticulados. A capacidade de carreamento é importante para a definição de suas aplicações. Estudos de adsorção com NOSM realizados por Li et al. (2019) mostraram que a capacidade de carga varia entre 12 a 40% dependendo de algumas variáveis com a razão molar entre fármaco e carreador. A OncoA foi carregada por adsorção física durante 24 h em nanocarreadores mesoporosos pelo método de equilíbrio de adsorção na proporção molar de 1:10. Após adsorção e posterior centrifugação, obteve-se o sobrenadante que foi utilizado para determinar indiretamente (leitura em UV-Vis de alíquota do sobrenadante) a quantidade de OncoA adsorvida nos nanocarreadores. O percentual de carreamento por adsorção médio foi de  $26,07 \pm 1,36$  %. Esse resultado mostra que os NOSM podem carrear uma quantidade significativa de bioativos, agindo na proteção do bioativo em condições adversas até o momento de liberação no local apropriado. Os espectros UV-Vis das soluções de OncoA em diferentes concentrações são mostrados na Figura 24b. Como pode ser observado, a curva de absorção UV-vis é típica para a molécula de oncolixona A, sendo melhor observada em maiores concentrações (FERREIRA et al., 2023; SOUSA et al., 2021). O pico máximo de absorção em aproximadamente 282 nm e os valores de absorbância nesse comprimento de onda, de cada concentração, foram utilizados para plotar a curva de calibração mostrada na Figura 24a.

Figura 24 – (a) Espectros UV-Vis de OncoA em diferentes concentrações em PBS (pH = 7,4) a 25 °C; (b) Curva de calibração obtida de [OncoA] vs absorbância a 282 nm, e (c) Micrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura (50000×) de NOSM@OncoA (após adsorção).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A micrografia obtida por MEV das NOSM após o processo de adsorção mostram que ocorreu depósitos do bioativo na superfície esférica das nanoesferas de sílica, possivelmente durante o processo de liofilização (FIGURA 24c). Assim, além dos processos de adsorção física, a OncoA também foi carregada por impregnação física na superfície do nanocarreador mesoporoso que pode acarretar em um *burst* inicial na liberação do bioativo.

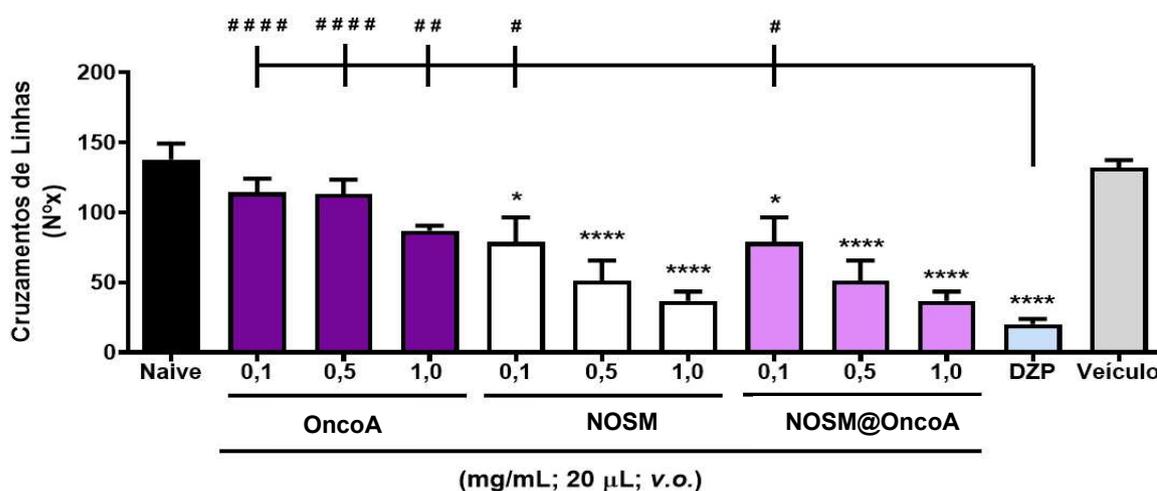
### 3.3.3 Avaliação da segurança não clínica in vivo

Estudos de biossegurança de nanomateriais podem ser realizados utilizando o modelo animal do zebrafish (*Danio rerio*) já amplamente utilizado para avaliação da toxicidade de biomateriais nanoestruturados. O uso desse modelo decorre principalmente devido a facilidade de manuseio dos animais, além de possuir uma fase embrionária visível e passível de controle, e por possuir semelhanças a nível molecular e fisiológico com os seres humanos (KRISHNARAJ; HARPER; YUN, 2017). Este modelo animal pode ser usado para avaliar a toxicidade de vários tipos de nanomateriais (por exemplo, nanomateriais metálicos, sílica,

metal-orgânicos e poliméricos) no que diz respeito à neurotoxicidade, taxa de sobrevivência animal, alterações morfológicas e locomotoras, entre outros. No geral, as propriedades toxicológicas dos nanomateriais estão associadas a parâmetros como dosagens e ao estágio de desenvolvimento do animal, mas também às propriedades físico-químicas desses nanomateriais (JIA et al., 2019).

Os peixes ( $n = 6$  grupo<sup>-1</sup>) foram selecionados aleatoriamente e tratados oralmente com 20  $\mu$ L de OncoA ou amostra NOSM@OncoA ou controle contendo apenas suspensão de NOSM em diferentes concentrações. Um grupo de animais sem qualquer tratamento (grupo Naive e grupo veículo) foi incluído. Durante a análise, a atividade locomotora (AL) dos zebrafish não diminuiu quando a OncoA isolado foi testada, sendo significativamente semelhante ( $p > 0,05$ ) aos controles (Naive ou Vehicle). Os resultados da AL são apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Efeito das amostras sobre a atividade locomotora de zebrafish adulto (*Danio rerio*) no Teste de Campo Aberto (0-5 min).



Naive - animais não tratados. v.o. - Administração oral. OncoA - oncoalexona A. NOSM - nanoesferas ocas de sílica mesoporosa. NOSM@OncoA - Nanoesferas ocas de sílica mesoporosa carregadas com oncoalexona A. DZP - diazepam (10 mg mL<sup>-1</sup>; 20  $\mu$ L; v.o.). Veículo - água bidestilada (20  $\mu$ L; v.o.). Os valores representam a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM) para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey (\* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  vs. Naive or Veículo; # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; #### $p < 0,0001$  vs. DZP).

No entanto, houve alteração da atividade locomotora dos animais tratados com NOSM ou NOSM@OncoA, ambos tratados com 0,1 ou 0,5 ou 1,0 mg mL<sup>-1</sup> (20  $\mu$ L; v.o.), que foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,0001$ ) dos controles (Naive ou Veículo). Assim, as nanoesferas de sílica influenciaram na capacidade locomotora dos animais no experimento

(com e sem OncoA adsorvido). Assim, indicando-se, assim, uma possível atividade sedativa relacionada ao aumento da concentração de NOSM, que já foi inclusive relatada por Li et al (2017) para nanopartículas de SiO<sub>2</sub>. A atividade locomotora é um importante indicador comportamental a ser avaliado em fármacos que podem afetar o sistema nervoso central (SOUSA et al., 2021). No entanto, observa-se que a presença da OncoA não interferiu na atividade locomotora quando presente na amostra de NOSM@OncoA, indicando assim que a atividade sedativa é ligada a presença dos nanocarreadores a base de sílica e diretamente relacionados ao aumento da concentração destes. Ainda assim, as nanopartículas de sílica serão inseridas na matriz polimérica do *scaffolds* e esses possíveis efeitos adversos poderão ser reduzidos para futuras aplicações *in vivo* ou aceitáveis diante dos benefícios terapêuticos oferecidos.

Após a análise de toxicidade aguda por 96 h, não foram registrados animais mortos indicando que tanto as NOSM@OncoA quanto a OncoA livre não foram tóxicas para os zebrafish ao longo período avaliado. A partir dessa análise também é possível determinar a concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL<sub>50</sub>) em cada grupo. A concentração CL<sub>50</sub> não foi encontrada para as concentrações testadas sendo estimada como sendo >1,0 mg mL<sup>-1</sup> conforme dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados dos ensaios de toxicidade aguda em zebrafish adultos.

Amostra	Mortalidades de zebrafish adultos				96 h de análise CL <sub>50</sub> (mg mL <sup>-1</sup> )/IC
	Veículo	0,1 mg mL <sup>-1</sup>	0,5 mg mL <sup>-1</sup>	1,0 mg mL <sup>-1</sup>	
OncoA	0	0	0	0	> 1,0
NOSM	0	0	0	0	> 1,0
NOSM@OncoA	0	0	0	0	> 1,0

Veículo: água bidestilada (Controle; 20 µL; *v.o.*). OncoA: Oncocalyxone A (20 µL; *v.o.*). NOSM: nanoesferas de sílica (20 µL; *v.o.*). NOSM@OncoA: nanoesferas de sílica com oncocalexona A (20 µL; *v.o.*). CL<sub>50</sub>: concentração letal para matar 50% dos zebrafish adultos; IC: intervalo de confiança.

Nanomateriais à base de sílica são bem relatados por sua baixa citotoxicidade e propriedades inertes (KRISHNARAJ; HARPER; YUN, 2017; LIU et al., 2015). No entanto, alguns estudos relataram potenciais efeitos adversos em organismos vivos, especialmente quando associados a diferentes ligantes de superfície (JIA et al., 2019). Liu et al (2015) em seu

trabalho com a funcionalização de nanopartículas de sílica mesoporosa com grupos amins quaternário, relataram que estes materiais seriam tóxicos para embriões de zebrafish. Assim essa observação corrobora com dados de outras pesquisas que relatam alguns efeitos de toxicidade quando alguns grupos funcionais são graftizados na superfície de materiais a base de sílica (BEAGAN et al. 2020). Assim, de acordo com o experimento realizado neste trabalho, as nanoesferas de sílica mesoporosa apresentaram possível efeito sedativo, como um benzodiazepínico (diazepam) e uso promissor na composição de nanomateriais pois não apresentaram letalidade ao longo de 96 horas, indicando assim uma faixa de biossegurança nas concentrações testadas.

### **3.3.4 Caracterização dos compósitos porosos de CNFCp-gMBA-AQC/NOSM@OncoA**

#### **3.3.4.1 Síntese, intumescimento e porosidade dos compósitos porosos**

A síntese dos CPs à base de CNFCp-gMBA-AQC foi realizada pela técnica de polimerização radicalar *in situ* utilizando MBA como agente de reticulação e KPS/TMPDA como iniciador/catalisador (FIGURA 13). TMPDA atua como um agente redutor e, assim, melhora a reatividade do KPS. Inicialmente, a decomposição das ligações peroxila ( $-OO-$ ) do KPS resulta na produção de radicais ânion sulfato ( $SO_4^{\cdot-}$ ), que reagem ao meio aquoso gerando radicais hidroxila ( $HO\cdot$ ). Esses radicais abstraem átomos de hidrogênio dos polissacarídeos AQC e CNFCp, produzindo macro radicais. O MBA é graftizado nas cadeias polissacarídicas, através de um mecanismo acceptor de Michael, formando ligações covalentes entre as cadeias dos polissacarídeos e o grupo  $-CH=CH_2$  das extremidades do agente reticulante (BERA et al., 2020). A porcentagem de reticulação foi determinada por gravimetria, onde foi analisado a diferença de massa dos polissacarídeos antes e após a reação, apresentando. Os valores de reticulação foram encontrados entre 8-24% (TABELA 6). Assim, os resultados indicaram que houve reticulação das cadeias dos polissacarídeos sendo observado um menor percentual de reticulação em matriz formada apenas por celulose. Essa observação pode ser explicada pela menor disponibilidade das hidroxilas na cadeia de celulose nas nanofibrilas. Lin et al. (2023) utilizando essa mesma técnica gravimétrica, obtiveram 15,3% de grafitização em hidrogéis preparados com amido, usando o MBA, para o encapsulamento de eugenol.

Os *scaffolds* foram preparados a partir da matriz polimérica reticulada (CNFCp-gMBA-AQC) que posteriormente foi incorporado com PVA e as nanoesferas ocas de sílica porosa carregadas com Oncocalixona A. A preparação dos *scaffolds* por liofilização permitiu a formação de macroporos na estrutura 3D do compósito, o que garante a permeação eficiente de

princípios ativos através dos fluidos corporais além de facilitar a vascularização em processos de regeneração tecidual (MENSAH et al., 2023). As características como intumescimento, densidade e porosidade dos compósitos porosos produzidos podem ser observadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros analisados para CP com diferentes proporções de matriz polimérica.

Determinação	Amostras			
	CP1	CP2	CP3	CP4
Teor de reticulação (%)	24,12±6,50	20,28±3,40	21,31±8,22	8,86±2,03
Intumescimento (%)	1607,3±32,04	1448,9±65,10	1301,25±23,17	1609,24±46,09
Fração solúvel (%)	20,68±2,47	24,95±1,09	26,09±1,86	17,79±0,77
Densidade (g.cm <sup>-3</sup> )	0,173±0,04	0,193±0,08	0,221±0,05	0,224±0,09
Porosidade (%)	22,23±1,47	25,62±1,92	20,63±2,24	19,89±6,68

CP: Compósito poroso.

O intumescimento é um indicador da capacidade de preenchimento por componentes líquidos na estrutura tridimensional de um material poroso (MENSAH et al., 2023). A formação de macroporos permite ainda, uma maior mobilidade das moléculas de solvente através da rede polimérica. Além disso, a natureza do reticulante juntamente com a superfície rica em hidroxilas (polímeros e sílica) favorece uma forte interação entre a matriz híbrida e solventes próticos. Todos os compósitos porosos apresentaram uma elevada taxa de intumescimento em meio aquoso tamponado, aproximadamente entre 1300% e 1600%, o que é justificado pelos materiais de partida utilizados (ricos em hidroxilas) e pelo método de preparo dos *scaffolds* (liofilização).

Algumas das principais características dos biomateriais aplicados aos processos de regeneração celular e liberação de fármacos estão relacionadas à sua porosidade. Neste trabalho, a capacidade de permeação de fluidos pela estrutura dos CPs foi avaliada através da porosidade aparente. Os resultados (TABELA 6) revelam que a porosidade dos compósitos ficou entre 17 e 24%. A porosidade dos CPs com maior porcentagem de CNFCp (CP3 e CP4) foi menor em relação aos demais, o que também corrobora com a maior densidade apresentada por esses compósitos. A diminuição da porosidade deveu-se possivelmente à redução do tamanho/volume de poros nas amostras devido à maior interação e maior empacotamento das nanofibrilas de celulose.

Os compósitos porosos apresentaram redução de materiais solúveis em CP4 formado apenas por reticulação de CNFCp com MBA. Dessa forma, a redução da solubilidade em água é favorecida pela maior proporção de celulose nanofibrilada. As fibrilas de celulose apresentam

cadeias polissacarídicas com uma estrutura cristalina possuindo extensas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, o que impede a disponibilidade de hidroxilas com o solventes por interações do tipo ligações de hidrogênio, tornando assim materiais celulósicos menos hidrofílicos (ZHU et al., 2017).

#### 3.3.4.2 Estrutura química

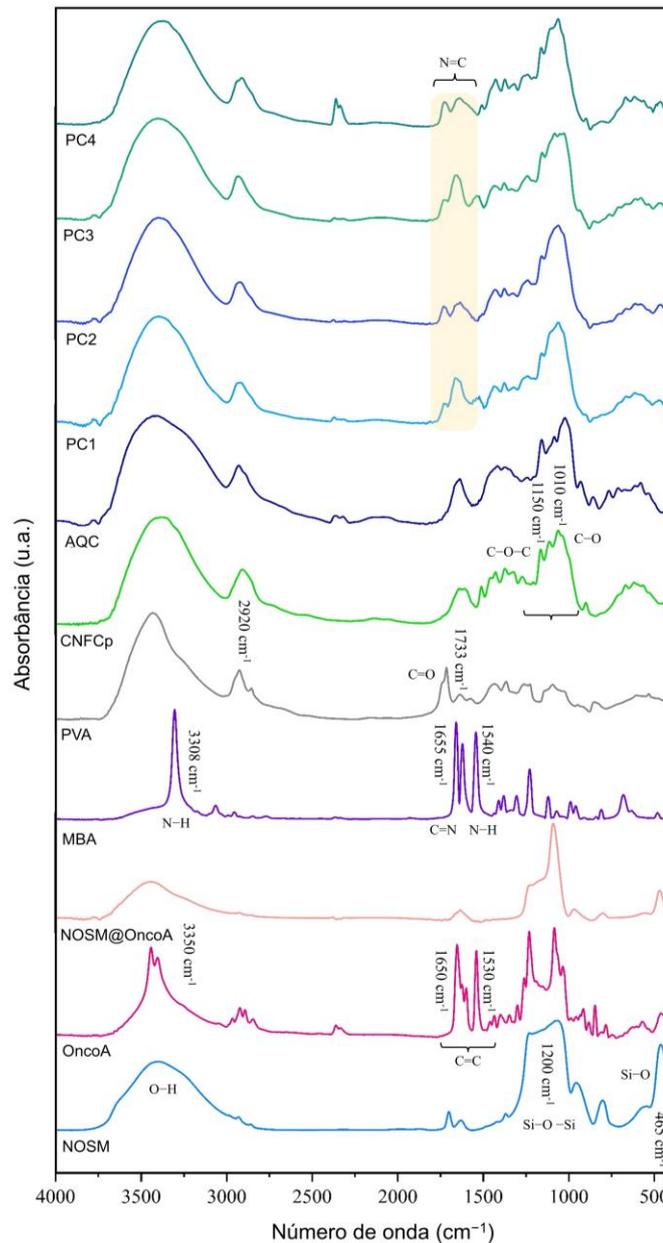
A estrutura química dos CPs e das NOSM@OncoA incorporadas foi avaliada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O estudo de FTIR foi utilizado para confirmar a reticulação da matriz polimérica com MBA e analisar as interações entre a matriz polimérica e os nanocarreadores mesoporosos contendo oncoalexona A. A Figura 26 apresenta os espectros de FTIR dos materiais de partida (AQC, CNFCp, PVA, NOSM e OncoA) e CP1 a 4 contendo as NOSM@OncoA. Bandas típicas de polímeros ricos em hidroxila estão presentes em todos os espectros de CPs.

Uma banda larga em 3000 e 3800  $\text{cm}^{-1}$  correspondendo a estiramentos O–H de ligações de hidrogênio. A banda para estiramento N–H (também de ligações de hidrogênio) é observada na mesma região para o MBA (só que mais estreita, como é esperado para o tipo de ligação). O pico em 2931  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído às vibrações de estiramento C–H (KHANJANZADEH et al., 2018; MOZAFARINIA et al., 2021). As bandas relacionadas à deformação angular de N–H e ao estiramento C=N de amidas foram observadas em  $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$  e  $1655 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, indicando que o processo de reticulação foi bem sucedido (LIN et al., 2023). As bandas de estiramento C=C referentes à estrutura quinona presente na molécula de OncoA observada em torno de  $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$  são possivelmente sobrepostas por bandas mais intensas da região de *fingerprint* dos polissacarídeos nos compósitos (SOUSA et al., 2021). O álcool polivinílico foi adicionado como agente plastificante às formulações, ajudando a fortalecer a estrutura tridimensional após secagem. O PVA é um polímero hidrofílico obtido a partir da hidrólise do poliacetato de vilina (PVAc). Assim, a banda na região de 1730  $\text{cm}^{-1}$  (encontrado no espectro de PVA puro) pode estar relacionada presença de grupos acetatos ( $-\text{COOCH}_3$ ) remanescentes presentes na cadeia do álcool polivinílico (KHLYUSTOVA et al., 2021).

Bandas entre 1000 e 1100  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas às vibrações de estiramento C–O e C–O–C do anel piranosídico que são típicas para a região impressão digital das cadeias de polissacarídeos (SILVA et al. 2019). As bandas em 1656 e 1580  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas ao grupo catiônico do amido modificado podem estar sobrepostas por outras bandas de maior intensidade e também por interações entre os grupos  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  com grupos carregados negativamente (SHARMA; SWETHA; ROY, 2019). Por fim, as bandas em  $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$  referentes às ligações

Si–O–Si e a  $465\text{ cm}^{-1}$  para as ligações Si–O podem ser observadas também para os espectros dos compósitos CP1 a CP4 (MOZAFARINIA et al., 2021).

Figura 26 – Espectros FTIR de scaffolds e dos materiais de partida.



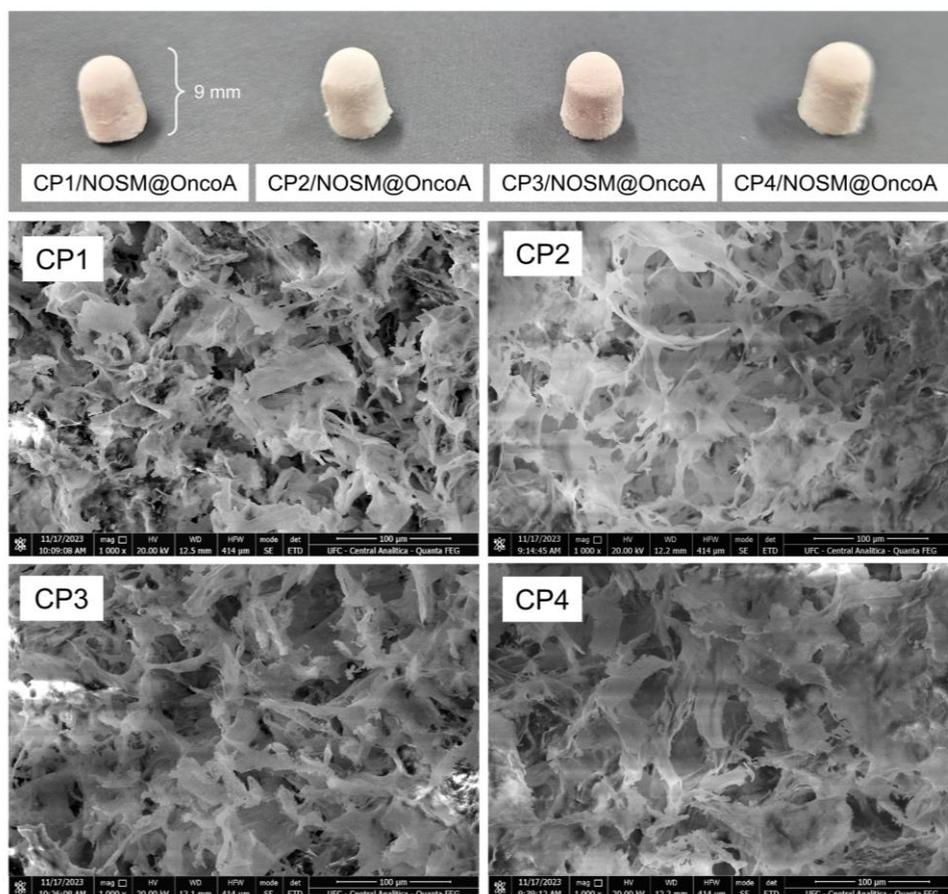
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.4.3 Análise morfológica

A morfologia da superfície dos CPs, com diferentes proporções de CNFCp e AQC reticulado, foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), como mostra a Figura 27. As micrografias da superfície dos *scaffolds* foi realizado usando aumento de  $1000\times$  onde foi possível observar a rede de macroporos da superfície do biomaterial. Fotografias

também foram apresentadas para expor o formato dos *scaffolds* (altura de 9 mm e diâmetro de 6,5 mm aproximadamente) após o processo de retirada dos moldes.

Figura 27 – Fotografias e micrografias por MEV (1000×) de *scaffolds* nas diferentes formulações: CP1, CP2, CP3 e CP4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

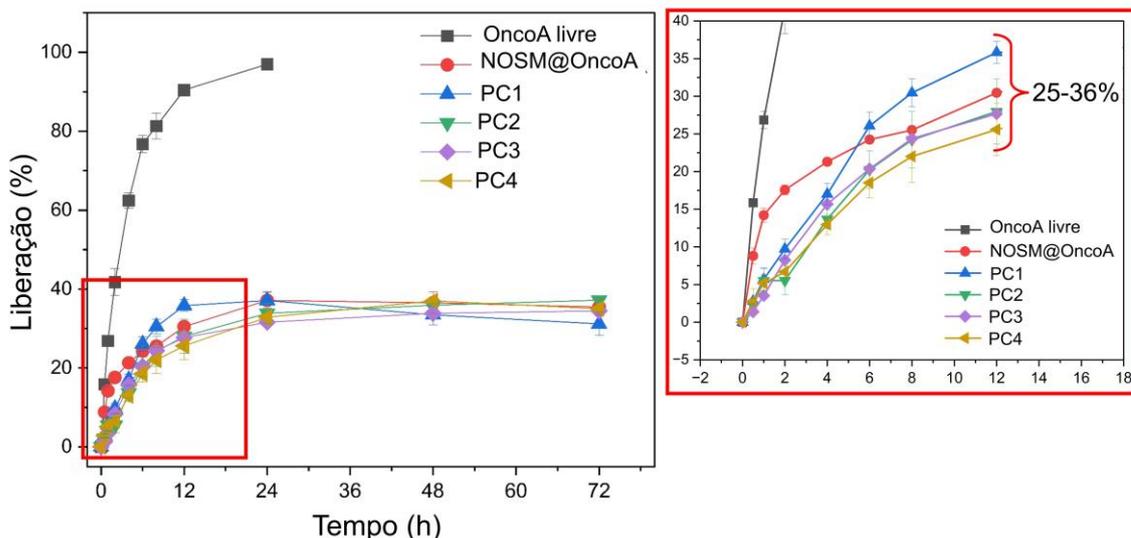
Imagens produzidas por MEV demonstraram que os CPs possuem uma rede tridimensional de nanofibras distribuídas aleatoriamente. As cadeias de polissacarídeos, especialmente a celulose realizam interações de hidrogênio eficientes (SOUSA et al., 2019), formando hidrogéis (previamente à preparação dos compósitos) com maior uniformidade e uma rede mais densa e ordenada após a remoção de água no processo de liofilização (MENEGUIN et al., 2021). Dessa forma é esperado um maior empacotamento dos poros produzidos nos compósitos com maior proporção de celulose. Além disso, as interações entre as cargas positivas do AQC e as cargas negativas da CNFCp, confirmadas por potencial  $\zeta$ , auxiliam na formação de uma rede tridimensional mais forte. Somando-se a isso, a grafitação com o MBA contribui com uma estrutura tridimensional mais rígida. Em testes de imersão em água, observou-se que as formulações com maior proporção de AQC apresentaram menor resistência

e iniciaram o processo de desagregação em pouco tempo de imersão. O contrário ocorreu com os PCs com maior proporção de NFCCp. No geral, nos CPs foram observadas aberturas de macroporos com reduzida uniformidade. Possivelmente, forças atrativas entre os polímeros polieletrônicos prevaleceram o que podem ter dificultado o aprisionamento de água na rede do hidrogel (SHARMA; SWETHA; ROY, 2019).

### 3.3.5 Ensaio de liberação *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* de OncoA nos *scaffolds* e nanoesferas ocas de sílica mesoporosa foram realizados em meio tamponado com pH 7,4 (simulando o meio fisiológico). Este meio tamponado foi selecionado com o objetivo de avaliar o perfil de liberação de OncoA carregados em compósitos nanoestruturados para serem utilizados como implantes de liberação local em tecido ósseo, além de fornecer suporte para o crescimento celular e regeneração tecidual. O perfil de dissolução da OncoA, bem como das NOSM@OncoA e dos compósitos porosos (CP1-4) (carregados com NOSM@OncoA) são apresentados na Figura 28. A condição *sink* foi obtida a partir da quantidade de 2208  $\mu\text{g}$  de OncoA utilizadas nos CPs e NOSM@OncoA e no caso de 100% do bioativo ser liberado no meio receptor (10 mL) teríamos a concentração máxima de 220,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . No entanto, a concentração de saturação da oncolixona A em tampão PBS (pH = 7,4) é de 828  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (TAVARES et al., 2019) e 1/3 dessa saturação corresponderia a 276  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para o OncoA livre, utilizou-se 2 mL de solução 2008  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Assim a concentração do bioativo OncoA satisfaz a condição *sink* para o ensaio de liberação.

Figura 28 – Porcentagem média ( $\pm$  desvio padrão) de OncoA liberado em pH 7,4 por 72 h.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em meio PBS, a OncoA pura apresentou perfil de liberação rápida (efeito *burst*), e  $96,95 \pm 1,12\%$  do bioativo foi liberado em 24 h. As NOSM@OncoA apresentaram uma liberação inicial rápida nas primeiras 4 horas ( $21,30 \pm 0,12\%$ ) em comparação com os CPs. Esse *burst* inicial pode estar relacionado com OncoA depositada na superfície das NOSM conforme mostrado na micrografia da Figura 24c. A liberação ao final de 72 h permaneceu em torno de 37%, mostrando assim um perfil de liberação controlada. Liu et al., 2019 observaram um perfil de liberação (24% nas primeiras 2 h) semelhante a este trabalho, quando realizaram a adsorção física de carvedilol em nanoesferas ocas de sílica mesoporosa e posterior liberação em tampão ácido (pH 1,2 e 6,4). O perfil de liberação do carvedilol foi controlada e uma das razões dadas foi o preenchimento e armazenamento do fármaco no núcleo oco das NOSMs, que seriam então liberados lentamente através dos canais mesoporosos de dentro para fora.

Todos os CPs apresentaram um perfil de liberação controlada com liberação de 18 a 26% da massa acumulada de OncoA nas primeiras 6 horas do ensaio de liberação, o que é atribuído principalmente ao fármaco adsorvido na superfície das nanofibras (MURUGAPANDIAN; CLEMENT; UTHIRAPATHY, 2023). Entretanto, possivelmente devido à composição distinta dos compósitos porosos, algumas diferenças podem ser observadas nos perfis de liberação. O CP1 apresentou maior liberação inicial, o que pode estar relacionado à menor resistência de sua estrutura ao meio aquoso. O AQC é o componente majoritário no composto CP1 (75% na matriz reticulada). O amido catiônico é mais solúvel em meio aquoso e, portanto, compósitos com maior proporção de AQC foram mais suscetíveis à degradação da matriz polimérica quando expostos a meio hidrofílico. O CP4 apresentou perfil de liberação mais controlado que os demais. Após 12 horas,  $25,59 \pm 3,49\%$  foram liberados e, ao final de 72 h,  $35,04 \pm 0,1\%$  de OncoA acumulada foi liberada no meio receptor. Possivelmente, a maior resistência das nanofibrilas de celulose ao meio aquoso (mesmo com menor % de reticulação) possibilitou uma liberação mais controlada de OncoA ao longo do período de ensaio. Somando-se a isso, outros fatores precisam ser considerados, como a possível melhor compatibilidade do fármaco com a matriz polimérica e os mecanismos de liberação envolvidos.

O transporte e liberação de fármacos em sistemas farmacêuticos envolvem múltiplos estágios causados por diferentes fenômenos físicos ou químicos. Assim, torna-se complexo definir um modelo matemático que descreva corretamente todos os processos envolvidos (YANG et al., 2022). As porcentagens acumuladas de liberação *in vitro* de OncoA livre, além de CPs, e NOSM@OncoA foram ajustadas nos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Elovich, Higushi e também no modelo Korsmeyer-Peppas para determinar o mecanismo de liberação do fármaco. O coeficiente de correlação  $R^2$  foi utilizado como referência para

estimar a adequação de cada modelo. Os parâmetros cinéticos dos modelos matemáticos aplicados são apresentados na Tabela 7 e os gráficos de ajustes aos modelos matemáticos nas Figuras 29 e 30.

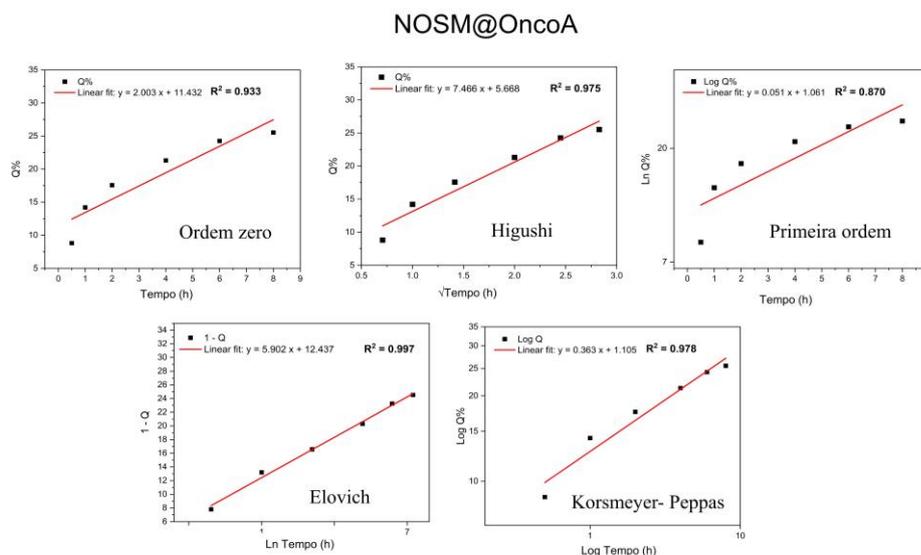
Tabela 7 – Parâmetros cinéticos de liberação para OncoA, NOSM@OncoA e CP1 a 4.

Amostra	Modelos matemáticos						J ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ $\text{h}^{-1}$ )	Tempo de latência (h)
	Ordem zero	Primeira ordem	Higushi	Elovich	Korsmeyer-Peppas			
	$R^2$	$R^2$	$R^2$	$R^2$	N	$R^2$		
OF	0,978	0,904	0,993	0,993	0,597	0,994	2,66±0,37	6,55±1,69
NC	0,933	0,870	0,975	0,997	0,363	0,978	1,55±0,29	9,70±1,30
CP1	0,995	0,935	0,993	0,960	0,857	0,998	3,04±0,17	1,74±0,77
CP2	0,991	0,938	0,981	0,941	0,839	0,978	2,43±0,18	1,15±0,84
CP3	0,987	0,893	0,998	0,978	1,034	0,991	2,51±0,22	1,15±0,98
CP4	0,995	0,952	0,991	0,954	0,739	0,994	2,11±0,11	1,84±0,51

OF = OncoA livre; NC = NOSM@OncoA; J = Fluxo em estado estacionário; n = Expoente da difusão.

O modelo de Elovich descreve o processo de liberação do fármacos por meio de um processo de difusão heterogêneo e esse modelo é bastante utilizado em ajustes de difusão em processos de adsorção e dessorção em materiais porosos (GONG et al., 2023; MENG et al., 2020). A partir das informações apresentadas na Tabela 7, pode-se inferir que o modelo de Elovich poderia ser aplicável ao sistema de liberação sustentada de NOSM@OncoA, pois apresenta um ajuste aceitável ( $R^2 = 0,99$ , FIGURA 29). Os modelos de ordem zero, Higushi e Korsmeyer-Peppas apresentaram melhores ajustes para os compósitos porosos ( $R^2 = 0,97 - 0,99$ ). Um sistema de liberação de ordem zero representa a liberação controlada do fármaco a uma taxa constante (mantendo a faixa terapêutica). No entanto, o modelo de ordem zero é mais adequado para situações em que a estrutura de liberação não sofre desintegração (REBOUÇAS et al, 2023). Assim, o modelo de Higushi seria mais adequado para ajustar a liberação nos CPs pois estes utilizam de uma matriz polimérica passível a processos de intumescimento, relaxamento e erosão. O modelo de Higuchi descreve a liberação de fármacos com base na difusão Fickiana ou Caso I ( $n \leq 0,45$ ), em que a taxa de difusão é inferior à taxa de relaxamento da cadeia polimérica (JASSO-GASTINEL, 2017).

Figura 29 – Modelos matemáticos ajustados para a cinética de liberação de OncoA nos nanocarreadores mesoporosos.



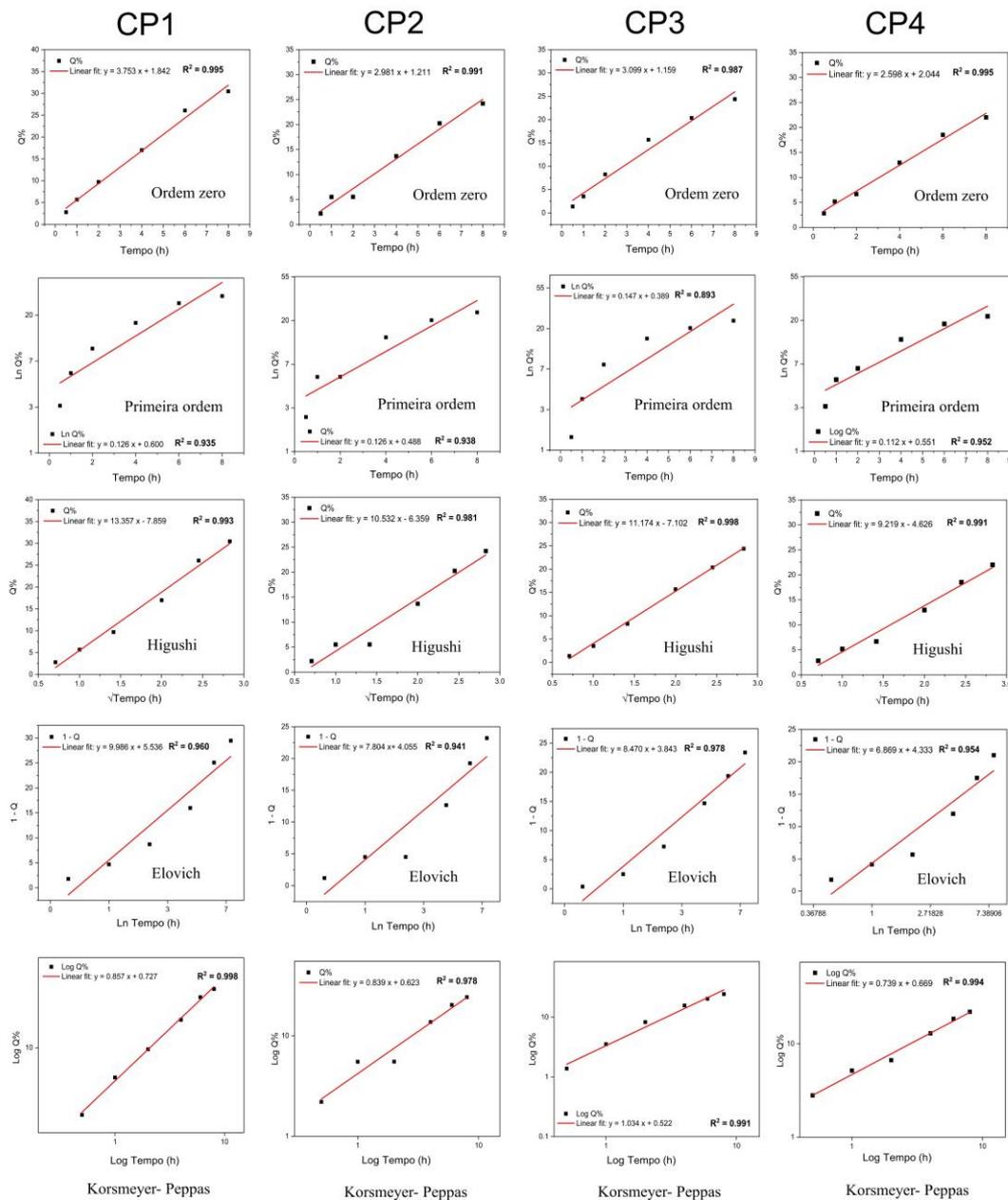
Fonte: Elaborado pelo autor.

O modelo de Korsmeyer-Peppas tem sido empregado na análise do mecanismo de liberação de fármacos *in vitro* para distinguir diferentes mecanismos de liberação: liberação Fickiana (liberação por difusão controlada), ocorre quando  $n \leq 0,45$ ; o processo de liberação por intumescimento da matriz polimérica ocorre no transporte de caso II quando  $n = 0,89$ ; o super caso II de transporte, que envolve dissolução do polímero e inchamento ou relaxamento da cadeia polimérica, ocorre quando  $n > 0,89$ ; e a liberação não-Fickiana (transporte anômalo) ocorre quando o valor de  $n$  está entre 0,45 e 0,89 e envolve uma combinação dos mecanismos de difusão e transporte do Caso II (REBOUÇAS et al., 2023; YANG et al., 2022). O mecanismo de liberação do fármaco pode ser identificado no modelo de Korsmeyer-Peppas a partir do ajuste linear dos pontos referentes a 60% de liberação ativa no intervalo de tempo com perfil mais próximo do linear (REBOUÇAS et al., 2023). Para os modelos aplicados, foram utilizados apenas os pontos das primeiras 8 h de liberação ( $\leq 60\%$  do total liberado). O modelo de Korsmeyer-Peppas mostra-se o mais adequado para avaliar o mecanismo de liberação dos CPs ( $R^2 = 0,97-0,99$ ).

De acordo com os valores do expoente da difusão (TABELA 7), os sistemas de nanocarreadores baseados em NOSM@OncoA possuem um mecanismo de liberação controlado por difusão Fickiana ( $n \leq 0,45$ ) onde há um fluxo de um maior gradiente de concentração para um menor gradiente de concentração. Os compósitos CP1, CP2 e CP4 apresentaram valores de  $n$  de 0,85, 0,83 e 0,74, respectivamente. Assim, estes compósitos

apresentaram um mecanismo de difusão não-Fickiana ( $0,45 < n < 0,89$ ), sendo um processo combinado de difusão e transporte do caso II. Para o CP3 ( $n > 0,89$ ) o mecanismo de liberação mais adequado é o super caso II de transporte (associação entre transporte/difusão). Este tipo de mecanismo de liberação ocorre através de um processo de sorção, tensão e relaxamento das cadeias poliméricas e inchamento da parte externa. Assim, ocorre uma combinação de difusão e dissolução ao mesmo tempo que a matriz polimérica sofre processos de intumescimento e erosão (REBOUÇAS et al., 2023; YANG et al., 2022).

Figura 30 – Modelos matemáticos ajustados para a cinética de liberação de OncoA nos *scaffolds*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de fluxo em estado estacionário (J) para a liberação de OncoA dos compósitos CP1 a CP4 foram maiores do que para o sistema NOSM@OncoA. Esse comportamento pode ser explicado pela pré-liberação que ocorre na matriz polimérica do *scaffold* durante o preparo em meio aquoso. Essa pré-liberação dos bioativos nas fibras da matriz polimérica podem ser responsáveis pelo *burst* inicial no teste de liberação desses compósitos. Os valores de tempo de latência foram próximos para todos os compósitos preparados.

## CAPÍTULO IV

### 4 CONCLUSÃO

Neste trabalho nanomateriais de celulose e amido catiônico foram produzidos a partir de matrizes de polissacarídeos de espécies vegetais *C. procera* e *S. purpurea* L. com biomassa de baixo valor agregado. Ambos os polissacarídeos nativos foram transformados em produtos de maior valor agregado. Assim, os métodos de hidrólise e tratamento ultrassônico foram eficazes na produção de nanofibrilas de celulose com dimensões nanométricas, assim como a síntese do amido catiônico de baixo grau de substituição também foi realizada com sucesso. O processo de reticulação foi conduzido de forma satisfatória e os parâmetros sugerem uma promissora aplicação como componentes de matrizes poliméricas em biomateriais mais resistentes a meios aquosos. Paralelamente, nanocarreadores à base de sílica mesoporosa com elevada área de superfície e tamanho nanométrico foram sintetizados e mostraram-se promissores como agentes de adsorção de onocalixona A para aplicação anticâncer. Os *scaffolds* à base de polissacarídeos modificados e reticulados foram produzidos com sucesso pelo método de liofilização apresentando macroporos não ordenados que favorecem processos de vascularização e adesão celular, assim como a difusão de bioativos. Além disso, os nanocarreadores de sílica contendo onocalixona A mostraram-se biosseguros em seu uso, não apresentando toxicidade aguda em modelo *in vivo* de zebrafish nas concentrações testadas. Os *scaffolds* apresentaram ainda um perfil de liberação controlada que pode ser uma estratégia promissora para liberação local *via* implante em tecido ósseo, sendo as formulações com maior percentual de celulose mais resistentes a degradação em meio aquoso e, portanto, mais promissores para a aplicação destinada.

## REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, A. G.; NAGEH, H.; ABDO, S. M.; ABDALLA, M. S.; AMER, A. A.; ABDAL-HAY, A.; BARHOUM, A. A Review of 3D Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Principles, Fabrication Techniques, Immunomodulatory Roles, and Challenges. **Bioengineering**, [s.l.], v. 10, p. 204, 2023.
- ALMEIDA, R. R.; GALLO, J.; DA SILVA, A. C. C.; DA SILVA, A. K. O.; PESSOA, O. D. L.; ARAÚJO, T. G.; LEAL, L. K. A. M.; FECHINE, P. B. A.; BAÑOBRE-LÓPEZ, M.; RICARDO, NÁGILA M. P. S. Preliminary Evaluation of Novel Triglyceride-Based Nanocomposites for Biomedical Applications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 28, p. 1547-1556, 2017.
- AMAR-LEWIS, E.; BUARON, N.; CHINTAKUNTA, R.; BENAFSHA, C.; GOLDBART, RIKI; TRAITEL, T.; PRASAD, M.; ELKABETS, M.; KOST, J. Quaternized Starch-Based Composite Nanoparticles for siRNA Delivery to Tumors. **ACS Applied Nano Materials**, [s.l.], v. 4, n. 2, p. 2218-2229, 2021.
- ARELLANO-AGUILA, O.; SOLIS-ANGELES, S.; SERRANO-GARCÍA, L.; MORALES-SIERRA, E.; MENDEZ-SERRANO, A.; MONTERO-MONTOYA, R. Use of the Zebrafish Embryo Toxicity Test for Risk Assessment Purpose: Case Study. **Journal of Fisheries Sciences.com**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 052-062, 2015.
- AYED, E.B.; MAGNIN, A.; PUTAUX, J.; BOUFI, S. Vinyltriethoxysilane-functionalized starch nanocrystals as Pickering stabilizer in emulsion polymerization of acrylic monomers. Application in nanocomposites and pressure-sensitive adhesives. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 578, p. 533-546, 2020.
- BEAGAN, A., LAHMADI, S., ALGHAMDI, A., HALWANI, M., ALMEATAQ, M., ALHAZAA, A., ALOTAIBI, K., ALSWIELEH, A. Glucosamine Modified the Surface of pH-Responsive Poly(2-(diethylamino)ethyl Methacrylate) Brushes Grafted on Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles as Smart Nanocarrier. **Polymers**, [s.l.], v. 12, n. 11, p. 2749, 2020.
- BEAUMONT, M.; JAHN, E.; MAUTNER, A.; VEIGEL, S.; BÖHMDORFER, S.; POTTHAST, A.; GINDL-ALTMUTTER, W.; ROSENAU, T. Facile Preparation of Mechanically Robust and Functional Silica/Cellulose Nanofiber Gels Reinforced with Soluble Polysaccharides. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 12, n. 6, p. 895, 2022.
- BERA, H.; ABBASI, Y. F.; GAJBHIYE, V.; LIEW, K. F.; KUMAR, P.; TAMBE, P.; AZAD, A.K.; CUN, D.; YANG, M. Carboxymethyl fenugreek galactomannan-g-poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-methylene-bis-acrylamide)-clay based pH/temperature-responsive nanocomposites as drug-carriers. **Materials Science and Engineering C**, [s.l.], v. 110, p. 110628, 2020.
- BHARATHI, R.; SHREE G.S.; HARINI, G.; VATSALA, K.; ANUSHIKAA, R.; ARAVIND, S.; ABINAYA, S.; SELVAMURUGAN, N. Chitosan-based scaffolds as drug delivery systems in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 222, p. 132-153, 2022.
- BOUHOUTE, M.; NAKAJIMA, M.; ISODA, H. Design of nanoemulgel using *Argania*

*spinosa* microfibrillated cellulose and natural emulsifiers foreseeing melanogenesis enhancement. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 274, p. 118632, 2021.

BRUSCHI, M. L. Main mechanisms to control the drug release, In: BRUSCHI, M. L. (ed.), **Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems**. Cambridge: Woodhead Publishing, p.37-62, 2015.

CAI, C.; WEI, B.; JIN, Z.; TIAN, Y. Facile Method for Fluorescent Labeling of Starch Nanocrystal. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [s.l.], v. 5, n. 5, p. 3751- 3761, 2017.

CALDONAZO, A.; ALMEIDA, S. L.; BONETTI, A.F.; LAZO, R. E. L.; MENGARDA, M.; MURAKAMI, F. S. Pharmaceutical applications of starch nanoparticles: A scoping review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 181, p. 697-704, 2021.

CANCINO-LABRA, S.; ALIA-TEJACAL, I.; PÉREZ-ARIAS, G. A.; VILLARREAL-FUENTES, J. M. Phenophase description in dry-season *Spondias purpurea* L. using a modified version of the BBCH scale. **Scientia Horticulturae**, [s.l.], v. 318, p. 112086, 2023.

CAVALCANTI, I. D. L.; XIMENES, R. M.; PESSOA, O. D. L.; MAGALHÃES, N. S. S.; LIRA-NOGUIRA, M. C. B. Fucoïdan-coated PIBCA nanoparticles containing oncocalyxone A: Activity against metastatic breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s.l.], v. 65, p. 102698, 2021.

CHALITANGKON, J.; WONGKITTISIN, M.; MONVISADE, P. Silver loaded hydroxyethylacryl chitosan/sodium alginate hydrogel films for controlled drug release wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 159, p. 194-203, 2020.

CHATTERJEE, S.; MAHMOOD, S.; HILLES, A. R.; THOMAS, S.; ROY, S. PROVAZNIK, V.; ROMERO, E. L.; GHOSAL, K. Cationic starch: A functionalized polysaccharide-based polymer for advancement of drug delivery and health care system - A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 248, 125757, 2023.

COLLINS, M. N., REN, G., YOUNG, K., PINA, S., REIS, R. L., OLIVEIRA, J. M. Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. **Advanced Functional Materials**, [s.l.], v. 31, n. 21, p. 2010609, 2021.

CORREIA, J., MATHUR, K., BOURHAM, M.; OLIVEIRA, F. R.; VALLE, R. C. S. C.; VALLE, BORGES, J. A.; SEYAM, A. M. Surface functionalization of greige cotton knitted fabric through plasma and cationization for dyeing with reactive and acid dyes. **Cellulose**, [s.l.], v. 28, p. 9971–9990, 2021.

COSTA, C. D., COSTA, E. D., FERREIRA, F. D., VIANA, L. D., SILVA, L. M., SILVA, F. D., ABREU, F. C., FIGUEIREDO, I. M., PINHO, W., BENTO, E. S., LEMOS, T. L., PESSOA, O. D., AGUILERA-VENEGAS, B., NORAMBUENA, E., OLEA-AZAR, C., GOULART, M. O. Oncocalyxone A: electrochemical, spectroscopic investigation and studies of its interaction with DNA, nucleobases and N-acetylcysteine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 23, p. 1174-1185, 2012.

CUI, J.; NIU, X.; ZHANG, D.; MA, J.; ZHU, X.; ZHENG, X.; LIN, Z.; FU, M. The novel chitosan-amphoteric starch dual flocculants for enhanced removal of *Microcystis aeruginosa*

and algal organic matter. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 304, p. 120474, 2023.

DAI, L.; ZHANG, Q.; SHEN, X.; SUN, Q.; MU, C.; GU, H.; CAI, K. A pH-responsive nanocontainer based on hydrazone-bearing hollow silica nanoparticles for targeted tumor therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, [s.l.], v. 4, n. 26, p. 4594 – 4604, 2016.

DESBRIERES, J.; PEPTU, C. A.; SAVIN, C. L.; POPA, M. Chemically Modified Polysaccharides with Applications in Nanomedicine. In: POPA, V.; VOLF, I. (ed.). **Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-Tech Value**, Elsevier, p. 351-399, 2018.

ESTRADA-LEÓN, R. J.; MOO-HUCHIN, V. M.; RÍOS-SOBERANIS, C. R.; BETANCURANCONA, D.; MAY-HERNÁNDEZ, L. H.; CARRILLO-SÁNCHEZ, F. A.; CERVANTESUC, J. M.; PÉREZ-PACHECO, E. The effect of isolation method on properties of parotta (*Enterolobium cyclocarpum*) starch. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 57, p. 1–9, 2016.

FANG, L.; WANG, Y.; XIONG, Z.; WANG, Y. Research progress of nanomaterials in tumor-targeted drug delivery and imaging therapy. **OpenNano**, [s.l.], v. 14, p. 100184, 2023.

FERREIRA, P. M. P.; ALMEIDA, A. A. C.; CONCEIÇÃO, M. L. P.; PESSOA, O. D. L.; MARQUES, L. G. A.; CAPASSO, R.; PESSOA, C. *Cordia oncocalyx* and oncocalyxones: From the phytochemistry to the anticancer action and therapeutic benefits against chronic diseases. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 169, p. 105624, 2023.

FIORITO, S.; EPIFANO, F.; PREZIUSO, F.; TADDEO, V. A.; GENOVESE, S. Selenylated plant polysaccharides: A survey of their chemical and pharmacological properties. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 153, p. 1-10, 2018.

FRENCH, A. Idealized powder diffraction patterns for cellulose polymorphs. **Cellulose**, [s.l.], v. 21, p. 885–896, 2014.

GARCIA-VALDEZ, O.; CHAMPAGNE, P.; CUNNINGHAM, M. F. Graft modification of natural polysaccharides via reversible deactivation radical polymerization. **Progress in Polymer Science**, [s.l.], v. 76, p. 151-173, 2018.

GONÇALVES-OLIVEIRA, R. C.; RODRIGUES, H. B.; BENKO-ISEPPON, A. M. Range distribution of the invasive alien species *Calotropis procera* in South America dry environments under climatic change scenarios. **Journal of Arid Environments**, [s.l.], v. 205, p. 104819, 2022.

GONG, C.; HUO, L.; WANG, Z.; SUN, C.; WANG, Y.; CHENG, X. Phosphorus removal by porous aggregate from aerated concrete waste residues: Simulating porous structure, performance optimisation, adsorption mechanisms. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s.l.], v. 11, n. 5, 111075, 2023.

GONG, J.; LI, J.; XU, J.; XIANG, Z.; MO, L. Research on cellulose nanocrystals produced from cellulose sources with various polymorphs. **RSC Advances**, [s.l.], v. 7, p. 33486–33493, 2017.

HAO, N.; NIE, Y.; ZHANG, J. X. J. Microfluidics for silica biomaterials synthesis: opportunities and challenges. **Biomaterials science**, [s.l.], v. 7, n. 6, p. 2218–2240, 2019.

HECK, R.; LUKIĆ, M. Ž.; SAVIĆ, S. D.; DANIELS, R.; LUNTER, D. J. *Ex vivo* skin permeation and penetration of nonivamide from and in vivo skin tolerability of film-forming formulations containing porous silica. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 106, p. 34-40, 2017.

HOPE, A.; WADE, S. J.; AGHMESHEH, M.; VINE, K. L. Localized delivery of immunotherapy via implantable scaffolds for breast cancer treatment. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 341, p. 399-413, 2022.

HOYOS-LEYVA, J. D.; ALONSO-GOMEZ, L.; RUEDA-ENCISO, J.; YEE-MADEIRA, H. Morphological, physicochemical and functional characteristics of starch from *Marantha ruiziana* Koern. **LWT - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 83, p. 150-156, 2017.

IQBAL, U.; HAMEED, M.; AHMAD, F. Structural and functional traits underlying the capacity of *Calotropis procera* to face different stress conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 203, p. 107992, 2023.

JABBARI, F.; BABAEIPOUR, V.; BAKHTIARI, S. Bacterial cellulose-based composites for nerve tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 217, p. 120-130, 2022.

JACOB, J.; HAPONIUK, J. T.; THOMAS, S.; GOPI, S. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems: A review. **Materials Today Chemistry**, [s.l.], v. 9, p. 43-55, 2018.

JASSO-GASTINEL, C.F. Gradients in Homopolymers, Blends, and Copolymers. In: **Modification of Polymer Properties**. Editor(s): JASSO-GASTINEL, C. F.; KENNY, J. M. William Andrew, [s.l.], p. 185-210, 2017.

JIA, H.; ZHU, Y.; DUAN, Q.; CHEN, Z.; WU, F. Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and drug delivery applications. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 311–312, p. 301-318, 2019.

JIN, E.; GUO, J.; YANG, F.; ZHU, Y.; SONG, J.; JIN, Y.; ROJAS, O. J. On the polymorphic and morphological changes of cellulose nanocrystals (CNC-I) upon mercerization and conversion to CNC-II. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 143, p. 327–335, 2016.

JODATI, H.; YILMAZ, B.; EVIS, Z. A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features. **Ceramics International**, [s.l.], v. 46, n. 10, p. 15725-15739, 2020.

KAR, A. K.; SINGH, A.; SINGH, D.; SHRAOGI, N.; VERMA, R.; SAJI, J.; JAGDALE, P.; GHOSH, D.; PATNAIK, S. Biopolymeric composite hydrogel loaded with silver NPs and epigallocatechin gallate (EGCG) effectively manages ROS for rapid wound healing in type II diabetic wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 218, p. 506-518, 2022.

KHANJANZADEH, H.; BEHROOZ, R.; BAHRAMIFAR, N.; GINDL-ALTMUTTER, W.; BACHER, M.; EDLER, M.; GRIESSER, T. Surface chemical functionalization of cellulose nanocrystals by 3-aminopropyltriethoxysilane. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 106, p. 1288–1296, 2018.

KHLYUSTOVA, A.; SIROTKIN, N.; KRAEV, A.; AGAFONOV, A.; TITOV, V. Effect of

metal oxides added onto polyvinyl alcohol via pulsed underwater plasma on their thermal, electrical and dielectric properties. **Journal Applied Polymer Science**, [s.l.], v. 138, n. 40, p. e51174, 2021.

KRISHNARAJ, C.; HARPER, S. L.; YUN, S. *In Vivo* toxicological assessment of biologically synthesized silver nanoparticles in adult Zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 301, p. 480-491, 2016.

LAUBACH, J.; JOSEPH, M.; BRENZA, T.; GADHAMSHETTY, V.; SANI, R. K. Exopolysaccharide and biopolymer-derived films as tools for transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 329, p. 971-987, 2021.

LE CORRE, D.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Starch nanoparticles: a review. **Biomacromolecules**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 1139-1153, 2010.

LI, J.; XIANG, H.; ZHANG, Q.; MIAO, X. Polysaccharide-Based Transdermal Drug Delivery. **Pharmaceuticals**, [s.l.], v. 15, n. 5, p. 602, 2022.

LI, T.; GENG, T.; MD, A.; BANERJEE, P.; WANG, B. Novel scheme for rapid synthesis of hollow mesoporous silica nanoparticles (NOSMs) and their application as an efficient delivery carrier for oral bioavailability improvement of poorly water-soluble BCS type II drugs. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 176, p. 185-193, 2019.

LI, X.; LIU, X.; LI, T.; LI, X.; FENG, D.; KUANG, X.; XU, J.; ZHAO, X.; SUN, M.; CHEN, D.; ZHANG, Z.; FENG, X. SiO<sub>2</sub> nanoparticles cause depression and anxiety-like behavior in adult zebrafish. **RSC Advances**, [s.l.], n. 7, p. 2953-2963, 2017.

LIN, R.; XU, R.; CHEN, H.; LIU, B.; YUAN, C.; GUO, L.; CUI, B.; FANG, Y. Dual cross-linked starch hydrogel for eugenol encapsulation and the formation of hydrogen bonds on textural hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 316, p. 121044, 2023.

LIU, T.; WU, S.; CHEN, Y.; CHOU, C.; CHEN, C. Biosafety evaluations of well-dispersed mesoporous silica nanoparticles: towards in vivo-relevant conditions. **Nanoscale**, RSC, [s.l.], v. 7 n. 15, p. 6471-6480, 2015.

LOURDIN, D.; PUTAUX, J. L.; POTOCKI-VÉRONÈSE, G.; CHEVIGNY, C.; ROLLAND-SABATÉ, A.; BULÉON, A. Crystalline Structure in Starch. In: NAKAMURA, Y. (ed.) **Starch**. Springer, Tokyo, 2015.

LUO, M.; ZHANG, X.; WU, J.; ZHAO, J. Modifications of polysaccharide-based biomaterials under structure-property relationship for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 266, p. 118097, 2021.

MAGALHÃES, F. E. A.; DE SOUSA, C. A. P. B.; SANTOS, S. A. A. R.; MENEZES, R. B.; BATISTA, F. L. A.; ABREU, A. O.; DE OLIVEIRA, M. V.; MOURA, L. F. W. G.; RAPOSO, R.S., CAMPOS, A. R. Adult zebrafish: an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**, [s.l.], v. 4, n. 5, p. 422-429, 2017.

MAHARI, W. A. W.; WAIHO, K.; FAZHAN, H.; NECIBI, M. C.; HAFSA, J.; MRID, R. B.; FAL, S.; ARROUSSI, H. L.; PENG, W.; TABATABAEI, M.; AGHBASHLO, M.; ALMOMANI, F.; LAM, S. S.; SILLANPÄÄ, M. Progress in valorization of agriculture, aquaculture and shellfish biomass into biochemicals and biomaterials towards sustainable

bioeconomy. **Chemosphere**, [s.l.], v. 291, n. 2, p. 133036, 2022.

MALHAB, L. J. B.; BAJBOUJ, K.; SHEHAB, N. G.; ELAYOTY, S. M.; SINOJ, J.; ADRA, S.; TANEERA, J.; SALEH, M. A.; ABDEL-RAHMAN, W. M.; SEMREEN, M. H.; ALZOUBI, K. H.; BUSTANJI, Y.; EL-HUNEIDI, W.; ABU-GHARBIH, E. Potential anticancer properties of *Calotropis procera*: An investigation on breast and colon cancer cells. *Heliyon*, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 16706, 2023.

MALIK, S.; MUHAMMAD, K.; WAHEED, Y. Emerging Applications of Nanotechnology in Healthcare and Medicine. **Molecules**, [s.l.], v. 28, n. 18, p. 6624, 2023.

MARCHETTI, L.; ANDRÉS, S. C.; CERRUTI, P.; CALIFANO, A. N. Effect of bacterial nanocellulose addition on the rheological properties of gluten-free muffin batters. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 98, p. 105315, 2020.

MARIADOSS, A. V. A. SARAVANAKUMAR, K.; SATHIYASEELAN, A.; VENKATACHALAM, K.; WANG, M. Folic acid functionalized starch encapsulated green synthesized copper oxide nanoparticles for targeted drug delivery in breast cancer therapy. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 164, p. 2073-2084, 2020.

MENEGUIN, A.; PACHECO, G.; SILVA, JHONATAN M.; DE ARAUJO, F. P.; SILVA-FILHO, E. C.; BERTOLINO, L. C.; BARUD, H. S. Nanocellulose/palygorskite biocomposite membranes for controlled release of metronidazole. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 188, p. 689-695, 2021.

MENG, Y.; WANG, S.; GUO, Z.; CHENG, M.; LI, J.; LI, D. Design and preparation of quaternized pectin-Montmorillonite hybrid film for sustained drug release. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 154, p. 413-420, 2020.

MENSAH, R. A.; COOK, M. T.; KIRTON, S. B.; HUTTER, V.; CHAU, D. Y. S. A drug-incorporated-microparticle-eggshell-membrane-scaffold (DIMES) dressing: A novel biomaterial for localised wound regeneration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 190, p. 258-269, 2023.

MOHAMED, A. L.; ELMOTASEM, H.; SALAMA, A. A.A. Colchicine mesoporous silica nanoparticles/hydrogel composite loaded cotton patches as a new encapsulator system for transdermal osteoarthritis management. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 164, p. 1149-1163, 2020.

MOZAFARINIA, M.; KARIMI, S.; FARROKHANIA, M., ESFANDIARI, J. *In vitro* breast cancer targeting using Trastuzumab-conjugated mesoporous silica nanoparticles: Towards the new strategy for decreasing size and high drug loading capacity for drug delivery purposes in MSN synthesis. **Microporous and Mesoporous Materials**, [s.l.], v. 316, p. 110950, 2021.

MURUGAPANDIAN, R.; CLEMENT, S.; UTHIRAPATHY, V. Fabrication and In Vitro Drug Delivery Evaluation of Cephalexin Monohydrate-Loaded PLA:PVA/HAP:TiO<sub>2</sub> Fibrous Scaffolds for Bone Regeneration. **ACS Omega**, [s.l.], v. 8, n. 5, p. 5017-5032, 2023.

NOAH, N. M. Design and Synthesis of Nanostructured Materials for Sensor Applications. **Journal of Nanomaterials**, [s.l.], p. 8855321, 2020.

NORONHA, V. T.; CAMARGOS, C. H. M.; JACKSON, J. C.; SOUZA FILHO, A. G.;

PAULA, A. J.; REZENDE, C. A.; FARIA, A. F. Physical Membrane-Stress-Mediated Antimicrobial Properties of Cellulose Nanocrystals. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, [s.l.], v. 9, n. 8, p. 3203 – 3212, 2021.

ODENIYI, M. A.; OMOTESO, O. A.; ADEPOJU, A. O.; JAIYEGBA, K.T. Starch nanoparticles in drug delivery: A review. **Polymers in Medicine**, [s.l.], v. 48, p. 41-45, 2018.

OECD. Guideline for testing acute toxicity in fishes, Test N°. 1992. Available in: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>. Accessed on December 11, 2023.

PAL, N.; LEE, J. H.; CHO, E. B. Recent Trends in Morphology-Controlled Synthesis and Application of Mesoporous Silica Nanoparticles. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 10, n. 11, p. 2122, 2020.

PINTO, V. Z.; MOOMAND, K.; DEON, V. G.; BIDUSKI, B.; DA R., E.; LENHANI, G. C.; FIDELIS DOS, G. H.; LIM, L. T.; DIAS, A. R. G. Effect of Physical Pretreatments on the Hydrolysis Kinetic, Structural, and Thermal Properties of Pinhão Starch Nanocrystals. **Starch - Stärke**, [s.l.], v. 73, p. 2000008, 2021.

QUELEMES, P. V.; ARAÚJO, A. R. DE; PLÁCIDO, A.; DELERUE-MATOS, C.; MACIEL, J. S.; BESSA, L. J.; OMBREDANE, A. S.; JOANITTI, G. A.; SOARES, M. J. S.; EATON, P.; SILVA, D. A. DA; LEITE, J. R. S.A. Quaternized cashew gum: An anti-staphylococcal and biocompatible cationic polymer for biotechnological applications. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 157, p. 567-575, 2017.

RAHBAR, M.; MORSALI, A.; BOZORGMEHR, M. R.; BEYRAMABADI, S. A. Quantum chemical studies of chitosan nanoparticles as effective drug delivery systems for 5-fluorouracil anticancer drug. **Journal of Molecular Liquids**, [s.l.], v. 302, p. 112495, 2020.

RANA, V.; MALIK, S.; JOSHI, G.; RAJPUT, N. K.; GUPTA, P. K. Preparation of alpha cellulose from sugarcane bagasse and its cationization: Synthesis, characterization, validation and application as wet-end additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 170, p. 793-809, 2021.

REBOUÇAS, L. M.; SOUSA, A. C. C.; GRAMOSA, N. V.; ARAÚJO, T. G.; OLIVEIRA, F. C. E.; PESSOA, C. DO Ó; ARAÚJO, R. S.; SANTOS, E. M. A.; RICARDO, N. M. P. S. Linseed Oil Nanoemulsion with Pluronic F127 Loaded with Betulinic Acid: Preparation, Rheology, MTT Assay and *in vitro* Release Kinetics. **Journal Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 33, n. 11, p. 319-1331, 2022.

REBOUÇAS, L. M.; SOUSA, A. C. C.; SAMPAIO, C. G.; SILVA, L. M.R.; COSTA, P. M. S.; PESSOA, C.; BRASIL, N. V. G. P. S.; RICARDO, N. M. P. S. Microcapsules based on alginate and guar gum for co-delivery of hydrophobic antitumor bioactives. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 301, Part A, p. 120310, 2023.

REN, Z.; GUO, Y.; LIU, C.; GAO, P. Hierarchically nanostructured materials for sustainable environmental applications. **Frontiers in Chemistry**, [s.l.], v. 1, p. 1-22, 2013.

RODRIGUES, F. A. M.; SANTOS, S. B. F.; LOPES, M. M. A.; GUIMARÃES, D. J. S.; SILVA, E. O.; SOUZA FILHO, M. S. M.; MATTOS, A. L. A.; SILVA, L. M. R.; AZEREDO, H. M. C.; RICARDO, N. M. P. S. Antioxidant films and coatings based on starch and

phenolics from *Spondias purpurea* L. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 182, p. 354-365, 2021.

SANTANA, G. L.; CROVACE, M. C.; MAZÓN, E. E.; DE OLIVEIRA, A. J. A.; PAVAN, T. Z.; ZANOTTO, E. D. Smart Bone Graft Composite for Cancer Therapy Using Magnetic Hyperthermia. **Materials**, [s.l.], v. 15, n. 9, 3187, 2022.

SAWERES-ARGÜELLES, C.; RAMÍREZ-NOVILLO, I.; VERGARA-BARBERÁN, M.; CARRASCO-CORREA, E. J.; LERMA-GARCÍA, M. J.; SIMÓ-ALFONSO, E. F. Skin absorption of inorganic nanoparticles and their toxicity: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 182, p. 128-140, 2023.

SHARMA, S.; SWETHA, K. L.; ROY, A. Chitosan-Chondroitin sulfate-based polyelectrolyte complex for effective management of chronic wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 132, p. 97–108, 2019.

SILVA, A. P. M.; OLIVEIRA, A. V.; PONTES, S. M. A.; PEREIRA, A. L.S.; SOUZA FILHO, M. S. M.; ROSA, M. F.; AZEREDO, H. M.C. Mango kernel starch films as affected by starch nanocrystals and cellulose nanocrystal. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 211, p. 209–216, 2019.

SILVA, F. M. R., MAGALHÃES, F. E. A., BATISTA, F. L. A. B., DA SILVA, L. M. R., RICARDO, N. M. P. S., SABINO, L. B. S., DE FIGUEIREDO, R. W., Microencapsulation of green tea (*Camellia sinensis*) phenolic extract: Physical-chemical characterization, antimicrobial and toxicological properties. **Food Chemistry Advances**, [s.l.], v. 3, p. 100360-100366, 2023.

SILVA, R. E.; RIBEIRO, F. O. S.; CARVALHO, A. M.; DABOIT, T. C.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; MATOS, T. S.; PESSOA, O. D. L.; LEITE, J. R. S. A.; ARAÚJO, A. R.; SOARES, M. J. S. Antimicrobial and antibiofilm activity of the benzoquinone oncocalyxone A. **Microbial Pathogenesis**, [s.l.], v. 149, p. 104513, 2020.

SILVA, R. V.; COSTA, S. C. C.; BRANCO, C. R.C.; BRANCO, A. *In vitro* photoprotective activity of the *Spondias purpurea* L. peel crude extract and its incorporation in a pharmaceutical formulation. **Industrial Crops and Products**, [s.l.], v. 83, p. 509-514, 2016.

SKWIRA, A.; SZEWCZYK, A.; BARROS, J.; LARANJEIRA, M.; MONTEIRO, F. J.; SADEJ, R.; PROKOPOWICZ, M. Biocompatible antibiotic-loaded mesoporous silica/bioglass/collagen-based scaffolds as bone drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 645, p. 123408, 2023.

SOLANGI, N. H.; KARRI, R. R.; MUBARAK, N. M.; MAZARI, S. A. Mechanism of polymer composite-based nanomaterial for biomedical applications. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, [s.l.], v. 208, p. 418-429, 2023.

SOUSA, A. C.C.; ROMO, A. I. B.; ALMEIDA, R. R.; SILVA, A. C. C.; FECHINE, L. M. U.; BRITO, D. H. A.; FREIRE, R. M.; PINHEIRO, D. P.; SILVA, L. M. R.; PESSOA, O. D. L.; DENARDIN, J. C.; PESSOA, C.; RICARDO, N. M. P. S. Starch-based magnetic nanocomposite for targeted delivery of hydrophilic bioactives as anticancer strategy. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 264, p. 118017, 2021.

SOUZA, L. O.; LESSA, O. A.; DIAS, M. C.; TONOLI, G. H. D.; REZENDE, D. V. B.;

MARTINS, M. A.; NEVES, I. C. O.; RESENDE, J. V.; CARVALHO, E. E. N.; VILAS BOAS, E. V. B.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Study of morphological properties and rheological parameters of cellulose nanofibrils of cocoa shell (*Theobroma cacao* L.). **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 214, p. 152-158, 2019.

STOJKOV, G.; NIYAZOV, Z.; PICCHIONI, F.; BOSE, R.K. Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications. **Gels**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 255, 2021.

SUFI-MARAGHEH, P.; NIKFARJAM, N.; DENG, Y.; TAHERI-QAZVINI, N. Pickering emulsion stabilized by amphiphilic pH-sensitive starch nanoparticles as therapeutic containers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 181, p. 244-251, 2020.

TAHER, M. A.; ZAHAN, K. A.; RAJAIE, M. A.; RING, L. C.; RASHID, S. A.; HAMIN, N. S. M. N.; NEE, T. W.; YENN, T. W. Nanocellulose as drug delivery system for honey as antimicrobial wound Dressing. **Materials Today: Proceedings**, [s.l.], v. 31, p. 14–17, 2020.

TAVARES, C. A.; XAVIER-JÚNIOR, F. H.; PESSOA, O. D. L.; XIMENES, R. M.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Validation of an HPLC–UV Method for Quantifying Oncocalyxone A in Different Media and Nanocapsules. **Chromatographia**, [s.l.], v. 82. n. 5, p. 809-818, 2019.

THAMER, B. M.; AL-ENIZI, A.; AL ANAZI, N. B.; EL-NEWEHY, M. H. Hollow carbon fibers and flakes derived from *Calotropis procera* as adsorbents for dye removal from aqueous solutions. **Materials Chemistry and Physics**, [s.l.], v. 279, p. 125752, 2022.

TORRES, F. G.; DE-LA-TORRE, G. E. Synthesis, characteristics, and applications of modified starch nanoparticles: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 194, p. 289-305, 2022.

TUDU, M.; SAMANTA, A. Natural polysaccharides: Chemical properties and application in pharmaceutical formulations. **European Polymer Journal**, [s.l.], v. 184, p. 111801, 2023.

VARGAS-SIMÓN, G. Ciruela/Mexican Plum-*Spondias purpurea* L. In: **Exotic Fruits**. Editor(s): RODRIGUES, S.; SILVA, E. O.; BRITO, E. S. Academic Press, [s.l.], p. 141-152, 2018.

VELÁSQUEZ-CASTILLO, L. E.; LEITE, M. A.; DITCHFIELD, C.; SOBRAL, P. J. A.; MORAES, I. C. F. Quinoa starch nanocrystals production by acid hydrolysis: Kinetics and properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 143, p. 93-101, 2020.

WANG, X.; HUANG, L.; ZHANG, C.; DENG, Y.; XIE, P.; LIU, L.; CHENG, J. Research advances in chemical modifications of starch for hydrophobicity and its applications: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 240, p. 116292, 2020.

WANG, Z.; XIE, J.; SHEN, M.; NIE, S.; XIE, M. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 74, p. 147-157, 2018.

WEI, B.; CAI, C., TIAN, Y. Nano-sized Starch: Preparations and Applications. In: Z. JIN (ed.), **Functional Starch and Applications in Food**, [s.l.], Springer Nature, Singapore, p.147-176, 2018.

XIE, L.; SHEN, M.; HONG, Y.; YE, H.; HUANG, L.; XIE, J. Chemical modifications of polysaccharides and their anti-tumor activities. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 229, p. 115436, 2020.

YANG, Y.; WU, H.; FU, Q.; XIE, X.; SONG, Y.; XU, M.; LI, J. 3D-printed polycaprolactone-chitosan based drug delivery implants for personalized administration. **Materials & Design**, [s.l.], v. 214, p. 110394, 2022.

ZAWANI, M.; FAUZI, M. B. Epigallocatechin Gallate: The Emerging Wound Healing Potential of Multifunctional Biomaterials for Future Precision Medicine Treatment Strategies. **Polymers**, [s.l.], v. 13, p. 3656, 2021.

ZHANG, B.; LAN, W.; XIE, J. Chemical modifications in the structure of marine polysaccharide as serviceable food processing and preservation assistant: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 223, p.1539-1555, 2022.

ZHAO, H.; ZHU, Y.; ZHANG, H.; REN, H.; ZHAI, H. UV-blocking composite films containing hydrophilized spruce kraft lignin and nanocellulose: Fabrication and performance evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 242, n. 3, p. 124946, 2023.

ZHU, Y.; LUO, X.; WU, X.; LI, W.; LI, B.; LU, A.; LIU, S. Cellulose gel dispersions: fascinating green particles for the stabilization of oil/water Pickering emulsion. **Cellulose**, [s.l.], v. 24, p. 207–217, 2017.

ZHU, Z.; ZHANG, L.; FENG, X. Introduction of 3-(trimethylammonium chloride)-2-hydroxypropyls onto starch chains for improving the grafting efficiency and sizing property of starch-g-poly(acrylic acid). **Starch - Stärke**, [s.l.], v. 68, p. 742-752, 2016.

ZIELIŃSKA, A.; KARCZEWSKI, J.; EDER, P.; KOLANOWSKI, T.; SZALATA, M.; WIELGUS, K.; SZALATA, M.; KIM, D.; SHIN, S. R.; SŁOMSKI, R.; SOUTO, E. B. Scaffolds for drug delivery and tissue engineering: The role of genetics. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 359, p. 207–223, 2023.