



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química de Araraquara

Nanohidrogéis de gelatina sensíveis à glutathiona para liberação controlada de paclitaxel

Relatório final de pesquisa apresentado ao Programa Nacional de Pós Doutorado/PNPD-CAPES (Processo 88887.474072/2020-00) da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo pós-doutorando Rodolfo Debone Piazza.

Bolsista: Dr Rodolfo Debone Piazza

Supervisor: Profº Dr Rodrigo Fernando Costa Marques

Araraquara

2024

Sumário

Resumo	3
Introdução	4
Objetivos.....	11
Material e Métodos	12
Reagentes utilizados	12
Modificação da gelatina com anidrido maleico	12
Modificação da gelatina: reestabelecendo o anidrido cíclico	12
Reticulação da gelatina derivatizada em sistema de miniemulsão inversa.....	13
Liberação de Diclofenaco de potássio	13
Viabilidade celular.....	14
Caracterizações	15
Resultados e Discussão	16
Modificação e caracterização da gelatina modificada	16
Caracterização dos nanohidrogéis de gelatina	23
Liberação de Diclofenaco de potássio	27
Viabilidade celular.....	32
Conclusões.....	33
Orientações	34
Disciplinas ministradas	35
Atividades de extensão	36
Bancas avaliadoras.....	37
Outras atividades relevantes	38
Comentários do Supervisor.....	39
Referências	40
ANEXO II.....	46
Exames de Qualificação	47

Resumo

Nas últimas décadas, plataformas para liberação de moléculas bioativas vêm sendo estudadas pela comunidade científica para o desenvolvimento de materiais aplicados à biomedicina, principalmente para o tratamento do câncer. Plataformas de nanohidrogéis são modificadas para ajustar as propriedades físico-químicas para garantir compatibilidade com o meio biológico de interesse para a liberação das moléculas diretamente no tecido ou célula afetada por doenças. No presente projeto, a gelatina será modificada com anidrido maleico com o objetivo de ancorar anéis maleimida sobre a estrutura do biopolímero. Posteriormente, a gelatina modificada será reticulada com dicloridrato de cistamina, uma molécula que possui uma ligação dissulfeto em sua estrutura, que confere sensibilidade ao nanohidrogel na presença de glutathione, biomolécula responsável pelo microambiente redutor em células tumorais. O processo de reticulação ocorrerá dentro de gotículas formadas pela técnica de miniemulsão inversa, reduzindo o hidrogel à escala nanométrica. Esses materiais serão avaliados por técnicas espectroscópicas, como infravermelho, ressonância magnética de ^1H e ^{13}C . O estudo de estabilidade do nanohidrogel será realizada através de medidas de potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico. A incorporação e liberação de paclitaxel serão avaliadas em nanohidrogéis com diferentes graus de reticulação. A liberação também será avaliada na presença e ausência de glutathione, avaliando o perfil e o mecanismo de liberação do fármaco.

Introdução

Desde o início, os seres humanos têm lutado pela sobrevivência diante da exposição a vários tipos de doenças. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças crônicas como doenças cardiovasculares (ataques cardíacos e derrames), câncer, doenças respiratórias e diabetes são responsáveis por 63% das mortes anuais ¹. Essas doenças não apenas afetam negativamente o paciente antes da morte, mas também afetam a sociedade e sua organização de várias maneiras. Portanto, o desenvolvimento de novos tratamentos para extinguir ou reduzir os danos causados por tais doenças é extremamente importante.

Ainda de acordo com a OMS, o número de mortes causadas por câncer foi de 9,6 milhões de pessoas no ano de 2018 ¹. Além da perda de vidas, o impacto econômico do câncer é significativo e aumenta a cada ano. Dados de 2010 indicam que o custo econômico anual total do câncer foi estimado em aproximadamente US \$ 1,16 trilhão ². Diante dessa situação alarmante, o desenvolvimento de novos materiais deve influenciar significativamente a prática da medicina moderna ³. Para alcançar resultados satisfatório a interdisciplinaridade entre química, física, biologia e medicina é fundamental para garantir diagnósticos antecipados e manejar tratamentos personalizados para os mais variados tipos de câncer ⁴.

A descoberta de moléculas com atividade biológica, incluindo aquelas para tratamento do câncer, está aumentando, no entanto, a maioria delas apresenta baixa solubilidade em ambientes hidrofílicos, inviabilizando seu uso. Estima-se que 70% das moléculas recém-descobertas com atividade biológica sejam pouco solúveis em água ^{5,6}. Aproximadamente 40% do total de medicamentos disponíveis no mercado são pouco solúveis no meio biológico ⁷. Além da solubilidade em água, é desejável que as moléculas bioativas mostrem permeabilidade adequada nos tecidos. Dessa forma, o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) organiza os medicamentos de acordo com sua velocidade e extensão de absorção, sua dissolução e permeabilidade nos tecidos, como mostra a **Tabela 1**. Os critérios para a elaboração do BCS foram estabelecidos pela Food and Drug Administration (FDA), com base na maior dosagem de medicamento liberado. Assim, um medicamento é considerado muito solúvel quando solubilizado até 250,0 mL de um meio aquoso, com um valor de pH compreendendo entre 1,0 e 7,5. Se o medicamento não atender a essas especificações, ele será considerado pouco solúvel. O teste de permeabilidade é baseado na absorção intestinal dos medicamentos, medida pela

taxa de transferência de massa na membrana intestinal humana ou em modelos animais. O fármaco apresenta uma elevada permeabilidade quando atinge valores superiores a 90% ^{8,9}.

Tabela 1. Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS).

Classe I	Classe II
Alta solubilidade	Baixa solubilidade
Alta permeabilidade	Alta permeabilidade
Classe III	Classe IV
Alta solubilidade	Baixa solubilidade
Baixa permeabilidade	Baixa permeabilidade

A melhora na solubilidade dos medicamentos das classes II e IV é muito atrativa para a indústria farmacêutica e várias abordagens foram realizadas para superar esses problemas, como formação de sal, complexação e incorporação de medicamentos na estrutura polimérica ^{5,9}. Dessa maneira, os sistemas de administração de medicamentos baseados em estruturas poliméricas devem transportar medicamentos até o local desejável, além de controlar sua liberação.

Os sistemas de liberação controlada de fármacos e/ou moléculas bioativas têm várias vantagens em comparação à administração convencional de fármacos: (i) esses sistemas aumentam o tempo de permanência de moléculas bioativas na corrente sanguínea; (ii) permitem o direcionamento a sítios específicos e (iii) aumentam a efetividade do tratamento e reduzindo os efeitos colaterais ^{4,10-12}. O uso convencional de medicamentos baseia-se na administração periódica de um ingrediente ativo cuja concentração plasmática no sangue está abaixo do nível de ação terapêutica inicialmente, permanece por um período de ação eficaz e pode atingir um pico acima do nível terapêutico, causando efeitos adversos. Após esse ciclo, o medicamento é metabolizado e sua concentração no corpo diminui, exigindo a administração de novas doses para completar o tratamento. As principais críticas a esse modelo de administração são os efeitos colaterais causados pela alta dose e a interrupção do tratamento pelo paciente, negligenciando os intervalos entre as doses ^{13,14}. O principal objetivo para o uso de sistemas de liberação controlada é que uma dose única seja administrada ao paciente e que a concentração do ingrediente ativo seja mantida por um longo tempo dentro dos

limites da ação terapêutica, sendo entregue diretamente ao local de ação ou o mais próximo possível dele, conforme ilustrado na **Figura 1**.

O conceito de sistemas de administração de medicamentos responsivos a estímulos vem da simulação homeostática fisiológica. Isto significa que, em condições saudáveis, nenhum medicamento é liberado. No entanto, quando o equilíbrio homeostático é alterado devido a qualquer doença, a plataforma responsiva a estímulos libera medicamentos para restaurar condições homeostáticas saudáveis ¹⁵. Em outras palavras, sistemas responsivos tentam imitar características naturais descobertas em sistemas vivos como inspiração para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos ¹⁶. De acordo com a definição do sistema responsivo a estímulos, estímulos endógenos e/ou exógenos devem levar a alterações na composição da matriz ou na conformação responsáveis por desencadear a liberação de biomoléculas ativas ⁴. Exemplos das principais alterações físico-químicas observadas estão relacionadas à decomposição, clivagem, morfologia, agregação, isomerização e mudanças de fase da matriz. O estímulo exógeno corresponde à fonte externa de desencadeamento da droga, como campo magnético, campo elétrico, luz, pressão, ultrassom e temperatura. Contrariamente, estímulos endógenos são aqueles que impulsionam a liberação de fármacos no microambiente de células e tecidos como resultado de condições patológicas, como alterações no pH, concentração iônica, temperatura ou diferença no potencial redox ¹⁷.

Uma infinidade de sistemas de administração foi obtida de polímeros, incluindo micelas ¹⁸⁻²⁰, lipossomas ^{21,22}, nanopartículas poliméricas ²³⁻²⁵ e hidrogéis ²⁵⁻²⁷. Embora cada sistema apresente características particulares, a escolha do material precursor pode tornar esses sistemas ainda mais atraentes a partir de uma série de fenômenos físico-químicos. Por exemplo, os hidrogéis são estruturas tridimensionais feitas de polímeros hidrofílicos com capacidade absorver quantidades substanciais de água ou fluidos biológicos em seu estado intumescido ²⁷⁻²⁹. Além disso, os hidrogéis podem ser obtidos a partir de uma ampla variedade de materiais, de fontes naturais a sintéticos, sendo aplicados em alimentos, agronomia e biomedicina ^{30,31}.

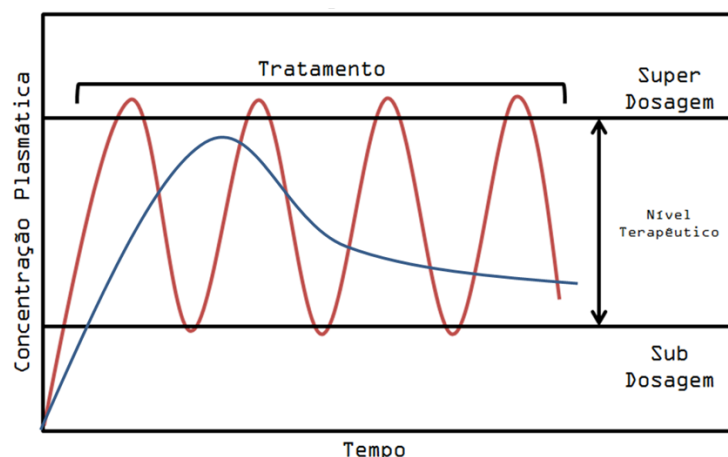


Figura 1. Sistemas convencionais e controlados de administração de medicamentos. Adaptado de ¹³.

No início do século XXI, artigos científicos focaram na caracterização físico-química de plataformas de liberação controlada por estímulo e no ajuste das propriedades cinéticas de liberação das mesmas, principalmente devido à difusão da nanotecnologia^{13,32,33}. As questões relacionadas às interações do ambiente biológico foram pouco discutidas. Com o passar dos anos, testes *in vivo* e *in vitro* tornaram-se mais frequentes nas publicações, bem como a combinação de dois ou mais estímulos em uma plataforma multifuncional^{34–36} e a utilização de sistemas combinados para liberação de mais de uma molécula bioativa^{37–39}. Do nosso ponto de vista, pesquisas futuras sobre sistemas de liberação controlada por estímulo estão alinhadas com terapias personalizadas, ainda que baseadas nos mesmos materiais pesquisados no início do século.

O corpo humano possui uma fascinante capacidade de responder a estímulos ambientais, seja em nível macroscópico ou molecular. Assim, os sistemas de administração de fármacos sensíveis a estímulos têm sido estudados para melhor controle da liberação de moléculas bioativas. Geralmente, quando um sistema de liberação controlada é exposto a um estímulo, como uma variação no pH, temperatura, força iônica, campo magnético ou / e luz, o sistema de administração de medicamentos responde a variações em suas propriedades físico-químicas, seja pela alteração de conformação, mudança de superfície, solubilidade, entre outros, conforme resumido na **Figura 2**^{4,40–42}. Essas plataformas permanecem promissoras e muitos desafios ainda precisam ser superados para garantir a transferência de tecnologia das bancadas de laboratório para o mercado médico. A principal motivação deste trabalho é o desenvolvimento de

conhecimentos sobre novos materiais com potencial aplicação na medicina, impactando tanto na melhoria da qualidade de vida da população quanto nos impactos socioeconômicos.

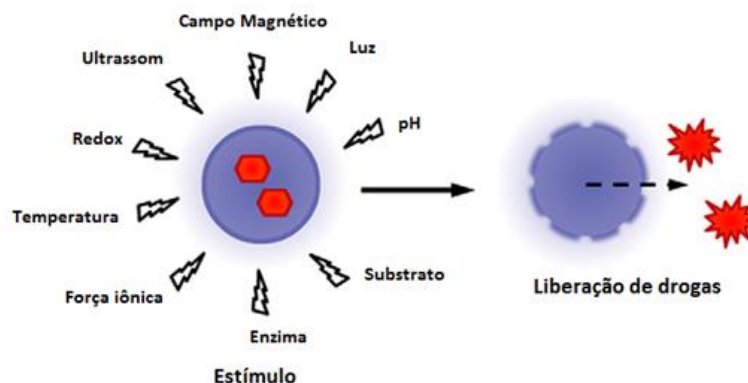


Figura 2. Esquema de liberação controlada de fármacos em função de estímulos. Adaptado de ⁴.

Um dos fatores mais importantes que influenciam a homeostase é o equilíbrio das espécies oxidativas e redutoras, que é capaz de sinalizar e diferenciar danos celulares ou mesmo morte. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são radicais derivados do O_2 com importância no processo celular. Os ROS mais encontrados em processos biológicos são o oxigênio singlete ($\bullet O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$), superóxido ($\bullet O_2^-$), óxido nítrico ($NO\bullet$) e peroxinitrito ($ONOO^-$)⁴³. A atividade das ROS é benéfica até uma certa concentração, o que induz a proliferação de células saudáveis e cancerígenas. Perto de $10 \mu mol L^{-1}$, a presença de ROS pode causar diferenciação celular, enquanto em concentrações de 10 a $30 \mu mol L^{-1}$, faz com que DNA, RNA e proteínas sofram mutação. Nesse sentido, as ROS desencadeariam estresse oxidativo nas células, aumentando a apoptose e os efeitos de toxicidade nas células normais e cancerígenas. No entanto, foi observada viabilidade inesperada em células cancerígenas durante alto estresse oxidativo, que se tornaram resistentes a vários medicamentos e, conseqüentemente, à apoptose ⁴⁴. A homeostasia celular pode ser restaurada através da expressão redutiva da molécula para manter uma via metabólica regular. A glutathione (GSH) é uma molécula tripeptídica (G1-glutamyl-l-cisteinil-l-glicina) que é sintetizada pelas células e armazenada principalmente no citosol, embora também seja encontrada no retículo endoplasmático, nas mitocôndrias e no núcleo em um nível inferior. conteúdo ⁴⁵. GSH tem propriedades antioxidantes e atua como eliminador de ROS e modula o

equilíbrio redox nas células. A concentração de espécies reduzidas de GSH é 10 a 100 vezes maior que as oxidadas em condições fisiológicas^{46,47}.

Níveis mais elevados de ROS são observados no microambiente intracelular das células cancerígenas em comparação com as saudáveis. O câncer é uma doença caracterizada por um crescimento incontrolável de células anormais com capacidade de se espalhar para outros tecidos do corpo ⁴⁸. Portanto, no desequilíbrio da homeostase, a concentração de GSH é insuficiente para regular a proporção de peróxido de oxigênio presente nas células, desencadeando a formação de espécies radicais capazes de danificar o DNA e outras biomoléculas. O estresse oxidativo causado pelas ROS é encontrado em todos os estágios do câncer. Como mencionado acima, a etapa inicial do desenvolvimento do câncer corresponde a danos e mutações no DNA, seguida de aumento da apoptose e, conseqüentemente, aumento da proliferação celular desordenada. No último estágio, a mutagênese continua a danificar as populações celulares devido ao estresse oxidativo. As ROS também podem ser utilizadas como uma estratégia potencial para combater infecções bacterianas. Neutrófilos e macrófagos são células envolvidas na defesa inata do sistema imunológico e, primeiro, fagocitam vírus ou bactérias ⁴⁹. A cascata de ROS é ativada após o reconhecimento dessas células para matar as espécies estranhas, porém, a presença de antioxidantes reduz a capacidade de eliminação bacteriana, bem como os próprios sistemas de defesa bacterianos estabelecidos para a sobrevivência das colônias ⁵⁰. Dadas estas circunstâncias, a criação de dispositivos de administração de medicamentos baseados em ROS apresenta as características fundamentais para combater doenças através do controle de mecanismos biológicos desencadeados pelo desequilíbrio homeostático durante as fases iniciais da doença.

Um potencial sistema de distribuição de medicamentos com resposta redox pode ser alcançado explorando o desequilíbrio de moléculas para tratar doenças. As ligações dissulfeto têm sido estudadas como estratégia para desencadear moléculas bioativas de sistemas de liberação de medicamentos de acordo com os níveis de GSH. Quando exposta a um elevado nível de GSH reduzido, a ligação dissulfureto pode ser quebrada em porções sulfidrilo, como mostrado na Figura 3, destruindo a morfologia inicial do sistema de distribuição e facilitando a liberação do fármaco. Os dispositivos médicos podem ser projetados com uma matriz que possui um grupo dissulfeto, enxertando pequenas moléculas contendo os grupos dissulfeto por meio de reação de reticulação ou fazendo com que os grupos tiol reajam por si próprios para se ligarem⁵¹. A ligação dissulfeto é

rompida, gerando duas moléculas de sulfidril, enquanto o GSH é oxidado ao GSSG, como mostra a **Figura 3**.^{4,47,52}.

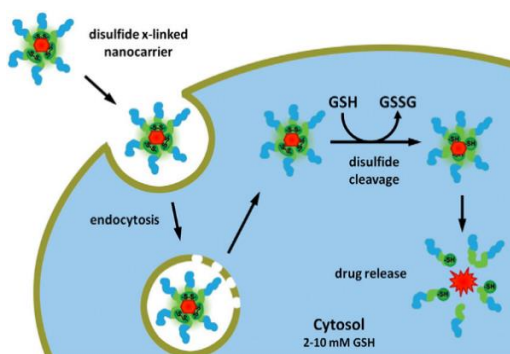


Figura 3. Mecanismo do esquema de ação sensível à variação do potencial redox. Adaptado de ⁴

Diante das características acima mencionadas, a gelatina torna-se uma matriz ideal como carreador de fármaco. A gelatina é uma proteína proveniente da hidrólise do colágeno animal e é empregada na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. É amplamente utilizada devido sua classificação como material geralmente seguro pelo FDA, atestando sua aplicação segura em humanos ⁵³. Como carreador de fármacos, a gelatina provou ser versátil devido as suas características físico-químicas, pois tanto a incorporação como a liberação de fármacos pode ser ajustada, ampliando as áreas de aplicação deste material ⁵⁴. Considerando as características de cada um dos aminoácidos que compõe a gelatina podemos considerar que 13% de sua estrutura está carregada positivamente devido a aminoácidos como a arginina, 12% refere-se a cargas negativas à estrutura e 11% da cadeia apresenta natureza hidrofóbica. A glicina é o principal aminoácido presente na estrutura da gelatina, correspondendo a um terço do total de moléculas, enquanto o restante é composto de prolina e hidroxiprolina. Como a gelatina é proveniente da desnaturação do colágeno, comercialmente são encontrados dois tipos de gelatina, sendo a do tipo A preparada a partir da hidrólise ácida e cujo ponto isoelétrico encontra-se situado entre pH 7-9 e a do tipo B, proveniente da hidrólise básica, com ponto isoelétrico entre pH 4-5 ^{55,56}.

Como carreador de fármaco, a gelatina apresenta características versáteis na incorporação de biomoléculas carregadas eletrostaticamente. Em função de seu ponto isoelétrico, é possível ajustar a eficiência de incorporação do fármaco de acordo com o pH do meio no qual o material está disperso. Da mesma forma, a cinética de liberação

pode ser otimizada tornando a gelatina uma versátil plataforma para engenharia de tecidos ou na terapia de câncer. A associação de outros materiais à gelatina introduz no sistema propriedades múltiplas que não eram atingidas com o material isolado, atuando de maneira sinérgica para melhorar propriedades mecânicas ou ainda a incorporação e liberação de moléculas bioativas ⁵⁴.

O diclofenaco é um fármaco classificado como NSAIDs (do inglês nonsteroidal anti-inflammatory drugs) que apresenta propriedades analgésicas, anti-inflamatória e antipirética. O diclofenaco é um derivado do ácido fenilacético que está disponível em formulações orais na forma de sais de sódio ou potássio, majoritariamente. Entretanto o tratamento com este fármaco tem apresentado efeitos adversos significativos, tais como problemas cardiovasculares, gastrointestinais e hepáticos ⁵⁷. O diclofenaco de potássio foi escolhido como fármaco modelo neste estudo, embora o projeto inicial previsse a utilização de paclitaxel. Ambos os fármacos estão classificados como classe II de acordo com classificação biofarmacêutica, sendo optado o diclofenaco pela disponibilidade no laboratório.

Os dados apresentados pela Organização Mundial da Saúde sobre o progresso em casos de câncer são alarmantes. São necessários avanços científicos sobre esse assunto para reverter ou, pelo menos, diminuir a intensidade dessa doença no Brasil e no mundo. A hipótese do trabalho é que os nanohidrogéis de gelatina atuem na liberação controlada do fármaco modelo diclofenaco. A escolha do polímero que compõe essa plataforma de liberação é baseada na biocompatibilidade e no controle de carga e, consequentemente, na liberação do fármaco. A plataforma proposta é sensível à glutatona, molécula expressa em ambientes tumorais que apresenta forte reação com ligações dissulfeto, que foram selecionadas como agente de reticulação para obtenção de nanohidrogéis. Quando exposta à glutatona é esperado que o nanohidrogel tenha uma liberação acentuada de fármaco, provando ser um dispositivo para potencial uso em medicina.

Objetivos

O presente relatório de pesquisa tem como objetivo apresentar os resultados mais relevantes para obtenção de um sistema de liberação de fármaco a base de gelatina sensível a glutatona (GHS) para liberação controlada de diclofenaco de potássio.

Os objetivos específicos incluem:

1. Derivatizar a gelatina para enxertar grupos de anidrido maleico em sua estrutura;
2. Reticular a gelatina derivatizada com dicloridrato de cistamina para obtenção de nanohidrogéis pelo sistema de miniemulsão inversa;
3. Incorporar e liberar diclofenaco de sódio como modelo de fármaco com baixa solubilidade estudar o efeito da presença de glutathione quanto a sensibilidade do sistema de liberação de fármaco e compreender o mecanismo de liberação;
4. Avaliar a viabilidade celular do sistema de administração de medicamentos contra linhas celulares de câncer.

Material e Métodos

Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho apresentam pureza analítica e nenhum tratamento prévio foi realizado.

Modificação da gelatina com anidrido maleico

A modificação da gelatina tem como objetivo o enxerto de grupos funcionais específicos que permitam a posterior reticulação com grupos sensíveis a estímulos bioquímicos. Nesta etapa, a gelatina foi modificada com o anidrido maleico, no qual 1,5 g de gelatina foi dispersa em 25,0 mL de DMSO anidro na temperatura de 60,0 °C em um balão de fundo redondo. Após completa solubilização, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e 1,0 g de anidrido maleico solubilizado em 5,0 mL de DMSO anidro foi adicionado ao balão. O sistema foi mantido sob agitação magnética durante 1,0 hora. O produto desta reação corresponde a uma etapa intermediária e foi denominado G_MA_I. Uma alíquota foi dialisada em membrana com poros de 2kDa, durante dois dias contra água.

Modificação da gelatina: reestabelecendo o anidrido cíclico

Duas abordagens foram tomadas para reestabelecer a estrutura cíclica do grupo anidrido: aquecimento convencional ou aquecimento por irradiação de micro-ondas. Pela abordagem tradicional, a gelatina modificada (50 mg mL⁻¹) foi mantida sob aquecimento em refluxo pelo período de 3,0 horas a 70,0°C. O sistema foi mantido sob agitação

magnética constante durante todo este período. Após esta etapa, a amostra foi dialisada em membrana com poros de 2kDa, durante dois dias contra água. A amostra foi denominada G_MA. Quando a irradiação de micro-ondas foi utilizada, uma alíquota de 5 mL da gelatina modificada (50 mg mL^{-1}) foi transferida para um frasco de reagente e tampado. O frasco foi submetido a irradiação por 4 ciclos de 15 segundos cada. Após esta etapa, a amostra foi dialisada em membrana com poros de 2kDa, durante dois dias contra água. A amostra foi denominada G_MA_MW

Reticulação da gelatina derivatizada em sistema de miniemulsão inversa

A reticulação de nanohidrogéis de gelatina foi obtido através de sistemas de miniemulsão inversa. A fase contínua foi obtida a partir de 10 mL de uma solução de n-heptano com 4% de uma mistura de surfactantes (Tween80 e Span85) com distintos valores de balanço hidrofílico e lipofílico (HLB). Foi utilizado combinações de Span85 e Tween80 que resultaram em HLB de 4,4, 5,0 e 6,0. A fase dispersa foi obtida a partir de 0,8 mL de uma solução de gelatina modificada em água (15% m/m). A miniemulsão foi formada pela mistura da fase dispersa e contínua em um homogeneizador tipo Turrax com velocidade de 20000 rpm durante 2 minutos em banho de gelo - evitando a evaporação do n-heptano. Na sequência, ultrassom de ponteira foi aplicado ao sistema por 20 minutos, utilizando amplitude de 30%. Após este período foi adicionado a cistamina como agente reticulador, sendo aplicado mais 10 minutos de ultrassom sob o sistema. Na sequência, o sistema foi mantido por 48 horas sob agitação magnética a temperatura ambiente, centrifugado e lavado com hexano gelado.

Liberação de Diclofenaco de potássio

O diclofenaco de potássio foi incorporado na amostra de nanohidrogel em duas estratégias: após a reação de reticulação e durante a etapa de reticulação. Após a amostra de nanohidrogel ser liofilizada, uma massa de 5% de diclofenaco de potássio em relação a massa de polímero foi adicionada sobre a dispersão do nanohidrogel, permanecendo por 12 horas sob agitação para absorção do fármaco. Após este período a amostra foi liofilizada novamente para posterior teste de liberação. A eficiência de incorporação de diclofenaco de potássio pode ser considerada 100,00%. A liberação do diclofenaco foi testada em diferentes meios: água, tampão fosfato (pH 7,4) e simulado de fluido gástrico (pH 2,0), na presença e ausência de GHS. As amostras foram dispersas em 20,0 mL de

cada fluido e mantidas sob agitação de 200 rpm e a temperatura de 37,0 °C. Alíquotas de 1,0 mL foram removidas em função do tempo e sua concentração determinada por espectroscopia UV-Vis. O mesmo valor de fluido foi repostado a solução inicial e a liberação cumulativa de diclofenaco de potássio foi calculada de acordo com a Equação 4, no qual o DFK corresponde a massa de diclofenaco de potássio presente no hidrogel, V_0 é o volume total do meio de liberação ($V_0=20,0$ mL), V_t é o volume de alíquotas removida no tempo t ($V_t=1,00$ mL) e C_n é a concentração de diclofenaco na amostra.

$$Liberação(\%) = \frac{V_t \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_{DFK}} \times 100$$

Para o sistema no qual o diclofenaco foi adicionado durante a etapa de reticulação, o mesmo protocolo foi utilizado da seção anterior, acrescido de 5% em massa de DFK para a razão de gelatina modificada utilizada. O mesmo protocolo de liberação foi conduzido, como descrito acima.

Viabilidade celular

Queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) foram cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco, Grand Island, NY, EUA), penicilina/estreptomicina a 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37 °C. Após atingir 90% de confluência, as células entre as passagens 3 e 8 foram lavadas com PBS, recuperadas com solução de tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e ressuspensas em meio fresco. A viabilidade celular foi avaliada indiretamente através da emissão de fluorescência pelo ensaio de resazurina (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As células HaCAT foram semeadas a 8×10^3 células/poço diretamente em placas de poliestireno de 96 poços para a cultura celular em monocamada. Para o grupo controle foi adicionada a nanopartícula de gelatina (0.4 mg/ mL), a nanopartícula de gelatina com cisteína (0.4 mg/ mL), e o DFK (0.4 mg/ mL) em cada poço correspondente. Além disso, células de HaCaT na mesma concentração de amostragem foram inoculadas diretamente na placa de poliestireno para servir como nosso controle positivo. Para os grupos experimentais a nanopartícula de gelatina com cisteína e o DFK em três concentrações distintas 5ug/mL, 10ug/mL,

25ug/mL, 50ug/mL, foram adicionados em cada poço correspondente. Na sequência, 10% de resazurina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram adicionados em cada poço, e mantidos em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C, a intensidade da fluorescência foi medida após 24 horas. A leitura dos resultados foi realizada com um leitor Synergy H1MultiMode (BioTek, Winooski, VT, EUA) utilizando filtros de 520 e 620nm para excitação e emissão, respectivamente. Fluorescência dos valores do controle positivo (células inoculadas diretamente na placa de poliestireno) foram considerados 100% viáveis. O experimental foi realizado em triplicata.

Caracterizações

Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram coletados em um espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Frontier. Para coleta dos espectros foram realizadas 128 varreduras entre o intervalo 4000 a 550 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. Os espectros foram obtidos pela técnica de reflectância total atenuada (ATR), utilizando cristal de seleneto de zinco.

Ressonância magnética nuclear de ¹H

Os espectros de ressonância magnética nuclear ¹H das amostras de gelatina e gelatina modificada foram obtidos em espectrômetro Bruker Ascend de 600 MHz, As amostras (10 mg) foram solubilizadas em d-DMSO. A linha de referência empregada na análise foi de 2,50 ppm referente ao DMSO.

Cromatografia por exclusão de tamanho (SEC)

A distribuição de massa molar da gelatina e seus derivados foram determinados em um cromatógrafo por exclusão de tamanho OMNISEC, da Malvern Instruments. Foi utilizado o detector de índice de refração Viscotek RImax (Malvern Instruments). As amostras foram dispersas em uma solução 0,1 mol L⁻¹ de NaNO₃ e filtradas em membranas de PTFE 0,45 µm. Foram utilizadas três colunas cromatográficas da marca Shodex, modelo SB-806 HQ (SHOWA Denko, Tóquio, Japão), cuja temperatura foi mantida constantemente a 40 °C. Foi utilizado fluxo de injeção da fase móvel de 0,7 mg mL⁻¹. A curva de calibração foi obtida a partir de padrões de PEG, cujas massa molares estão compreendidas entre 224000 e 195 g mol⁻¹ (Varian Palo Alto, CA).

Titulação condutimétrica

A densidade de cargas da amostra de gelatina e gelatina modificada foi determinada utilizando um condutivímetro da marca Logen Scientific, previamente calibrado. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C. As amostras foram dispersas em água deionizada na concentração de 1 mg mL⁻¹. Uma alíquota de 5 mL da amostra foi transferida para um bequer e submetida a agitação magnética. A agitação foi interrompida, realizando a leitura da condutividade após um minuto de estabilização do sistema. A titulação condutimétrica seguiu por adições sucessivas de 30 µL de solução de NaOH (0,001 mol L⁻¹).

Espectroscopia UV-Visível

Os espectros Uv-Visível foram obtidos por espectrofotômetro da marca Perkin Elmer, modelo Lambda 465.

Espalhamento de luz dinâmico e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico das amostras foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, marca Malvern, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, na qual o detector é posicionado em um ângulo de 13° ou 173° em relação à luz incidente sobre a amostra, em uma temperatura de 25° C. As amostras foram dispersas em ponteira ultrassônica com amplitude de 25% e modo pulsado (3 segundos ligado e 3 segundos desligado). Os resultados de potencial zeta foram obtidos no mesmo equipamento, através de medidas de mobilidade eletroforética. As amostras foram dispersas em NaCl (0,001 mol/L e o pH do meio foi alterado utilizando NaOH e HCl (ambos em 0,05 mol/L) como titulantes.

Resultados e Discussão

Modificação e caracterização da gelatina modificada

A modificação da gelatina pelo anidrido maleico tem como objetivo ancorar grupos reativos específicos sobre a estrutura polimérica. Esta reação ocorre em duas etapas, na qual a primeira consiste no ataque nucleofílico de hidroxilas e/ou aminas da gelatina sobre um grupo carboxílico do anidrido maleico, resultando na abertura cíclica desta molécula, seguida por uma etapa de fechamento do anel do anidrido. Esta reação

foi conduzida em meio de DMSO anidro com intuito de evitar reações paralelas sobre a molécula do anidrido maleico, como por exemplo a reação de abertura de anel pela presença de moléculas de água. A figura 4 apresenta um esquema de reação da primeira etapa, na qual é mostrada a formação do intermediário carboxilado. A reação é caracterizada por uma rápida mudança de coloração com a adição do anidrido maleico, passando de amarelo claro para um tom marrom escuro.

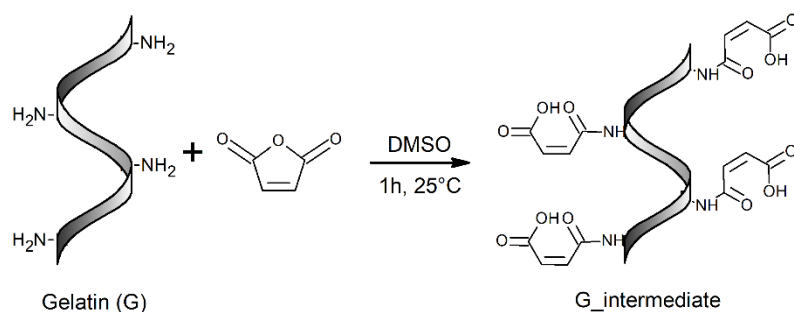


Figura 4. Modificação da gelatina com anidrido maleico: etapa de abertura de anel.

A segunda etapa de modificação consistiu no aquecimento da amostra G_MAI para reestabelecimento do anidrido cíclico. A formação de anidridos cíclicos, preferencialmente os formados por anéis de cinco e seis carbonos possuem estereoquímica favorável para serem obtidos a partir do aquecimento de ácidos dicarboxílicos em um solvente inerte. Garcia-Astrain e colaboradores⁵⁸ demonstraram esta reação a partir da modificação do polímero Jeffamine ED[®] com anidrido maleico, no qual um derivado do anel maleimida foi obtido como produto após 2,5 horas de aquecimento à 70°C. Em um trabalho anterior, Piazza e colaboradores⁵⁹ observaram que o aquecimento do sistema gelatina e anidrido maleico também resulta na formação de grupos maleimidas após 3 horas de aquecimento, utilizando DMSO como solvente da reação. O uso da irradiação de micro-ondas não é recente, no entanto vem sendo cada vez mais utilizada em reações orgânicas devido a melhor seletividade, redução de produtos de degradação e rendimentos superiores com reduzido tempo de reação. Considerando apenas que o solvente é responsável pelo aquecimento e que a capacidade de aquecimento do DMSO é sete vezes superior à da água, um breve estudo comparativo entre o aquecimento convencional e por micro-ondas foi realizado.

Do ponto de vista macroscópico, foi observado a formação de gotículas de água na superfície de ambos os frascos nos quais as amostras foram submetidas ao aquecimento. Este comportamento era esperado, pois o mecanismo de formação do ciclo de maleimida é acompanhado da eliminação de uma molécula de água, conforme indicado no esquema apresentado na figura 5.

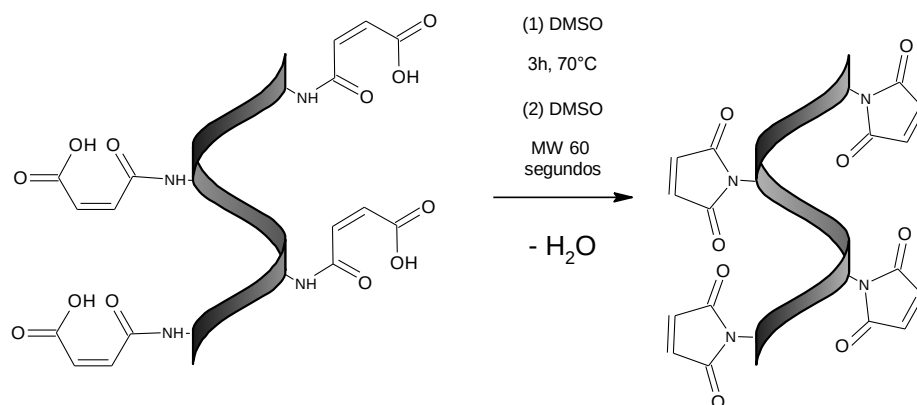


Figura 5. Modificação da gelatina com anidrido maleico: etapa de formação do anel maleimida.

A gelatina é um polieletrólito de origem animal, cuja sequência de aminoácidos é variável e complexa. Muitos grupos funcionais estão presentes na amostra de gelatina e a atribuição de cada um deles é uma tarefa árdua principalmente pela sobreposição de sinais, como pode ser observado para os espectros na região do infravermelho apresentados na figura 6. O destaque deve ser dado ao estiramento de carbonila ($C=O$) na amostra de anidrido maleico em 1775 cm^{-1} . Embora a gelatina também apresente este estiramento, a banda se apresenta deslocada para regiões de menor comprimento de onda, em 1644 cm^{-1} . As amostras de gelatina modificada apresentam um ombro em 1720 cm^{-1} , que pode ser atribuído a modificação da gelatina pelo anidrido maleico, no qual este sinal é mais proeminente na amostra intermediária GMA_I, onde um grupo carboxílico encontra-se livre na estrutura da gelatina. Bandas relativas as torções $C=C$ e $C-H$ do anidrido maleico também são observadas na região de 1200 cm^{-1} e 900 cm^{-1} , confirmando a modificação da gelatina

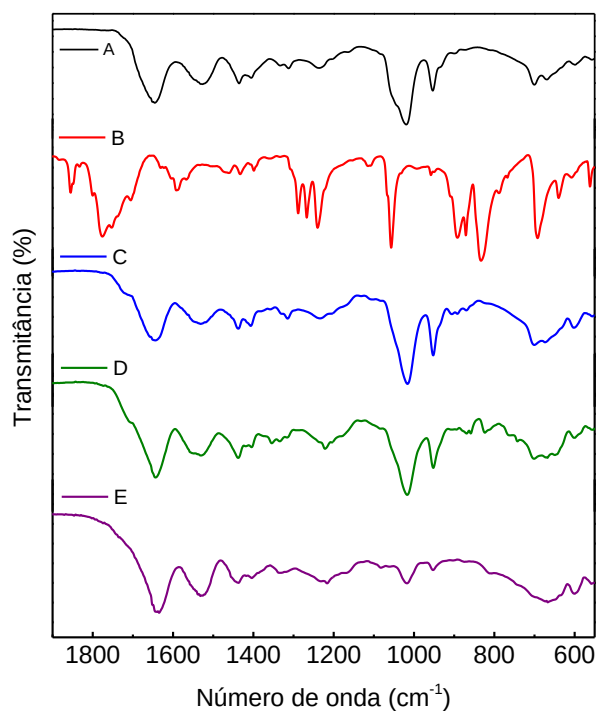


Figura 6. Espectros na região do infravermelho das amostras de (A) gelatina, (B) anidrido maleico, (C) G_MAI, (D) G_MA_MW e (E) GMA_aquecimento.

A figura 7 apresenta os espectros ^1H RMN das amostras de gelatina e gelatina modificada. A complexidade de atribuição de sinais encontradas pelo FTIR também é grande, no entanto alguns deslocamentos podem ser atribuídos a aminoácidos específicos como a ressonância do grupo metil de leucina (Leu), valina (Val) e isoleucina (Ile) em 0,81 ppm. Também relacionado à ressonância dos grupos metílicos, os deslocamentos químicos da treonina (Thr), alanina (Ala) e arginina (Arg) podem ser observados em 1,23 ppm, 1,51 ppm e 1,86 ppm, respectivamente. Prolina (Pro) e Fenilalanina (Phe) correspondem aos deslocamentos em 3,44 ppm e 7,14 ppm⁶⁰. A modificação da gelatina é confirmada pela presença do deslocamento químico referente ao anel maleimida em 6,11 ppm, presente tanto na amostra que foi submetida ao aquecimento quanto na amostra irradiada com micro-ondas. No entanto, a conversão não foi completa em ambos os, sendo observado deslocamentos químicos referente ao ácido maleico em 6,87 ppm e 7,30 ppm. A funcionalização média, proposta por Marref e colaboradore⁶¹, compara os valores da integral dos protos referentes ao anel maleimida ($I_{\text{maleimida}}$) e do ácido maleico ($I_{\text{ac maleico}}$) pela seguinte equação:

$$f = 3x \frac{I_{maleimida}}{I_{maleimida} + I_{ac\ maleico}}$$

Os valores calculados para a amostra aquecida e irradiada foram, respectivamente, 1,01 e 0,97. A proximidade dos valores de funcionalização média indicam um potencial ganho no tempo de modificação da gelatina, tendo em vista que a amostra irradiada foi submetida ao micro-ondas por apenas um minuto frente ao aquecimento de 3 horas da outra amostra.

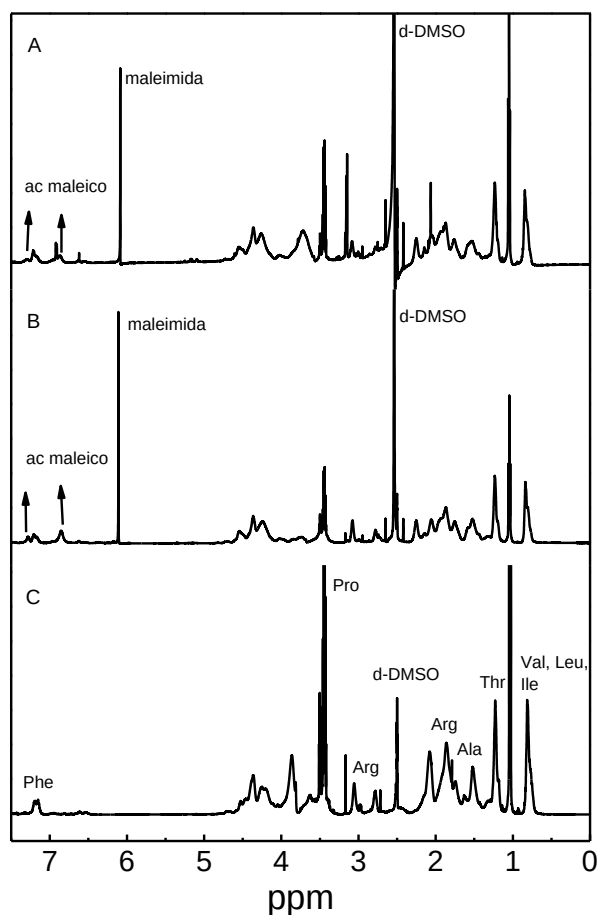


Figura 7. Espectros de ^1H RMN das amostras de (A) GMA_aquecimento, (B) GMA_MW e C) Gelatina.

A modificação da gelatina também foi caracterizada quanto ao tamanho de cadeia polimérica, através da cromatografia por exclusão de tamanho conforme pode ser observado na figura 8. De uma maneira geral, o perfil cromatográfico foi semelhante para todo o conjunto de amostra, sendo observado duas populações através do detector de índice de refração. A segunda população, cujo volume de eluição foi igual 31 mL, apresenta massa molar na ordem de 80 g mol^{-1} e pode estar associada à variação da

concentração do nitrato de sódio que compõe a fase móvel. A amostra de gelatina foi a que apresentou maior massa molar ($4,6 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$), aproximadamente 4 vezes maior que a amostra G_MA_I ($1,2 \times 10^4 \text{ g mol}^{-1}$). Esta diferença pode estar associada a mudança de conformação da molécula proveniente da etapa de modificação, uma vez que o resultado esperado era um pequeno aumento da massa molar devido ao enxerto do anidrido maleico. Quando comparada as duas abordagens para obtenção do anel maleimida, a amostra submetida a aquecimento apresentou massa molar de $7,2 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ enquanto a amostra irradiada com micro-ondas teve sua massa molar reduzida à $3,8 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$. O ganho de tempo de modificação utilizando a radiação de micro-ondas na etapa de obtenção do anel maleimida vem acompanhado de uma drástica redução do tamanho de cadeia.

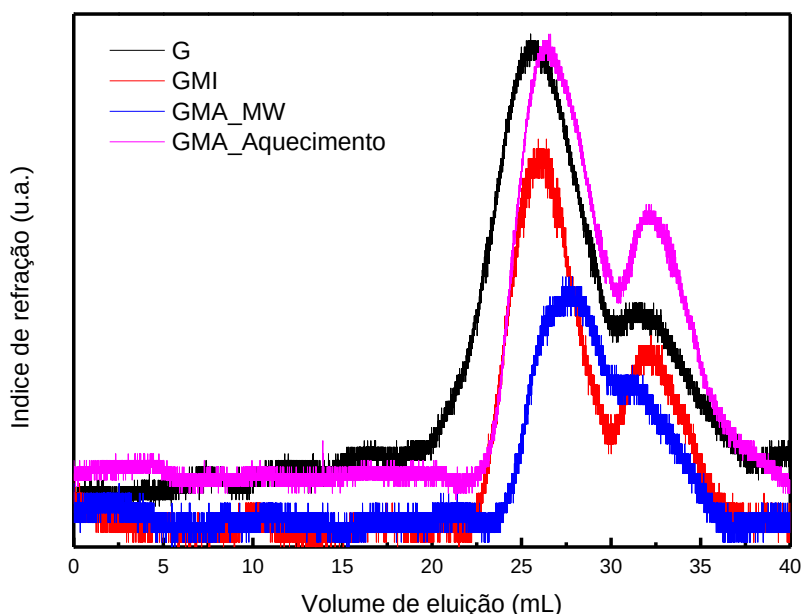


Figura 8. Perfil cromatográfico das amostras de gelatina e gelatina modificada.

O gráfico de condutividade versus concentração de hidróxido de sódio (Figura 9) permite determinar a densidade de cargas da gelatina. Por se tratar de um polieletrólito, a gelatina apresenta tanto grupos carboxílicos quanto grupos amino em sua estrutura. De uma maneira geral, dois segmentos lineares são observados no gráfico, sendo o ponto de intersecção o valor correspondente a total desprotonação dos grupos carboxílicos grupos presente na amostra. Após a intersecção, o valor de condutividade tem um aumento progressivo devido a adição de íons hidroxilas e sódio livres na solução do polieletrólito. O hidróxido de sódio foi escolhido como titulante devido ao anidrido maleico estar

envolvido na etapa de modificação da gelatina. Observa-se na amostra GMA_I um deslocamento na intersecção das retas, referente a maior disponibilidade de grupos carboxílicos livres antes da formação do anel maleimida, seja por aquecimento ou irradiação de micro-ondas. A tabela 2 resume os valores obtidos a partir do ponto de intersecção de cada amostra bem como a grau de enxerto do anidrido maleico sobre a gelatina. O grau de enxerto foi determinado pela equação abaixo:

$$grau\ de\ enxerto = \frac{G + G_{MA_I}}{G_{MA_I}} \times 100$$

na qual G corresponde a quantidade de grupos carboxílicos na amostra de gelatina sem modificação, G_{MA_I} corresponde a amostra de gelatina modificada. O grau de substituição do anel maleimida foi determinado considerando a amostra GMA_I como referência e as amostras submetidas ao aquecimento ou micro-ondas:

$$grau\ substituição = \frac{G_{MA_I} + G_{MA_MW}}{G_{MA_MW}} \times 100$$

Os resultados mostraram que o enxerto de anidrido maleico sobre a estrutura da gelatina foi de aproximadamente 45% e que, considerado esse valor, cerca de 20% do ácido maleico é convertido em anel maleimida independente da fonte de aquecimento. Estes resultados do grau de substituição corroboram com os dados observados pelo RMN, onde a fonte de aquecimento não altera significativamente a formação do anel maleimida. A única vantagem na utilização do microondas foi na redução do tempo de obtenção da gelatina modificada, visto que o grau de enxerto não foi excepcionalmente superior e que houve redução significativa da massa molar da matriz polimérica. Diante dos resultados obtidos, optou-se por seguir os experimentos utilizando o aquecimento convencional

Tabela 2. Grau de enxerto e substituição das amostras de gelatina modificada.

Amostra	Volume NaOH (μ L)	Grupos carboxílicos (mol)	Grau de enxerto / substituição
G	217	2,17E-07	-
GMA_I	394	3,94E-07	44,9%
GMA_MW	306	3,06E-07	22,3%
GMA_Aquecimento	318	3,18E-07	19,3%

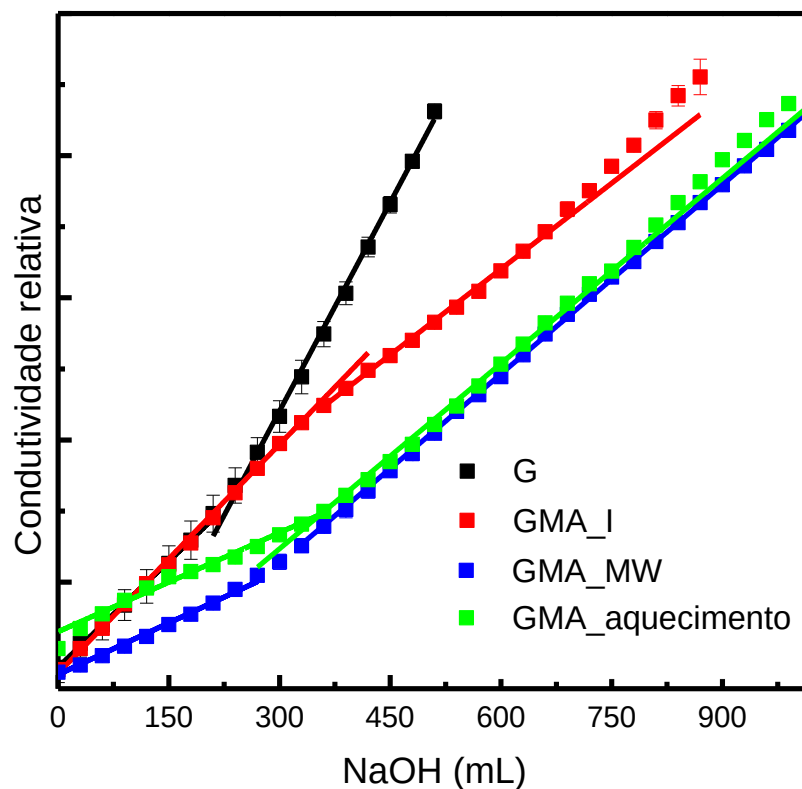


Figura 9. Titulação condutimétrica de amostras de gelatina e gelatina modificadas.

Caracterização dos nanohidrogéis de gelatina

Resumidamente, um sistema em miniemulsão consiste na mistura de uma fase dispersa em uma fase contínua estabilizada pela presença de surfactantes com faixa compreendida entre 50 e 500 nm. A fase óleo consiste em uma solução contendo surfactante, enquanto a fase aquosa é composta pela mistura de polímeros pré-formados e agente de reticulação cruzada. A primeira etapa para obtenção de um sistema de miniemulsão consiste em aplicar um forte sistema de homogeneização, utilizando agitação por rotor estator ou ultrassom. A homogeneização resulta em um sistema disperso na qual pequenas gotículas estão estabilizadas pelo surfactante. Estas gotículas contendo os polímeros e agentes de reticulação atuam como molde para formação do hidrogéis na escala manométrica. Neste sentido, o nanohidrogel formado deve apresentar o mesmo diâmetro e distribuição das gotículas anteriores a reticulação. A introdução de um surfactante em um sistema imiscível reduz a tensão interfacial, facilitando a formação

de emulsão e aumentando assim a estabilidade coloidal ⁶². Os surfactantes não iônicos e zwitteriônicos são preferíveis para aplicações farmacêuticas devido à sua toxicidade reduzida e à sua resiliência a mudanças no pH e na força iônica. Para simplificar o processo de seleção de um surfactante para a fase dispersa de qualquer sistema emulsionado, foi desenvolvido o índice HLB, levando em consideração o equilíbrio dos componentes hidrofílicos e hidrofóbicos do surfactante. O nanohidrogel que apresentou em melhor estabilidade coloidal sem separação visual de fase foi a de HLB 4,4.

Resultados preliminares mostraram a influência da concentração do surfactante na estabilidade e no tamanho das nanopartículas obtidas pela técnica de miniemulsão ^{63,64}. Nesta etapa, foi avaliada a influência da concentração da cistamina como agente de reticulação para obtenção de nanohidrogéis. A figura 10 apresenta o perfil de distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos das gotículas da miniemulsão antes da adição de cistamina e após a reticulação, onde os nanohidrogéis já foram formados. A adição de 60 mg de cistamina corresponde ao estado no qual melhor descreve um sistema em miniemulsão, ou seja, durante a etapa de reticulação as gotículas da fase dispersa atuam como um molde para obtenção do nanohidrogel reticulado, tendo suas partículas concentradas em diâmetros entre 100 e 400 nm. Esta conclusão pode ser obtida avaliando a semelhança entre o perfil de distribuição de tamanho das gotículas da miniemulsão (linha vermelha cheia) e os nanohidrogéis (linha vermelha tracejada). A adição de menor quantidade de cistamina perturba o sistema em miniemulsão, formando diferentes populações de nanohidrogéis distintos do molde estabelecido.

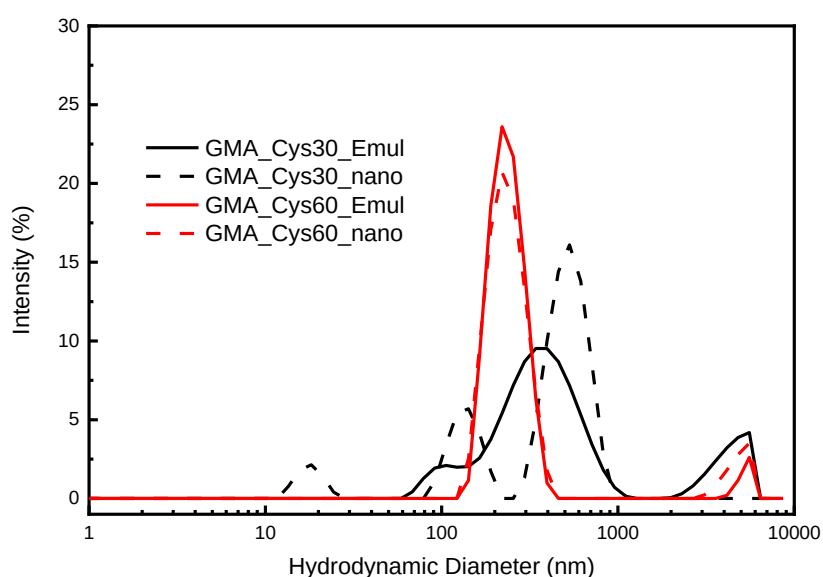


Figura 10. Perfil da distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos das gotículas de miniemulsão (linha cheia) e dos nanohidrogéis (linha tracejada).

A figura 11 ilustra a etapa de reticulação da gelatina. Do ponto de vista reacional, a reticulação ocorre via mecanismo do tipo adição 1,4 de Michael. A reação ocorre entre um doador de Michael, tal como as aminas terminais na molécula da cistamina (nucleófilos) e um receptor de Michael, representado no sistema pelo grupo maleimida enxertado na estrutura da gelatina (grupo carbonila insaturado). A reticulação foi avaliada espectroscopicamente por RMN (figura 12), no qual o sinal do anel da maleimida em 6,11 ppm é consumido pela cistamina durante a reação. Apesar dos resultados mostrarem que o grupo maleimida foi consumido quanto 30 mg de cistamina foi adicionado no sistema, os resultados de espalhamento de luz dinâmico anterior mostram que a reticulação cruzada não foi suficiente para manter a estrutura do nanohidrogel. Desta forma, foi dado sequência as análises os materiais obtidos com 60 mg de cistamina.

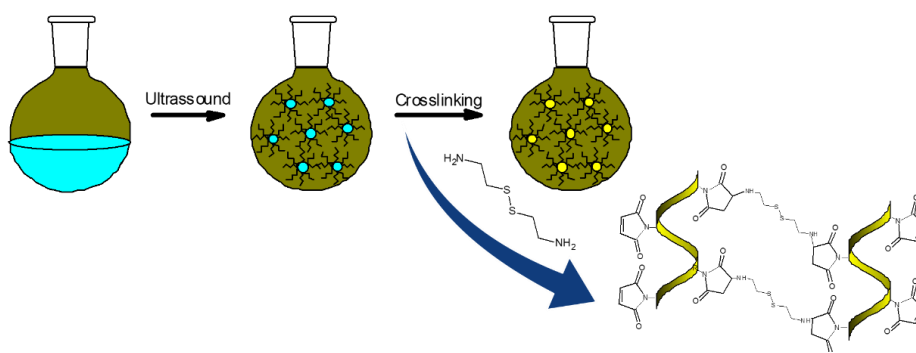


Figura 11. Esquema do processo de reticulação em sistemas de miniemulsão inversa.

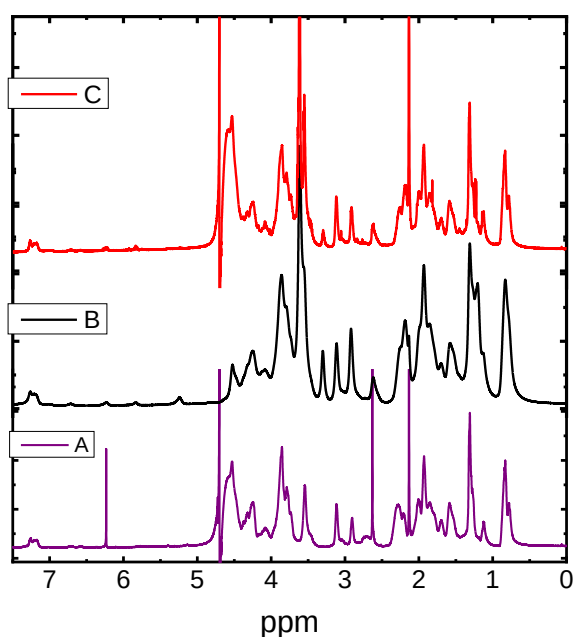


Figura 12. Espectros de ^1H NMR das amostras (A) GMA, (B) GMA_30Cys e (C) GMA_60Cys.

As curvas de potencial zeta em função do pH para amostra de gelatina e nanohidrogel de gelatina (Figura 13) também corrobora com os resultados anteriormente. O potencial zeta caracteriza as propriedades superficiais de coloides. O ponto isoelétrico (IEP) corresponde ao pH no qual a densidade de cargas sobre superfícies é nula. Assim, a gelatina pura apresenta ponto isoelétrico igual a 5.17 devido a maior quantidade de grupos amina na superfície da sua estrutura polimérica. Por sua vez, os nanohidrogéis de gelatina têm o ponto isoelétrico deslocado para pH igual a 3,64, justificado pelo consumo dos grupos aminas durante a etapa de derivatização e reticulação. O potencial zeta é um parâmetro fundamental para controle da estabilidade coloidal. De acordo com a teoria DLVO, dispersões coloidais como os sistemas em miniemulsão apresentam estabilidade coloidal quando o valor de potencial zeta é, em módulo, superior a 30 mV. Os resultados obtidos confirmam a estabilidade dos nanohidrogéis de gelatina quando o meio de dispersão apresenta valor de pH superior a 5, cobrindo ampla faixa dos fluidos fisiológicos em condições saudáveis ou mesmo em caso de doenças como infecções e câncer.

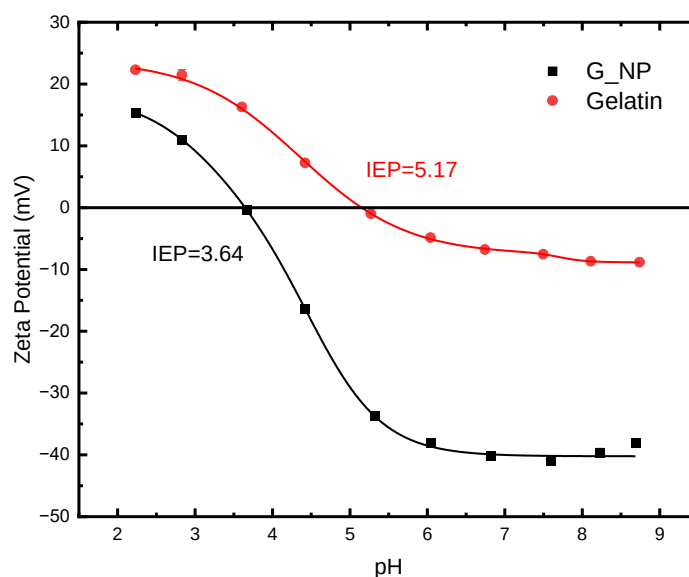


Figura 13. Curva de potencial zeta versus pH para amostra de gelatina e nanohidrogéis de gelatina.

Liberação de Diclofenaco de potássio

A espectroscopia UV-Vis foi utilizada para quantificar a concentração de diclofenaco de potássio no estudo de liberação da matriz de nanohidrogel. O espectro de absorção obtido apresenta uma única banda característica em 276 nm. A direita da Figura 14 apresenta a curva analítica obtida a partir de concentrações conhecidas de diclofenaco de potássio, resultando em uma reta cujo valor de absorvidade molar obtido foi de $0,0049 \text{ L } \mu\text{mol cm}^{-1}$, com coeficiente de correlação linear de 0,999.

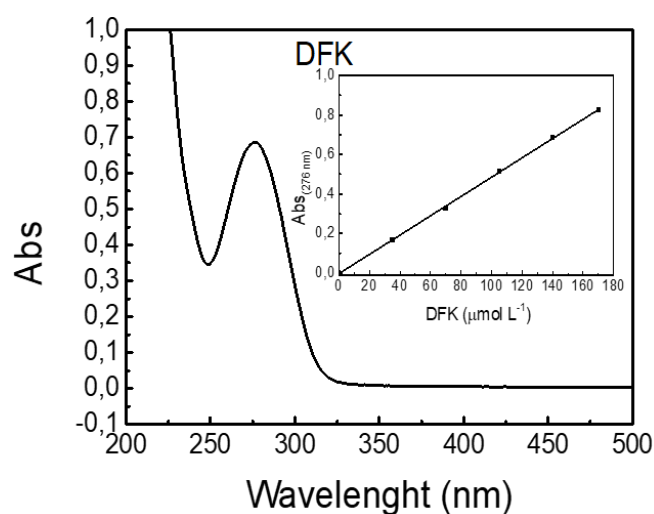


Figura 14. Espectro UV/Vis do fármaco diclofenaco de potássio e curva analítica da amostra obtida em PBS .

A figura 15 apresenta o perfil de liberação do diclofenaco quando incorporada a matriz de nanohidrogel de gelatina após a etapa de reticulação. Observa-se que mais de 50% do fármaco incorporado é liberado nas primeiras duas horas, fenômeno conhecido como efeito burst, independente do meio utilizado. Tal efeito está correlacionado a alta concentração de fármaco na superfície do carreador de gelatina, além da baixa interação entre a matriz polimérica e o DFK. No entanto, é possível observar a influência do meio suplementado com GSH sobre as ligações de dissulfeto após o efeito burst, no qual o perfil das curvas é alterado. Após 24 horas de liberação 98% do fármaco é liberado do nanohidrogel quando o meio de PBS é suplementado com GSH, enquanto em PBS puro a liberação alcançada corresponde apenas a 82%. Apesar de comprovar a presença das ligações cruzadas de dissulfeto sobre o nanohidrogel, a liberação do fármaco foi muito rápida utilizando esta metodologia. A estratégia utilizada para contornar a rápida liberação foi incorporando o diclofenaco no momento da reticulação.

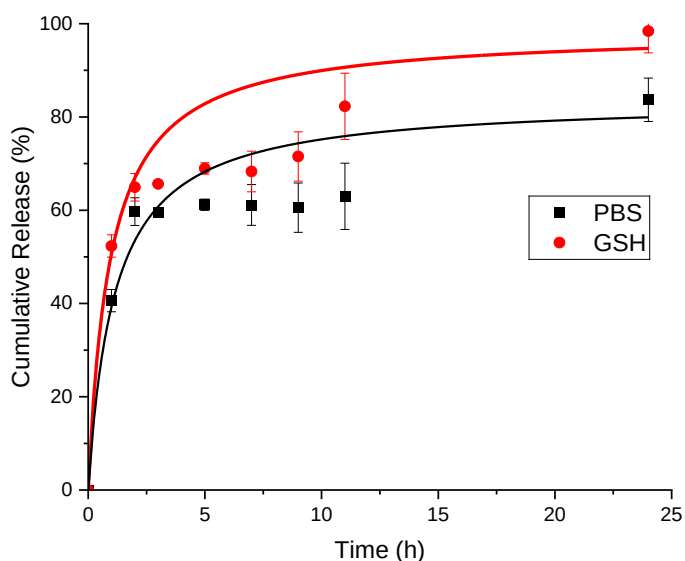


Figura 15, Perfil de liberação de diclofenaco de potássio incorporado ao nanohidrogel após a reticulação.

A molécula de diclofenaco possui no meio da sua estrutura uma amina secundária, capaz de reagir com o anel maleimida da gelatina modificada através da reação de adição de Michael. Este mecanismo de reação é o mesmo utilizado para reticulação do hidrogel com a cistamina e é evidente que deva ocorrer uma competição entre ambas as moléculas. A figura 16 apresenta o perfil de liberação do fármaco quando o diclofenaco é adicionado

durante a etapa de reticulação. Embora seja observado o efeito burst na primeira hora do teste de liberação, este efeito é menor quando comparado com o protocolo de incorporação após a etapa de reticulação. Quando o PBS é utilizado como meio, a liberação após 1 hora de experimento é cerca de 30%, indicando uma melhora significativo para obtenção de uma plataforma com liberação controlada. Porém, após quatro horas o perfil de liberação atinge um platô, com aproximadamente 40% do fármaco liberado. Nota-se que o meio suplementado com GSH apresenta um perfil de liberação superior, no entanto menos influente. A figura x também avalia a influencia do pH do meio, no qual o PBS é comparado com simulado de fluido gástrico, cujo pH é igual a dois. Nesta condição, a solubilidade do diclofenaco é reduzida e, conseqüentemente, a liberação da matriz de nanohidrogel reduzida para cerca de 25%, independentemente de o meio estar suplementado com GHS.

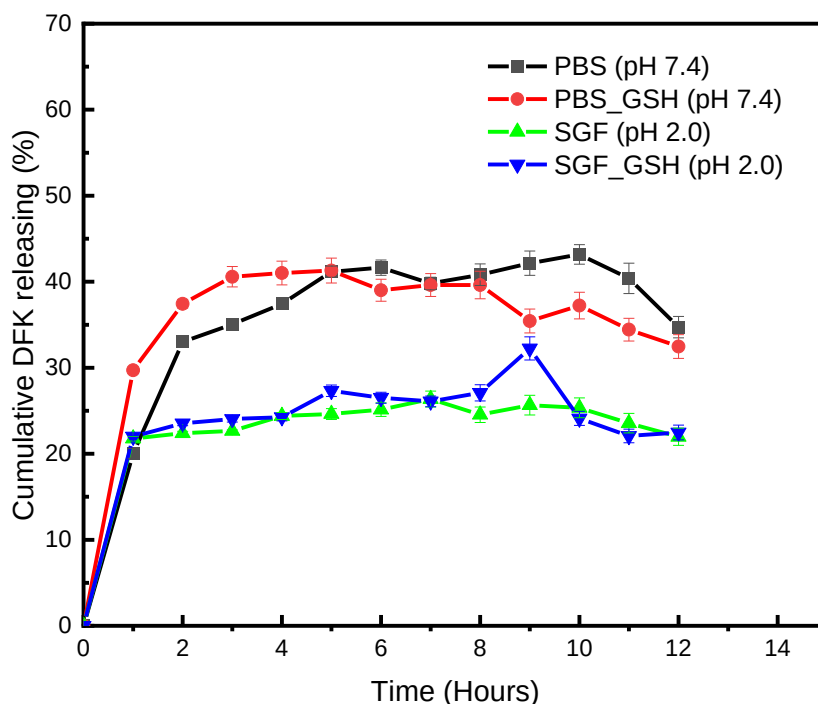


Figura 16: Perfil de liberação de diclofenaco de potássio incorporado ao nanohidrogel durante a reticulação.

Com amostras do mesmo lote utilizado no teste de liberação foi realizado acompanhamento do perfil do diâmetro hidrodinâmico em função do tempo. As medidas foram realizadas em condições semelhantes à liberação, ou seja, 37°C e agitação em 200 rpm. Aliquotas de 1 mL foram transferidas para cubeta e foi determinado o diâmetro hidrodinâmico por espalhamento de luz dinâmica nos ângulos de 13° e 173°. Os

equipamentos projetados pela Malvern utilizam com frequência o ângulo de 173°, pois permite analisar amostras concentradas indicando sempre um menor diâmetro hidrodinâmico. A figura 17 apresenta o perfil das amostras neste ângulo, em pH distinto e com meio suplementado com GSH. Assim como no teste de liberação o efeito do pH é mais notório do que a influência do GSH. Quando o simulado gástrico (pH 2,0) foi utilizado como meio, observou-se uma pequena diminuição do diâmetro hidrodinâmico das amostras na primeira hora de análise, tendo uma redução de 20 nm e mantendo-se constante durante o período analisado em torno de 100 nm. Comportamento semelhante foi observado para amostra em PBS (pH 7,4), mantendo-se estável em torno de 50 nm, exceto para a amostra suplementada em GSH, cujo aumento do diâmetro hidrodinâmico ocorreu a partir de 7 horas de liberação.

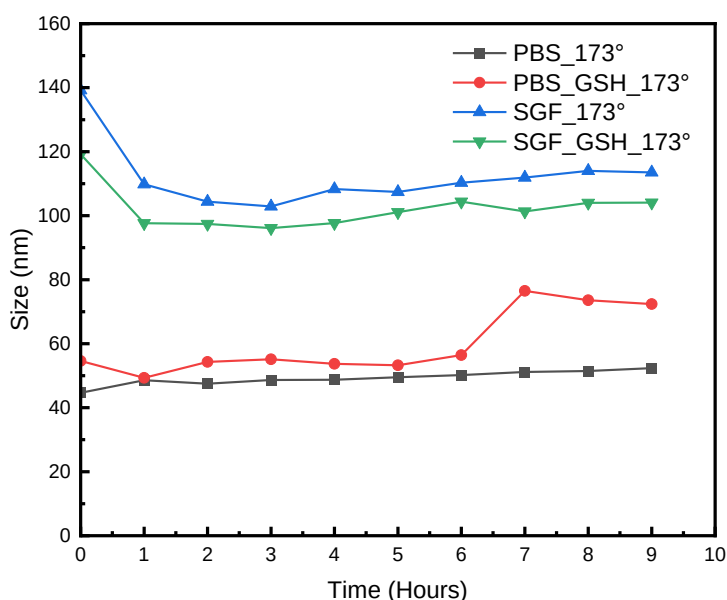


Figura 18. Curva de diâmetro hidrodinâmico em função do tempo considerando as mesmas condições de liberação do diclofenaco para medições realizadas a 173°.

Para nanopartículas esféricas ou moléculas anisotrópicas como o tolueno, é esperado que o diâmetro hidrodinâmico seja mantido constante durante a análise em diferentes ângulos. Desta forma, o mesmo experimento foi acompanhado no ângulo de 13°. A figura 19 apresenta os gráficos individualizados da liberação para cada meio utilizado. É possível observar que houve variação significativa nos diâmetros hidrodinâmicos em 13°. Considerando apenas o PBS como meio, que o diâmetro hidrodinâmico em 13° apresentou maior desvio para o sistema suplementado com GSH,

principalmente a partir de 6 horas de análise. Embora nenhum fenômeno tenha sido observado neste tempo para curva de liberação do diclofenaco, é possível que a ruptura total do nanohidrogel de gelatina tenha ocorrido neste período. Para as amostras dispersas em fluido simulado gástrico, foi observado a presença de agregados maiores e este fato pode estar associado a proximidade do ponto isoelétrico, dificultando a interpretação dos resultados.

De acordo com a teoria de espalhamento de luz, é possível determinar o fator de forma de polímeros através do espalhamento de luz estático. Embora o equipamento da Malvern forneça os dados no modo dinâmico, é possível avaliar a média do espalhamento de luz e aplicar os conceitos de acordo com a lei de Rayleigh para extrair parâmetros como o fator de forma. Para os polímeros, o fator de forma pode passar de novos rígidos, como o nanohidrogel, para modelos com conformação aleatória, correspondente a cadeias de polímeros expandidas e livres. Até o presente momento não foi possível converter os dados obtidos pelo espalhamento de luz dinâmico em diferentes ângulos em um gráfico de fator de forma em função do tempo de liberação, no entanto os gráficos do perfil do diâmetro hidrodinâmico permitem uma conclusão prévia de que há alteração do fator de forma durante a liberação do diclofenaco.

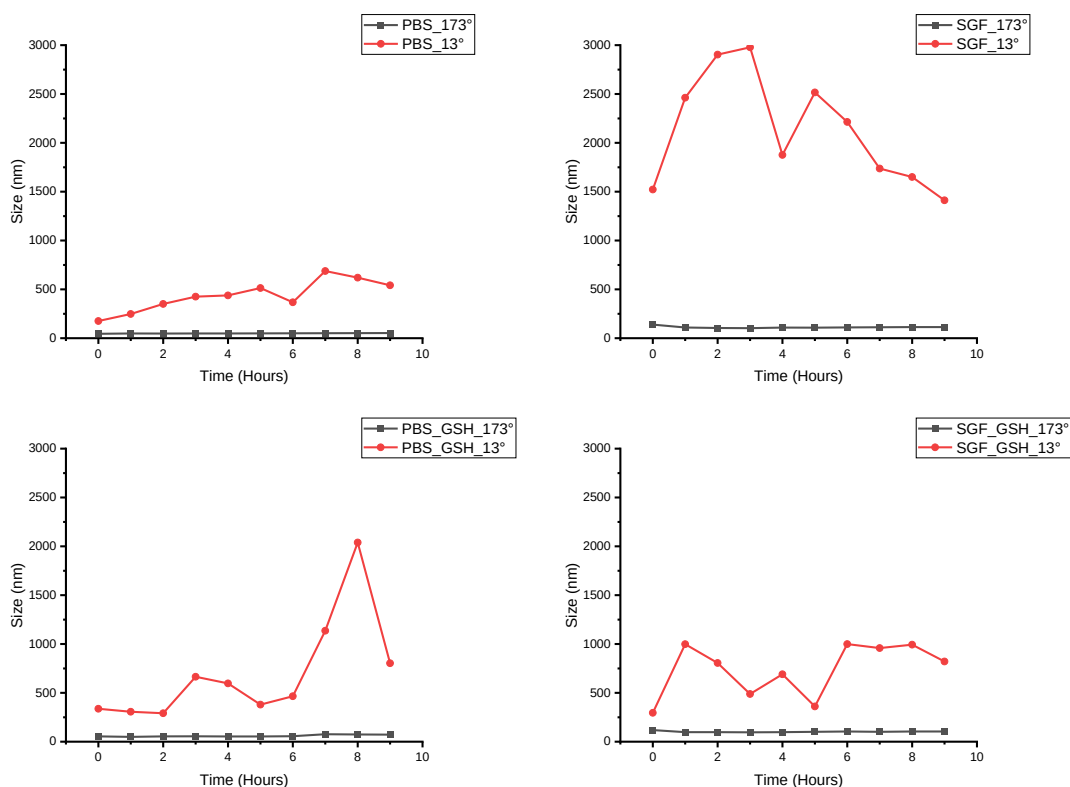


Figura 19. Curva de diâmetro hidrodinâmico em função do tempo considerando as mesmas condições de liberação do diclofenaco para medições realizadas a 13° e 173°.

Viabilidade celular

Os resultados apresentados na figura 20 demonstram a correlação entre a viabilidade celular em função dos nanohidrogéis de gelatina vazios e carregados com diclofenaco em concentrações distintas obtidos por teste colorimétrico com Alamar blue. A coluna C+ corresponde ao controle positivo de cultura celular, no qual não são contabilizadas células mortas. A figura mostra que a absorbância para os grupos de nanohidrogéis carregados com diclofenaco não apresenta diferença estatística (teste ANOVA) com o grupo controle. Este resultado mostra que o uso de nanohidrogéis de gelatinas carregados com diclofenaco nas concentrações de 5 a 50ug/mL são seguros para aplicação em nível celular, não ocasionando nenhum efeito que levasse a morte das células estudadas. Diferente do resultado obtido quando o diclofenaco livre foi avaliado, no qual é possível observar diminuição da intensidade da absorbância, ocasionado pela falta de atividade celular.

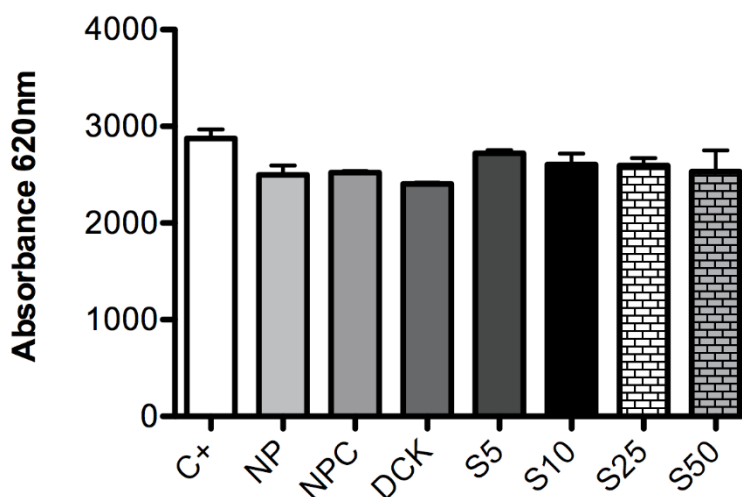


Figura 20. Viabilidade celular das amostras controle positivo (C+), nanohidrogel de gelatina (NP), nanohidrogel de gelatina carregada com diclofenaco (NPC), diclofenaco livre (DCK), nanohidrogel de gelatina carregadas com diclofenaco nas concentrações 5ug/mL (S5), 10ug/mL (S10), 25ug/mL (S25) e 50ug/mL (S50).

Conclusões

O estudo destaca a necessidade crítica de dispositivos médicos inovadores para combater o cancer, tal como sublinhado pela Organização Mundial de Saúde. O desenvolvimento de nanohidrogéis à base de gelatina, modificados com grupos maleimida e reticulados com dicloridrato de cistamina e, demonstra potencial promissor para administração direcionada de medicamentos. A caracterização detalhada utilizando técnicas analíticas avançadas confirmou a eficácia da reticulação e do encapsulamento do medicamento, resultando em perfis de liberação controlada influenciados pela glutathione. Ainda é necessária compreensão mais detalhada sobre o mecanismo de liberação e comportamento de nanohidrogel de gelatina em solução, porém as avaliações de viabilidade celular confirmam a biocompatibilidade destes nanohidrogéis, sugerindo o seu potencial como plataformas seguras e eficazes para futuros métodos de tratamento.

O estágio de pós-doutorado foi uma etapa importante para a formação e desenvolvimento pessoal e científico do bolsista. No período foram publicados 21 artigos entre trabalhos desenvolvidos dentro do grupo de pesquisa e em colaboração, participação em congressos e desenvolvimento de material didático através da gravação de aulas experimentais durante as restrições sanitárias da Covid-19. A pesquisa permitiu o aprofundamento na compreensão e interpretação dos resultados, principalmente das técnicas de potencial zeta e espalhamento de luz. Neste período foi notório o amadurecimento científico, avaliado pelo aumento das colaborações com outros grupos de pesquisa de áreas correlatas, como a odontologia através da síntese e caracterização de materiais poliméricos aplicados.

Orientações

O bolsista co-supervisionou os acadêmicos Bianca Alves Velede, Vitor M. Visoná, Gleiceane Costa, Raphaella Lourenço e Vitor Hugo Cavalcanti Juliana T. Yokoyama nas atividades de iniciação científica. A co-supervisão ocorreu pelo auxílio na conceitualização dos projetos de iniciação científica, pelo treinamento para aquisição de dados nos equipamentos disponíveis no laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides e discussão dos resultados obtidos. Destaca-se ainda que neste período os discentes Raphaella Lourenço e Vitor M. Visoná foram premiados como melhor poster na fase local do Congresso de Iniciação Científica da UNESP nos anos de 2022 e 2023, respectivamente. O trabalho de conclusão de curso em Engenharia Química do discente Paulo Henrique Beltrami foi co-orientado pelo bolsista.

Disciplinas ministradas

O bolsista atuou nas disciplinas de Físico Química Experimental I para o curso de Bacharelado em Química e Bacharelado em Química Tecnológica, Físico Química Experimental II para o curso de Bacharelado em Química e Físico Química Experimental I para o curso de Engenharia Química. O bolsista atuou na gravação de vídeo aulas contendo todos os experimentos do curso de bacharelado, visto que a disciplina experimental ocorreu de maneira remota. Os vídeos estão disponíveis no youtube através do link (<https://www.youtube.com/@rodrigofernandocostamarque1952/videos>) e alguns chegaram a marca de 2,5 mil visualizações, tendo alcance além dos discentes envolvidos na disciplina. Além das gravações o bolsista participou ativamente das aulas virtuais, na correção dos relatórios e prova.

1. Físico-Química Experimental. (Carga Horária 40h)

Curso: Engenharia Química

Período: 05/2022 – 08/2022

2. Físico-Química Experimental I. (Carga Horária 40h)

Curso: Bacharelado em Química e Bacharelado em Química Tecnológica

Período: 04/2021 – 08/2021

3. Físico-Química Experimental II. (Carga Horária 40h)

Curso: Bacharelado em Química

Período: 09/2020 – 03/2021

Atividades de extensão

O início deste estágio de pós-doutorado foi concomitante com as restrições sanitárias impostas pela pandemia de Covid-19. No início da pandemia foi recorrente a ausência de álcool em gel no mercado nacional, além do aumento no preço do insumo polimérico para obtenção. Diante deste cenário, o IQ-UNESP promoveu uma força tarefa para produção e distribuição de álcool em gel para instituições públicas (hospitais, delegacias e escolas) e instituições de caridade (asilos, orfanatos) na cidade de Araraquara e região. O IQ-UNESP recebeu doações de álcool das indústrias sucroalcooleiras da região, além de insumos a base de celulose modificada utilizados como agente gelificante. O bolsista atuou neste projeto de extensão no estabelecimento do protocolo para obtenção do álcool em gel a partir de celulose modificada, na produção, envase e entrega dos produtos. A duração média desta força tarefa foi de 6 meses.

Bancas avaliadoras

O bolsista participou como avaliador de todos os congressos de iniciação científica da UNESP no período. No que se refere a atuação como banca avaliadora, o bolsista participou das seguintes defesas:

Bancas de graduação/Trabalho de conclusão de Curso

1. MARQUES, R.F.C.; **PIAZZA, R.D.**; VILLULLAS, H. L. M. Participação em banca de Letícia Grizone Bernussi. **Revisão sobre composição de revestimentos intumescentes**, 2023 (Bacharelado em Química) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Exames de Qualificação

1. GODOI, D. R. M.; DOURADO, A. H. B.; **PIAZZA, R.D.** Participação em banca de Débora Kyra dos Santos Oliveira. Desenvolvimento de suportes de catalisadores a base de bagaço de cana de açúcar para a eletrocatalise de espécies do ciclo do nitrogênio. 2024. Exame de qualificação (Mestrando em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

2. MONTEIRO, M. F.; SOUZA, J. G. S.; **PIAZZA, R.D.**; BARAO, V. A. R.. Participação em banca de Caroline Dini. **Uso de hidrogéis antimicrobianos para o tratamento e prevenção de infecções associadas a implantes dentários**. 2024. Exame de qualificação (Doutorando em Clínica Odontológica) - Universidade Estadual de Campinas.

3. GUASTALDI, A. C.; CARVALHO, J.; **PIAZZA, R.D.** Participação em banca de Alessandro de Oliveira (Mestrado). **Projeto e construção de uma impressora 3d obtenção de scaffolds por meio da tecnologia FDM**, 2022. (ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Bancas de Pós-Graduação

1. GUASTALDI, A. C.; SILVA, M. M.; **PIAZZA, R.D.** Participação em banca de Alessandro de Oliveira. **Projeto e construção de uma impressora 3D para obtenção de scaffolds por meio da tecnologia FDM**. 2023. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

2. DA SILVA NUNES, ELOIZA; **PIAZZA, R.D.**; PEREIRA, P. S. Participação em banca de LORENA LEMES DE FREITAS. **Extratos de folhas de sangra d'água (croton urucurana baill.): obtenção, caracterização fitoquímica, nanoencapsulamento e avaliação da atividade antifúngica**, 2020. Dissertação (Agroquímica) - Instituto Federal Goiano

Outras atividades relevantes

Durante o período do estágio de pós-doutorado o bolsista atuou na colaboração científica em diversos projetos. Alguns dos resultados já foram publicados (ver lista anexa com as publicações do período e outros resultados ainda estão sendo finalizados para publicação.

- Dra Erica D. de Avila vinculada ao departamento de materiais odontológicos e prótese, Faculdade de Odontologia Unesp Araraquara (FOAR). Duas frentes de pesquisa foram alvos da colaboração: 1) Desenvolvimento de hidrogéis termossensitivos de polivinilcaprolactma (PNVCL) para liberação de tetraciclina para aplicações odontológicas; 2) Desenvolvidos de filmes poliméricos de ácido meta-acrílico copolimerizado com polietilenoglicol (poli(MAA-co-PEGMA)) para revestimentos de implantes odontológico a base de titânio. A carga de superfície dos filmes foi ajustada para maior adesão celular e os materiais caracterizados em função da molhabilidade e potencial zeta de superfície. Um artigo de revisão foi submetido sobre o emprego de filmes poliméricos em materiais aplicados a odontologia, assim como pedido de patente do material biomédico.
- Prof. Dr. Jonas Contiero, IPBEN Unesp/Rio Claro. 1) Caracterização estrutural e estabilidade coloidal de rhamnolipídeos aplicados à indústria farmacêutica. 2) Caracterização físico-química de poli(hidroxibutirato) (PHA/PHB) obtidos a partir de fontes renováveis.
- Prof. Dr Antonio Carlos Guastaldi, IQ/UNESP. 1) Incorporação de fosfatos de cálcio em membranas de látex natural para regeneração óssea. Os resultados obtidos estão em fase de redação de artigo e submetido para apresentação oral no 14th International Conference on Ceramic Materials and Components for Energy and Environmental Systems, a ser realizado em Agosto de 2024, Budapeste, Hungria. 2) Síntese de fosfatos de cálcio para aplicações odontológicas.
- Prof. Dr. Rondinelli D. Herculano, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Unesp/Araraquara. 1) Caracterização de nanopartículas de prata por espalhamento de luz e análises termogravimétricas de filmes poliméricos. 2) Caracterização de superfícies (molhabilidade e energia livre de superfícies).

Comentários do Supervisor

O pesquisador desenvolveu o projeto proposto e alcançou resultados significativos no avanço do tema proposto. O pesquisador esteve sempre motivado e proativo e também contribuiu muito para a supervisão dos demais alunos de IC e pós graduação do grupo. Os resultados foram publicados em periódicos especializados. Agradeço a oportunidade dado ao pesquisador através da bolsa. Sou de parecer totalmente favorável a aprovação do relatório

Referências

1. ORGANIZATION, W. H. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/en/ (accessed May 22, 2019).
2. ORGANIZATION, W. H. Global status report on noncommunicable diseases http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44579/1/9789240686458_eng.pdf%3E (accessed Feb 11, 2015).
3. nanomedicine-in-cancer @ www.etp-nanomedicine.eu.
4. Fleige, E.; Quadir, M. a; Haag, R. ;*Adv Drug Deliv Rev* **2012**, 64, 866.
5. Kalepu, S.; Nekkanti, V. ;*Acta Pharm Sin B* **2015**, 5, 442.
6. Lu, Y.; Park, K. ;*Int J Pharm* **2013**, 453, 198.
7. Padrela, L.; Rodrigues, M. A.; Duarte, A.; Dias, A. M. A.; Braga, M. E. M.; de Sousa, H. C. ;*Adv Drug Deliv Rev* **2018**, 131, 22.
8. Göke, K.; Lorenz, T.; Repanas, A.; Schneider, F.; Steiner, D.; Baumann, K.; Bunjes, H.; Dietzel, A.; Finke, J. H.; Glasmacher, B.; Kwade, A. ;*European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, 126, 40.
9. Khadka, P.; Ro, J.; Kim, H.; Kim, I.; Kim, J. T.; Kim, H.; Cho, J. M.; Yun, G.; Lee, J. ;*Asian J Pharm Sci* **2014**, 9, 304.
10. Bajpai, A. K.; Shukla, S. K.; Bhanu, S.; Kankane, S. **2008**, 33, 1088.
11. Sagnella, S. M.; McCarroll, J. A.; Kavallaris, M. ;*Nanomedicine* **2014**, 10, 1131.
12. Chen, Y.; Liu, L. ;*Adv Drug Deliv Rev* **2012**, 64, 640.
13. Park, K. ;*J Control Release* **2014**, 190, 3.
14. Manadas, R.; Pina, M. E.; Veiga, F. ;*Revista Brasileira de Ciência Farmacêuticas* **2002**, 38.
15. Siegel, R. A. ;*Journal of Controlled Release* **2014**, 190, 337.
16. Issaka, E.; Mary, .; Wariboko, A.; Enock, .; Agyekum, A. ;*Biomedical Materials & Devices 2023* **2023**, 1, 1.
17. Sun, Q.; Wang, Z.; Liu, B.; He, F.; Gai, S.; Yang, P.; Yang, D.; Li, C.; Lin, J. ;*Coord Chem Rev* **2022**, 451.
18. Brandt, J. V.; Piazza, R. D.; dos Santos, C. C.; Vega-Chacón, J.; Amantéa, B. E.; Pinto, G. C.; Magnani, M.; Piva, H. L.; Tedesco, A. C.; Primo, F. L.; Jafelicci, M.; Marques, R. F. C. ;*Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, 177, 228.

19. Danafar, H.; Davaran, S.; Rostamizadeh, K.; Valizadeh, H.; Hamidi, M. ;*Adv Pharm Bull* **2014**, 4, 501.
20. Gaucher, G.; Dufresne, M.-H.; Sant, V. P.; Kang, N.; Maysinger, D.; Leroux, J.-C. ;*Journal of Controlled Release* **2005**, 109, 169.
21. Ta, T.; Convertine, A. J.; Reyes, C. R.; Stayton, P. S.; Porter, T. M. ;*Biomacromolecules* **2010**, 11, 1915.
22. Jain, S.; Mishra, V.; Singh, P. **2003**, 261, 43.
23. Masood, F. ;*Materials Science and Engineering: C* **2015**, 60, 569.
24. Piazza, R. D.; Brandt, J. V.; Gobo, G. G.; Tedesco, A. C.; Primo, F. L.; Marques, R. F. C.; Junior, M. J. ;*Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2018**, 555.
25. Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P. ;*Adv Drug Deliv Rev* **2008**, 60, 1638.
26. Ganguly, K.; Chaturvedi, K.; More, U. A.; Nadagouda, M. N.; Aminabhavi, T. M. ;*Journal of Controlled Release* **2014**, 193, 162.
27. Caló, E.; Khutoryanskiy, V. V **2015**, 65, 252.
28. Mahinroosta, M.; Jomeh, Z.; Allahverdi, A.; Shakoori, Z. ;*Mater Today Chem* **2018**, 8, 42.
29. Pellá, M. C. G.; Lima-tenório, M. K.; Tenório-neto, E. T. ;*Carbohydr Polym* **2018**, 196, 233.
30. Outline, C. *Hydrogels for biomedical applications*; 2018.
31. Hoffman, A. S. ;*Advance Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 18.
32. Zhang, J. L.; Srivastava, R. S.; Misra, R. D. K. ;*Langmuir* **2007**, 23, 6342.
33. Zhang, J.; Misra, R. D. K. ;*Acta Biomater* **2007**, 3, 838.
34. Cheng, R.; Meng, F.; Deng, C.; Klok, H. A.; Zhong, Z. ;*Biomaterials* **2013**, 34, 3647.
35. Wei, L.; Cai, C.; Lin, J.; Chen, T. ;*Biomaterials* **2009**, 30, 2606.
36. Numata, K.; Yamazaki, S.; Naga, N. ;*Biomacromolecules* **2012**, 13, 1383.
37. Aryal, S.; Hu, C. M. J.; Zhang, L. ;*Small* **2010**, 6, 1442.
38. Yan, S.; Xiaoqiang, L.; Shuiping, L.; Xiumei, M.; Ramakrishna, S. ;*Colloids Surf B Biointerfaces* **2009**, 73, 376.
39. Bini, R. A.; Silva, M. F.; Varanda, L. C.; da Silva, M. A.; Dreiss, C. A. ;*Colloids Surf B Biointerfaces* **2017**, 157, 191.
40. Buenger, D.; Topuz, F.; Groll, J. ;*Prog Polym Sci* **2012**, 37, 1678.
41. Cheng, W.; Gu, L.; Ren, W.; Liu, Y. ;*Materials Science and Engineering C* **2014**.

42. Vega-Chacón, J.; Debone Piazza, R.; Costa Marques, R. F.; Elaissari, A.; Jafelicci, M. ;*Polym Int* **2019**, 68, 88.
43. Wang, Y.; Gao, F.; Li, X.; Niu, G.; Yang, Y.; Li, H.; Jiang, Y. Tumor microenvironment-responsive fenton nanocatalysts for intensified anticancer treatment. *J Nanobiotechnology* **2022**, 20, 69.
44. Cui, Q.; Wang, J. Q.; Assaraf, Y. G.; Ren, L.; Gupta, P.; Wei, L.; Ashby, C. R.; Yang, D. H.; Chen, Z. S. ;*Drug Resistance Updates* **2018**, 41, 1.
45. Dietzen, D. J. In *Principles and Applications of Molecular Diagnostics*; Elsevier, 2018; pp. 345–380.
46. Desideri, E.; Ciccarone, F.; Ciriolo, M. R. ;*Nutrients* **2019**, 11, 1926.
47. Brülisauer, L.; Gauthier, M. A.; Leroux, J. ;*Journal of Controlled Release* **2014**, 6.
48. Alsehli, M. ;*Saudi Pharmaceutical Journal* **2020**, 28, 255.
49. Lim, J. J.; Grinstein, S.; Roth, Z. ;*Front Cell Infect Microbiol* **2017**, 7, 191.
50. Dharmaraja, A. T. ;*J Med Chem* **2017**, 60, 3221.
51. Monteiro, P. F.; Travanut, A.; Conte, C.; Alexander, C. ;*Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2021**, 13.
52. Jhaveri, A.; Deshpande, P.; Torchilin, V. ;*Journal of Controlled Release* **2014**, 190, 352.
53. McGrath, J. E.; Hickner, M. A.; Höfer, R. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*; 2013; Vol. 10, p. 849.
54. Santoro, M.; Tatara, A. M.; Mikos, A. G. ;*Journal of Controlled Release* **2014**, 190, 210.
55. Elzoghby, A. O. ;*Journal of Controlled Release* **2013**, 172, 1075.
56. Nguyen, A. H.; Mckinney, J.; Miller, T.; Bongiorno, T.; Mcdevitt, T. C. ;*Acta Biomater* **2015**, 13, 101.
57. Gan, T. J. ;*Curr Med Res Opin* **2010**, 26, 1715.
58. García-Astrain, C.; Gandini, A.; Peña, C.; Algar, I.; Eceiza, A.; Corcuera, M.; Gabilondo, N. ;*RSC Adv* **2014**, 4, 35578.
59. Piazza, R. D.; Brandt, J. V.; Santos, C. C. dos; Marques, R. F. C.; Junior, M. J. ;*Med Devices Sens* **2021**, 4, e10151.
60. Ding, W.; Sun, J.; Lian, H.; Xu, C.; Liu, X.; Zheng, S.; Zhang, D.; Han, X.; Liu, Y.; Chen, X.; God'spower, B. O.; Li, Y. ;*Front Pharmacol* **2018**, 9, 1.
61. Marref, M.; Mignard, N.; Jegat, C.; Taha, M.; Belbachir, M.; Meghabar, R. ;*Polym Int* **2013**, 62, 87.

62. Asua, J. M. **2014**, 39, 1797.
63. Piazza, R. D.; Brandt, J. V.; Gobo, G. G.; Tedesco, A. C.; Primo, F. L.; Marques, R. F. C.; Jafelicci, M. J. ;*Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2018**, 555, 142.
64. Piazza, R. D.; Nunes, E. da S.; Viali, W. R.; da Silva, S. W.; Aragón, F. H.; Coaquira, J. A. H.; de Moraes, P. C.; Marques, R. F. C.; Jafelicci, M. ;*Carbohydr Polym* **2017**, 178, 378.

ANEXO I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara

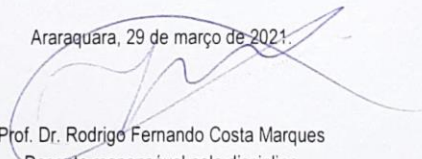


DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que Rodolfo Debone Piazza, RG: 42.481.019-0, pós-doutorando junto ao Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica, do Instituto de Química do Campus de Araraquara da Unesp, ministrou a disciplina do Curso de Química deste Instituto, conforme segue:

DISCIPLINA	SEMESTRE / ANO	C.H.	CURSO
Físico-Química Experimental I	2º sem/2020	40	BQ e BQT

Araraquara, 29 de março de 2021.


Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques
Docente responsável pela disciplina

Instituto de Química
Rua Prof. Francisco Degni, nº 55 - Bairro Quitandinha - CEP 14800-060 - Araraquara - S.P. - Brasil
Tel. (16) 3301-9500 - <http://www.iq.unesp.br>



DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que o pós-doutorando Rodolfo Debone Piazza, RG nº 42.481.019-0, atuou em atividades de formação docente, no Instituto de Química - UNESP - Câmpus de Araraquara, nas turmas das disciplinas abaixo relacionadas:

SEM	CÓDIGO	DISCIPLINA	C.H. DISCIPLINA	C.H. EFETIVA	Nº DE ALUNOS
Ano letivo: 2022					
1	FQ31245P2 -2020	Físico-Química Experimental	90.0	40.0	33
1	FQ31245T1-2020	Físico-Química Experimental	90.0	20.0	33
Ano letivo: 2021					
1	FQ16302T1	Físico-Química Experimental II	90.0	20.0	28

* Disciplina Em Curso

** Disciplina ministrada em regime especial de recuperação (RER)

Araraquara, 05 de janeiro de 2023



Laura Maria Mauro Navarro Modesto
Diretor Técnico de Divisão/Divisão Técnica Acadêmica

ANEXO II



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara



DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que **Rodolfo Debone Piazza**, RG: 42481019-0, CPF: 358731738-00, participou da banca do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) da aluna Leticia Grizone Bernussi, junto ao Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica do Instituto de Química da UNESP/CAR, com o tema: "*Revisão sobre composição de revestimentos intumescentes*", com apresentação no dia 09/01/2023.

Araraquara, 27 de janeiro de 2023.

Jose Clayston Melo
Pereira:798806813
04

Assinado de forma digital
por Jose Clayston Melo
Pereira:79880681304
Dados: 2023.01.27
14:57:49 -03'00'

Prof. Dr. José Clayston Melo Pereira
Chefe do Deptº de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica

Exames de Qualificação

1.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



ATESTADO

ATESTO para os devidos fins e direitos que os Professores abaixo relacionados Integraram nessa data, a Comissão Examinadora do Exame de Qualificação da aluna de Doutorado CAROLINE DINI, do Programa de Pós-Graduação em CLÍNICA ODONTOLÓGICA, área de concentração em PRÓTESE DENTAL, tendo como título "Uso de hidrogéis antimicrobianos direcionados ao tratamento e prevenção de Infecções associadas a Implantes dentários".

Comissão Examinadora

Profa. Dra. MABELLE DE FREITAS MONTEIRO (FOP/UNICAMP) - Presidente

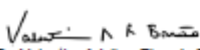
Prof. Dr. JOÃO GABRIEL SILVA SOUZA (AUTÔNOMO)

Prof. Dr. RODOLFO DEBONE PIAZZA (PESQUISADOR)

Membro(s) Suplente(s):

Prof. Dr. BRUNO BUENO SILVA (FOP/UNICAMP)

Piracicaba, 08 de janeiro de 2024.


Prof. Dr. Valentim Adelino Ricardo Barão
Coord. dos Cursos de Pós-Graduação
FOP/UNICAMP - Matr. 30341-4



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



A T E S T A D O

Atestamos que o Dr. **RODOLFO DEBONE PIAZZA**, do(a) / Instituto de Química de Araraquara - UNESP, participou em 27 de junho de 2022, como MEMBRO TITULAR da Comissão Examinadora do Exame de QUALIFICAÇÃO de ALESSANDRO DE OLIVEIRA, discente regular do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, Curso de Mestrado Profissional, cujo trabalho se intitula **PROJETO E CONSTRUÇÃO DE UMA IMPRESSORA 3D OBTENÇÃO DE SCAFFOLDS POR MEIO DA TECNOLOGIA FDM**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros:

1. Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI (Orientador - Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica Físico Química e Inorgânica / Instituto de Química UNESP Araraquara
2. Prof. Dr. JONAS DE CARVALHO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Mecânica / Escola de Engenharia de São Carlos - USP
3. Dr. RODOLFO DEBONE PIAZZA (Participação Virtual)
Instituto de Química de Araraquara - UNESP

Araraquara, 27 de junho de 2022.

Aniele Vilella
Supervisor Técnico de Seção
Seção Técnica de Pós-Graduação

A T E S T A D O

Atestamos que o Dr. **RODOLFO DEBONE PIAZZA**, do(a) Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química do Campus de Araraquara da Unesp, participou em 29 de maio de 2023, como MEMBRO TITULAR da Comissão Examinadora da DEFESA DE DISSERTAÇÃO de ALESSANDRO DE OLIVEIRA, discente regular do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, Curso de Mestrado Profissional, cujo trabalho se intitula **Projeto e construção de uma impressora 3D para obtenção de scaffolds por meio da tecnologia FDM**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros:

1. Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI (Orientador - Participação Presencial)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química do Campus de Araraquara da Unesp
2. Prof. Dr. MÁRCIO MARQUES DA SILVA (Participação Presencial)
Departamento de Mecatrônica / Faculdade de Tecnologia e Escola SENAI Antonio Adolpho Lobbe - CFP 6.01
3. Dr. RODOLFO DEBONE PIAZZA (Participação Presencial)
Departamento de Química Analítica, Físico-Química e Inorgânica / Instituto de Química do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 29 de maio de 2023.



Assinado digitalmente por Victor
Picchi Gandin+43047576874
ND: CN=Victor Picchi
Gandin+43047576874, OU=
UNESP - Universidade Estadual
Paulista Julio de Mesquita Filho,
C=ICP Edu, C=BR
Razão: Supervisor Técnico de
Seguro (Subst.)

2.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Declaração nº 9/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins e efeitos que, em 21 de dezembro de 2020, às 13h30min, em sessão pública realizada por vídeo conferência do IF Goiano – Campus Rio Verde, os membros, Prof^a. Dra. Eloiza da Silva Nunes Viali – presidente/orientadora (IF Goiano – Campus Rio Verde), Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira – avaliador interno (IF Goiano – Campus Rio Verde) e Prof. Dr. Rodolfo Debone Piazza – avaliador externo (UNESP – Campus Araraquara), participaram da banca de defesa de dissertação da mestranda **Lorena Lemes de Freitas** intitulada **EXTRATOS DE FOLHAS DE SANGRA D'ÁGUA (*Croton urucurana* Baill.): OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, NANOENCAPSULAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA**, do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Agroquímica do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde.

Por ser verdade, firmamos a presente.

Rio Verde, 18 de janeiro de 2021.

Prof. Dr. Adriano Jakelaitis
Diretor do Programa de Pós-graduação, Pesquisa e Inovação
Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde