

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Química



Tese de Doutorado

**PREPARO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO
TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS UTILIZANDO AMIDO CATIÔNICO
E DIALDEÍDO AMIDO**

Andressa Baptista Nörnberg

Pelotas, maio de 2024.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

N822p Nörnberg, Andressa Baptista

Preparo e aplicação de dispositivos de liberação transdérmica de fármacos utilizando amido catiônico e dialdeído amido [recurso eletrônico] / Andressa Baptista Nörnberg ; André Ricardo Fajardo, orientador. — Pelotas, 2024.
147 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Polissacarídeo. 2. Biopolímero. 3. Modificação química. 4. Sistemas de liberação controlada. 5. Casting. I. Fajardo, André Ricardo, orient. II. Título.

CDD 574.192

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Andressa Baptista Nörnberg

**PREPARO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA
DE FÁRMACOS UTILIZANDO AMIDO CATIÔNICO E DIALDEÍDO AMIDO**

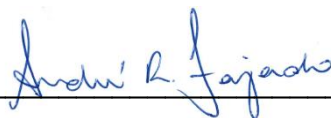
Tese de Doutorado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade
Federal de Pelotas como
requisito parcial para a obtenção
do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Fajardo

Pelotas, maio de 2024.

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado intitulada **“PREPARO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS UTILIZANDO AMIDO CATIÔNICO E DIALDEÍDO AMIDO”** de autoria de Andressa Baptista Nörnberg.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. André Ricardo Fajardo (Presidente/Orientador) - PPGQ/UFPel



Profa. Dra. Izabel Cristina Riegel Vidotti Miyata (UFPR)



Profa. Dra. Rosane Michele Duarte Soares (UFRGS)



Prof. Dr. Rafael Fonseca Neves Quadrado (UFPel)

*Apenas um agradecimento a todos
que contribuíram para a realização
destes trabalhos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiro, gostaria de agradecer meus pais, Adriana e Lindomar, por sempre me incentivarem a ir em busca dos meus sonhos. Independente de qual seja o sonho, o que importa é sempre ter vocês ao meu lado. Agradeço, também, por vocês me tornarem uma mulher independente e sem medo de qual será o destino que os meus sonhos irão me levar.

Agradeço a todos da minha família por estarem presentes durante essa jornada, de alguma forma vocês me incentivaram a melhorar. Quero agradecer em especial meu tio Alexandro, por me incentivar em todas as etapas e escolhas da minha vida. Sou grata por você ter me mostrado, que o transtorno de déficit de atenção (TDA) não seria um empecilho para a gente conseguir alcançar nossos objetivos.

Aos meus colegas de laboratório, o meu muito obrigada por toda a paciência, incentivo, risadas, café e por algumas conversas calorosas, vocês me ensinaram a ser uma pessoa melhor. Agradeço ao meu colega Matheus que nos últimos anos de doutorado abraçou as minhas ideias e saiu da zona de conforto para tornar a fabricação de novas tintas um sonho teu também. Um agradecimento especial as minhas colegas e parceiras Juliê, Pâmela e Débora por todas as conversas, incentivos, fofocas, risadas, vinhos e cervejas. Saibam que vocês foram essenciais para eu não enlouquecer e me manter de certa forma calma. Saber que vocês estariam no laboratório era um dos meus incentivos para continuar. Nunca vou esquecer de todas as conversas sinceras, saibam que foram necessárias para o meu crescimento. Ter um amigo que te diga que você está errado é muito raro de se encontrar.

Um agradecimento especial ao meu orientador Prof. André por ter aceitado o desafio de me orientar. Uma vez eu escutei numa defesa de doutorado uma aluna agradecendo o seu orientador por ele não ter feito ela adquirir suas características como pesquisador. Na época, fiquei pensando em “como ela passou 6 anos com uma orientação que não era inspiradora pra ela?”. Por esse motivo eu quero agradecer por ter sido uma inspiração como pesquisador e profissional ético. Se eu consegui adquirir 40% de suas características, finalizo os meus 6 anos sob sua orientação extremamente feliz e grata.

Ainda, agradeço aos órgãos de fomento por todo apoio financeiro durante toda a produção desta tese.

RESUMO

NÖRNBERG, Andressa Baptista. **PREPARO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS UTILIZANDO AMIDO CATIÔNICO E DIALDEÍDO AMIDO**. 2024. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os derivados do amido têm atraído a atenção de diversos pesquisadores por conferirem novas propriedades físico-químicas e biológicas aos biomateriais desenvolvidos a partir deles. No entanto, aspectos relacionados ao tipo de biomaterial preparado e sua aplicação alvo necessitam ainda ser investigados. Com base nisso, esta Tese de doutorado descreve a síntese de dois derivados do amido e explora seu uso no preparo de biomateriais para atuarem como sistemas de liberação transdérmica de fármacos (SLTF). O primeiro derivado sintetizado foi o amido catiônico (CSt), o qual apresentou um grau de substituição igual a 0,7. CSt foi utilizado na fabricação de filmes poliméricos em conjunto com poli(álcool vinílico) (PVA) e sulfato de condroitina (ChS), para servirem como veículos de transporte do fármaco metotrexato (MTX), usado no tratamento da artrite reumatóide (AR). Análises de caracterização demonstraram a interação entre os polímeros e uma interação mínima com o fármaco. A amostra contendo 5 m/m-% de MTX, a qual possibilitou a penetração do fármaco nos extratos da pele, apresentou o maior potencial para ser aplicada em testes *in vivo*. Utilizando um modelo animal, foi verificado que o filme selecionado para esses testes apresentou atenuação e tratamento dos sintomas da AR quando comparado com o grupo controle tratado oralmente com MTX livre. O segundo derivado sintetizado foi o dialdeído amido (DAS), obtido por uma reação de oxidação, com um teor de grupos aldeído igual a 77%. A reticulação desses grupos com grupos amina da gelatina (Gel) via formação de bases de Schiff foi explorada na fabricação de filmes por *casting* e hidrogéis por impressão 3D, os quais foram testados como veículos de transporte do fármaco hidrocortisona (HC), usado no tratamento da dermatite atópica (DA). Ambos os materiais demonstraram a capacidade de controlar a liberação do fármaco em uma via transdérmica de liberação, e utilizando um modelo animal de DA, foi observado que tanto o filme como o hidrogel são eficazes no tratamento dos sintomas dessa doença crônica da pele. O uso desses biomateriais pode atenuar eventuais adversidades associadas ao uso tópico da HC. Em suma, os estudos aqui apresentados oferecem novas oportunidades para a fabricação e empregabilidade de biomateriais baseados em derivados do amido para uso como SLTF.

Palavras-chave: Polissacarídeo, biopolímero, modificação química, sistemas de liberação controlada, casting, impressão 3D, metotrexato, hidrocortisona, artrite, dermatite atópica.

NÖRNBERG, Andressa Baptista. **PREPARATION AND APPLICATION OF TRANSDERMAL DRUG DELIVERY DEVICES USING CATIONIC STARCH AND STARCH DIALDEHYDE".** 2024. Thesis (Doctorate Degree) – Post Graduation Program in Chemistry. Federal University of Pelotas (UFPel).

Starch derivatives have attracted the attention of several researchers for conferring new physicochemical and biological properties to biomaterials developed from them. However, aspects related to the type of biomaterial prepared and its target application still need to be investigated. Based on this, this doctoral thesis describes the synthesis of two starch derivatives and explores their use in the preparation of biomaterials to act as transdermal drug delivery systems (SLTF). The first synthesized derivative was cationic starch (CSt), which had a degree of substitution of 0.7. CSt was used in the fabrication of polymeric films together with polyvinyl alcohol (PVA) and chondroitin sulfate (ChS) to serve as carriers for the drug methotrexate (MTX), used in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). Characterization analyses demonstrated the interaction between the polymers; however, the interaction with the drug was minimal. The sample containing 5 m/m-% of MTX, which allowed drug penetration into skin extracts, showed the greatest potential for testing *in vivo*. Using an animal model, it was found that the selected film for these tests attenuated and treated the symptoms of RA when compared to the control group treated orally with free MTX. The second synthesized derivative was dialdehyde starch (DAS), obtained by an oxidation reaction, with an aldehyde group content of 77%. Crosslinking of these groups with amino groups of gelatin (Gel) via Schiff base formation was explored in the fabrication of films by casting and hydrogels by 3D printing, which were tested as carriers for the drug hydrocortisone (HC), used in the treatment of atopic dermatitis (AD). Both materials demonstrated the ability to control drug release through a transdermal delivery route, and using an AD animal model, it was observed that both the film and hydrogel are effective in treating the symptoms of this chronic skin disease. The use of these biomaterials can mitigate potential adversities associated with the topical use of HC. In summary, the studies presented here offer new opportunities for the manufacturing and employability of starch derivative-based biomaterials for use as SLTF.

Keywords: Polysaccharide, biopolymer, chemical modification, controlled release systems, casting, 3D printing, methotrexate, hydrocortisone, arthritis, atopic dermatitis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da amilopectina e amilose, constituintes do amido (St).	26
Figura 2. Ilustração do processo da derivatização do St. Fonte: Adaptado de Sukhija et al., 2016.....	28
Figura 3. Comparação das variações de concentração dos fármacos administrados por sistemas convencionais (comprimidos, xaropes e pomadas) e sistemas de liberação controla. Fonte: Adaptado de Pandey et al., 2019.	31
Figura 4. Ilustração da administração do fármaco nos sistemas de liberação transdermal e tratamento convencional.	33
Figura 5. Ilustração do design experimental in vivo.	46
Figura 6. Imagens fotográficas dos filmes de CSt/PVA, CSt/PVA/ChS, CSt/PVA-MTX e CSt/PVA/ChS-MTX.	50
Figura 7. Porcentagem da permeação de MTX para os filmes CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5. Hashtag denota nível de significância quando comparado a todas as outras camadas: (#) $p < 0,05$ (ANOVA unidirecional pelo teste de Tukey).	52
Figura 8. Espectros de FTIR para (a) os materiais precursores PVA, CSt e ChS e (b) dos filmes de CSt/PVA, CSt/PVA/ChS e dos filmes contendo MTX disperso.	52
Figura 9. Padrões de DRX obtidos para os filmes CSt/PVA, CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5.	55
Figura 10. Curvas de TG (a) e de DTG (b) dos filmes CSt/PVA, CSt/PVA-MTX e CSt/PVA/ChS-MTX.	56
Figura 11. Efeito dos filmes CSt/PVA-MTX5, CSt/PVA/ChS-MTX5 e CSt/PVA sem MTX na hipersensibilidade mecânica na artrite induzida por CFA em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ S.E.M. de 7 camundongos em cada grupo. O asterisco denota níveis de significância quando comparado ao grupo controle: (****) $p < 0,0001$ e (**) $p < 0,01$; hashtag denota níveis de significância quando comparados com o grupo CFA: (##) $p < 0,01$ (ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey).	58
Figura 12. Efeito do MTX livre e dos filmes CSt/PVA-MTX5, CSt/PVA-ChS-MTX5 e CSt/PVA na hipersensibilidade térmica em artrite induzida por CFA em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ S.E.M. de 6–7 camundongos em cada grupo. O	

asterisco denota níveis de significância quando comparado ao grupo controle: (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ (ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey).....	59
Figura 13. Efeito do MTX livre e dos filmes CSt/PVA-MTX5, CSt/PVA/ChS-MTX5 e CSt/PVA sobre (a) a formação de edema e (b) a atividade de MPO no tecido da pata de artrite induzida por CFA em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ S.E.M. de 6–7 camundongos em cada grupo. O asterisco denota níveis de significância quando comparado ao grupo controle: (****) $p < 0,0001$ e (***) $p < 0,001$; hashtag denota níveis de significância quando comparados com o grupo CFA: (####) $p < 0,001$ e (##) $p < 0,01$ (ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey).....	61
Figura 14. Efeito do MTX livre e dos filmes CSt/PVA-MTX5, CSt/PVA-ChS-MTX5 e CSt-PVA em biomarcadores de estresse oxidativo, incluindo (a) TBARS e (b) níveis de NPSH no tecido da pata de artrite induzida por CFA em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ S.E.M. de 7 camundongos em cada grupo. O asterisco denota níveis de significância quando comparado ao grupo controle: (**) $p < 0,01$; hashtag denota níveis de significância quando comparados com o grupo CFA: (##) $p < 0,01$ (ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey).....	62
Figura 15. Etapas envolvidas no processo de bioimpressão 3D.	74
Figura 16. Resumo do protocolo experimental empregado na indução de lesões cutâneas semelhantes à DA em camundongos sensibilizados com DNCB.	79
Figura 17. Espectros de FTIR obtidos para St e DAS.	82
Figura 18. Espectros de RMN de ^1H do St (DMSO- d_6 como solvente) e do derivado DAS (D_2O como solvente) a 400 MHz.....	83
Figura 19. Imagens da avaliação da printabilidade da tinta para o teste de queda do filamento a) Gel/DAS e b) Gel/DAS@HC e habilidade de formação de camadas a') Gel/DAS e b') Gel/DAS@HC.....	87
Figura 20. Espectros de FTIR para (a) os materiais precursores Gel, DAS e HC e (b) dos filmes F-Gel/DAS, F-Gel/DAS@HC e dos hidrogéis impressos 3D-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS@HC.....	88
Figura 21. Curvas de TGA (a) e curvas de DTG (b) obtidas para os materiais F-Gel/DAS, 3D-Gel/DAS, F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC e para a HC pura.....	91
Figura 22. Imagens obtidas por MEV para (a) F-Gel/DAS e (b) F-Gel/DAS@HC e (a') e (b') são dos filmes de F-Gel/DAS e F-Gel/DAS@HC após o processo de formação.	93

Figura 23. Imagens obtidas por MEV dos hidrogéis impressos, com diferentes magnitudes, das amostras (a, a') 3D-Gel/DAS, (b, b') 3D-Gel/DAS@HC e os hidrogéis impressos (a'') 3D-Gel/DAS e (b'') 3D-Gel/DAS@HC.....	94
Figura 24. Imagens fotográficas obtidas dos hidrogéis (a) 3D-Gel/DAS e (b) 3D-Gel/DAS@HC impressos e após liofilização. (a') 3D-Gel/DAS e (b') 3D-Gel/DAS@HC.	95
Figura 25. Curvas de intumescimento dos F-Gel/DAS e F-Gel/DAS@HC em PBS (pH 7,4) a 37°C.	96
Figura 26. Curvas de intumescimento dos 3D-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS@HC em PBS (pH 7,4) a 37°C.	97
Figura 27. Cinética de liberação da HC carregada nos materiais F-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS em PBS (pH 7,4) a 37 °C. Nota: As curvas contínuas são referentes ao fit-não linear dos dados experimentais utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas.....	99
Figura 28. Efeito dos tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e HC nos sinais clínicos semelhantes à DA induzidos por 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos. (A) Imagens das lesões cutâneas dos grupos de ratos tiradas no último dia do experimento (dia 30). (B) Pontuação das lesões cutâneas. (C) Tempo de coçar avaliado no dia 30 do protocolo experimental. Cada coluna representa a média ± SEM de 7 ratos por grupo. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo controle; (##) $p < 0,01$ denota níveis de significância em comparação com o grupo DNCB; (&) $p < 0,05$ denota níveis de significância em comparação com o grupo F-Gel/DAS@HC; (@) $p < 0,05$ denota níveis de significância em comparação com o grupo 3D-Gel/DAS@HC; (+) $p < 0,05$ denota níveis de significância em comparação com o grupo HC (creme) (ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey).	102
Figura 29. O efeito dos tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e HC no inchaço da orelha (A) e na atividade da mieloperoxidase (MPO) na orelha (B) e na pele dorsal (C) de camundongos expostos ao 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB). Cada coluna representa a média ± SEM de 7 ratos por grupo. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo controle; (#) $p < 0,05$ e (##) $p < 0,01$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo DNCB (ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey).	104

Figura 30. O efeito dos tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC ou HC nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na orelha (A) e na pele dorsal (B), conforme bem como nos níveis de tiol não proteico (NPSH) na orelha (C) e na pele dorsal (D) de camundongos expostos ao 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB). Cada coluna representa a média $\pm$ SEM de 7 ratos por grupo. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo controle; (##) $p < 0,01$ denota níveis de significância em comparação com o grupo DNCB; (@) $p < 0,05$ e (@@@) $p < 0,001$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo 3D-Gel/DAS@HC (ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey).106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de estudos disponíveis na literatura que utilizaram amido e/ou derivados de amido para o preparo de sistemas de liberação transdérmica de fármacos.....	34
Tabela 2. Composição e codificação das amostras de filme preparadas (carregadas ou não com MTX).....	41
Tabela 3. Grupo de animais utilizados no design do experimento <i>in vivo</i>	45
Tabela 4. Teor de MTX nos filmes preparados.	50
Tabela 5. Grupo de animais utilizados no design do experimento. Grupo de animais utilizados no design do experimento.	78
Tabela 6. Composição das tintas Gel/DAS utilizadas no processo 3DP e definição da printabilidade das mesmas.....	85

Sumário

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVO GERAL	18
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
1. BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS.....	22
2. AMIDO (ST) E SEUS DERIVADOS	25
3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS (SLTF) BASEADOS EM AMIDO E SEUS DERIVADOS	30
CAPÍTULO III – SÍNTESE DE AMIDO CATIÔNICO E APLICAÇÃO NO PREPARO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO LOCAL DE METOTREXATO	35
1. INTRODUÇÃO	35
2. EXPERIMENTAL.....	38
2.1. MATERIAIS	38
2.2. ANIMAIS	38
2.3. SÍNTESE DO AMIDO CATIÔNICO (CSt)	39
2.4. PREPARO DOS FILMES CSt/PVA E CSt/PVA/CHS	40
2.5. PREPARO DOS FILMES CSt/PVA-MTX E CSt/PVA/CHS-MTX	40
3. CARACTERIZAÇÃO	42
3.1. INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	42
3.2. <i>Difração de raios-X (DRX)</i>	42
3.3. <i>Análises termogravimétricas (TGA)</i>	42
3.4. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência (HPCL-UV/Vis)</i>	43
3.5. TEOR DE MTX E HOMOGENEIDADE DOS FILMES	43
3.6. ESTUDO DE PERMEAÇÃO <i>IN VITRO</i>.....	44
3.7. ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	44
3.7.1. MODELO DE ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA) EM CAMUNDONGOS	44
3.7.2. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE MECÂNICA.....	46
3.7.3. <i>Avaliação da sensibilidade térmica.....</i>	47
3.7.4. <i>Estimativa dos parâmetros inflamatórios</i>	47
3.7.4.1. <i>Avaliação do edema da pata</i>	47
3.7.4.2. <i>Estimativa da atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	47
3.7.5. <i>Estimativa dos marcadores de estresse oxidativo</i>	48
3.7.5.1. <i>Preparo da amostra.....</i>	48
3.7.5.2. <i>Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</i>	48
3.7.4.3. <i>Conteúdo de tiol não proteico (NPSH)</i>	48
3.8. <i>Análise estatística</i>	49

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES PREPARADOS	49
4.2. ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	57
5. CONCLUSÃO.....	64
CAPÍTULO IV – SÍNTESE DO DIALDEÍDO AMIDO E APLICAÇÃO NO PREPARO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO POR IMPRESSÃO 3D.....	66
1. INTRODUÇÃO	66
2. EXPERIMENTAL.....	71
2.1. MATERIAIS	71
2.2. ANIMAIS	71
2.3. SÍNTESE DO DIALDEÍDO AMIDO (DAS)	72
2.4. PREPARO DAS TINTAS PARA IMPRESSÃO DO MATERIAL GEL/DAS E GEL/DAS@HC 73	
2.5. IMPRESSÃO DOS MATERIAIS 3D-GEL/DAS E 3D-GEL/DAS@HC	74
2.6. PREPARO DOS FILMES F-GEL/DAS E F-GEL/DAS@HC POR <i>CASTING</i>	75
2.7. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	75
2.7.1. <i>Ressonância magnética nuclear (RMN)</i>	76
2.7.2. <i>Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	76
2.7.3. <i>Grau de Intumescimento</i>	76
2.7.4. <i>Teste de liberação in vitro do HC</i>	77
2.8. ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	77
2.8.1. <i>Modelo de dermatite atópica induzida por dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos</i>	77
2.8.2. <i>Escores clínicos de gravidade da pele</i>	79
2.8.3. <i>Estudos dos parâmetros inflamatórios</i>	79
2.8.3.1. <i>Espessura da orelha</i>	80
2.8.3.2. <i>Parâmetros oxidativos</i>	80
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	80
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1. CARACTERIZAÇÃO DO DIALDEÍDO AMIDO (DAS)	81
3.2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE IMPRESSÃO DOS HIDROGÉIS 3D	84
3.4. LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE HC	98
3.5. ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	101
3.6. EFEITO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E NOS NÍVEIS DE NPSH	104
4. CONCLUSÃO.....	107
CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL	109
1. CONCLUSÃO GERAL	109
REFERÊNCIAS.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

3D-Gel/DAS: Hidrogel de gelatina/dialdeído amido impresso por impressão 3D
3D-Gel/DAS@HC: Hidrogel de gelatina/dialdeído amido carregado com hidrocortisona impresso por impressão 3D
3DP: Impressão 3D
BSA: Albumina de soro bovino
CFA: Adjuvante de Freund Completo
CSt/PVA/ChS: Filme de amido catiônico/poli(vinil álcool)/sulfato de condroitina
CSt/PVA: Filme de amido catiônico/poli(vinil álcool)
CSt: Amido catiônico
DAS: Dialdeído amido
DE: Derme
DO: Densidade óptica
DRX: Difração de raios-X
DTG: Termogravimetria derivada
DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
F-Gel/DAS: Filme de gelatina/dialdeído amido
F-Gel/DAS@HC: Filme de gelatina/dialdeído amido/hidrocortisona
FTIR: Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
GAG: Glicosaminoglicano
HC: Hidrocortisona
HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência
 $I_{m\acute{a}x}$: Inibição máxima
MDA: Malondialdeído
MEV: Microscopia eletrônica de arredura
MPO: Mieloperoxidase
MTX: Metotrexato
NPSH: Tiol não proteico
PBS: Tampão fosfato-salino
PCL: Poli(ϵ -caprolactona)
PGA: Poli(ácido glicólico)

PVA: Poli(álcool vinílico)

PVA: Poli(vinil álcool)

RMN: Ressonância magnética nuclear

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SC: Estrato córneo

SDS: Dodecil sulfato de sódio

S.E.M.: Erro padrão da média (do inglês *standard error of the mean*)

SLTF: Sistemas de liberação transdérmica de fármacos

St: Amido

TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TGA: Análise termogravimétricas

VE: Epiderme viável

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVO GERAL

1. Introdução

A crescente procura por materiais que sejam utilizados em aplicações biomédicas e farmacêuticas tem movimentado o mercado mundial de biomateriais e o setor de pesquisa dessa área (Pires *et al.*, 2015). Esse cenário pode estar relacionado aos avanços científicos e tecnológicos que são realizados com o intuito de desenvolver novos biomateriais que sejam utilizados, por exemplo, na área medicinal com a produção de novos dispositivos médicos, na regeneração de tecidos, entrega de medicamentos, adjuvantes de vacinas, imunoterapia, entre outras (Kämmerling *et al.*, 2021). Atualmente, o termo biomaterial é destinado a um material produzido por uma substância de origem natural ou sintética, desenvolvido com uma forma específica para que sozinha ou parte de um sistema complexo, seja utilizada para direcionar ou influenciar, por meio de interações com os tecidos vivos, o curso de qualquer processo terapêutico ou de diagnóstico (Williams, 2014). São materiais que interagem com os tecidos nos quais são implantados, mantendo a sua estrutura e propriedades, sem provocar alterações no meio fisiológico envolvente (O'Brien, 2011).

Dentre os compostos utilizados no preparo dos biomateriais, os polímeros têm destaque sendo largamente aplicados nessa finalidade. Biomateriais poliméricos são empregados como curativos em feridas cutâneas, substituintes ósseos e implantes, entre outros (Bernard *et al.*, 2018; Saghazadeh *et al.*, 2018). Especificamente os biomateriais preparados a partir de polissacarídeos são bastante atraentes e pesquisados, devido principalmente às propriedades biológicas que esses geralmente apresentam e questões relacionadas ao seu caráter *eco-friendly*. Polissacarídeos são macromoléculas comumente obtidas de fontes naturais (plantas, animais, fungos e algas) formadas por unidades de monossacarídeos unidas por ligações glicosídicas (Yu *et al.*, 2018). Essas unidades podem apresentar diferentes grupos funcionais, como hidroxilas, aminas e/ou ácidos carboxílicos, as quais atribuem características físico-químicas e biológicas importantes aos polissacarídeos. Além disso, a estrutura altamente funcionalizada dos polissacarídeos permite a funcionalização e

derivatização dos mesmos, o que pode melhorar aspectos relacionados a processabilidade e aplicação (Barclay *et al.*, 2019).

Uma das aplicações dos biomateriais preparados a partir de polissacarídeos e seus derivados é como veículo em sistemas de liberação transdérmica de fármacos (SLTF) (Yewale *et al.*, 2021). Diferente dos sistemas de liberação de fármacos convencionais, os SLTF evitam alguns efeitos adversos que alguns medicamentos podem apresentar ao realizar a passagem pelo trato gastrointestinal e realizam a entrega dos medicamentos de forma direta e controlada, no local alvo a ser tratado (Sabbagh and Kim, 2022). No tratamento de feridas cutâneas, por exemplo, é fundamental garantir uma liberação controlada dos fármacos e, especificamente, direta no leito da ferida. Geralmente, SLTF são compostos de pelo menos um agente ativo (fármacos, por exemplo) é um componente carreador, o qual é formulado utilizando polissacarídeos ou blends desses com polímeros sintéticos (Sabbagh and Kim, 2022).

Um polissacarídeo que tem demonstrado relevância no preparo de novos SLTF é o amido (St). Tal constatação reside no fato de que o St além de possuir características interessantes como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e baixo custo comparado a outros polissacarídeos (Sood *et al.*, 2021). O St apresenta em sua estrutura química duas macromoléculas, a amilose e amilopectina, ambas formadas por cadeias poliméricas contendo unidades *D*-glicopirranose ligadas por ligações glicosídicas que podem sofrer diversos tipos de funcionalizações para a obtenção de diferentes derivados (Lee and Hwang, 2023; Lopes *et al.*, 2023). Em termos de processabilidade, o St *in natura* apresenta algumas características indesejáveis, como a insolubilidade em água a temperatura ambiente, viscosidade excessiva após o aquecimento e a tendência a retrogradação, o que pode limitar o seu uso (Montoya-Yepes *et al.*, 2024). A derivatização do St surge como uma estratégia para superar essas limitações (Heinze *et al.*, 2004). Normalmente, a derivatização é realizada por meios químicos, físicos e enzimáticos nos grupos hidroxilas presente na estrutura química do St, que servem como sítios ativos para a introdução de grupos funcionais (Compart *et al.*, 2023), de moléculas (Cao *et al.*, 2020) e até mesmo de polímeros (Sarder *et al.*, 2022).

Derivados como o amido catiônico (CSt) e o dialdeído amido (DAS), produzidos por meio de reações de eterificação e oxidação, respectivamente, apresentam

propriedades interessantes para serem empregados no preparo de novos SLTF. Ambos possuem grupos funcionais quimicamente ativos em sua estrutura, capazes de estabelecer ligações, sejam elas covalentes ou iônicas, com uma variedade de compostos bioativos, incluindo pequenas moléculas, peptídeos e DNA (Lemos *et al.*, 2021). O CSt possui grupos quaternários de amônio em sua estrutura, que podem interagir com compostos bioativos com caráter aniônico, no qual, há formação de um complexo estável por meio de interações eletrostáticas. Esses complexos têm o potencial de retardar a liberação do composto bioativo, proporcionando uma liberação controlada e prolongada (Ojogbo *et al.*, 2020). Por outro lado, o DAS apresenta grupos aldeídos em sua estrutura química, os quais podem reagir por meio de reações nucleofílicas com grupos amina presente em compostos bioativos. Essa reação forma bases de Schiff, nas quais os sítios ativos intercalados encontrados na estrutura química do DAS são capazes de formar ligações dinâmicas, supramoleculares ou ligações reversíveis para formar redes reticuladas, conhecidas como caráter dinâmico. Este caráter pode ser utilizado para regular a liberação de fármacos a partir de SLTF (Lemos *et al.*, 2021) ou formar sistemas reticulados como outros compostos (Aslzad *et al.*, 2022).

Considerando esses aspectos, essa Tese investiga se os derivados CSt e DAS podem ser aplicados no desenvolvimento de novos SLTF que sejam efetivos para o tratamento e atenuação de sintomas de enfermidades crônicas. A fim de validar essa proposição, novos materiais foram preparados e caracterizados combinando CSt ou DAS a outros polímeros. Ainda, diferentes metodologias de preparo (*casting* e impressão 3D) foram utilizadas no preparo dos materiais. A capacidade dos novos materiais em atuarem como carreadores de fármacos também foi avaliada, assim como seu desempenho frente à ensaios *in vitro* e *in vivo*. Para os ensaios *in vivo*, modelos animais de artrite reumatoide (AR) e dermatite atópica (DA) foram utilizados.

2. Objetivos

Síntese de amido catiônico (CSt) e dialdeído amido (DAS) para o preparo de novos materiais aplicáveis como sistemas de liberação transdérmica de fármacos (SLTF).

2.1. Objetivos específicos

- Executar estratégias químicas eficientes para a síntese do amido catiônico (CSt) e do dialdeído amido (DAS);
- Associar os derivados de amido a outros compostos para o preparo de novos materiais a partir de diferentes metodologias;
- Verificar a capacidade dos materiais preparados em atuarem como carreadores de fármacos;
- Avaliar a eficiência do método de preparo e se as características dos materiais obtidos são adequadas para o uso dos mesmos como SLTF;
- Determinar a eficiência de aplicação dos materiais preparados utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Biomateriais poliméricos

Os biomateriais desempenham um papel fundamental no êxito dos dispositivos biomédicos e farmacêuticos, provendo novas possibilidades de ação e tratamento a diferentes situações e enfermidades (Chen and Liu, 2016). Atualmente, o termo biomaterial é utilizado para definir uma substância capaz de assumir uma forma, que mesmo sendo usada sozinha ou como parte de um sistema complexo, desempenha um papel fundamental para guiar os processos terapêuticos por meio do controle das interações com componentes do sistema fisiológico (Williams, 2014). Ainda como critério de classificação, os biomateriais devem ser materiais que, ao serem implantados nos tecidos, interajam com o meio mantendo a sua estrutura e propriedades originais, sem causar modificações significativas no meio fisiológico (O'Brien, 2011). Uma das características fundamentais para que o biomaterial possa ser utilizado, com maior eficiência, no ambiente fisiológico é a biocompatibilidade (Bernard *et al.*, 2018). A biocompatibilidade está intimamente ligada com a interação que o biomaterial irá realizar com o meio fisiológico como, por exemplo, ser capaz de prevenir a contaminação microbiana, permitindo a troca gasosa e o escape de exsudato, ser flexível sendo capaz de ajustar-se ao contorno do corpo, fornece isolamento térmico adequado (Rahmati *et al.*, 2020; Rogero *et al.*, 2003). Dependendo dessa interação, esses materiais podem apresentar diferentes classificações, como ser bioabsorvível, bioativo, bioinerte ou biointolerantes (Guastaldi and Aparecida, 2010; Hench and Polak, 2002; Ødegaard *et al.*, 2020). Outras características importantes dos biomateriais é a biodegradabilidade, no qual, o material sofre a degradação ou é solubilizado em fluídos tissulares (desaparecendo do local de aplicação); e a velocidade de degradação do material, pois a taxa de degradação do material deve ser compatível com a taxa de crescimento/regeneração do tecido biológico, por exemplo em aplicações de engenharia tecidual (Song *et al.*, 2018; Tabata, 2009).

A biocompatibilidade e a biodegradabilidade também são, em geral, características essenciais na fabricação de biomateriais destinados aos sistemas de liberação de fármacos (Mehtani *et al.*, 2019). Estes sistemas são projetados para

oferecer uma administração de fármacos precisa e eficaz. Ao permitir a liberação gradual e controlada dos fármacos, ao longo do tempo, esses sistemas de liberação podem melhorar a eficácia terapêutica, reduzir os efeitos adversos e promover a conformidade do paciente com o tratamento (Ezike *et al.*, 2023). A característica biocompatível desses materiais é importante uma vez que ela limita reações adversas no corpo, como a toxicidade, processos inflamatórios ou rejeição pelo sistema imunológico tornando-os adequados a longo prazo (Trucillo, 2024). Por outro lado, a biodegradabilidade desses biomateriais inicia um processo de decomposição natural no corpo, permitindo sua eliminação sem haver a necessidade de uma intervenção externa para ocorrer a remoção (Fenton *et al.*, 2018). Assim, um biomaterial contendo alguma dessas características pode garantir não apenas uma alta eficiência terapêutica, mas também uma segurança para que o fármaco seja liberado de forma gradativa.

No entanto, essas características estão intrinsecamente ligadas à composição empregada na fabricação do biomaterial. Uma ampla gama de compostos pode ser utilizada para tal fim, como os metais, as cerâmicas, os polímeros e os compósitos (Oleksy *et al.*, 2023). Esses biomateriais podem ser utilizados isoladamente ou até mesmo combinados uns com os outros, a fim de obter materiais com diferentes características e propriedades. Entretanto, os metais e as cerâmicas apresentam duas grandes desvantagens, como a pouca ou a falta da degradabilidade em um ambiente biológico e sua limitada processabilidade (Vaiani *et al.*, 2023). Esses atributos são essenciais em algumas aplicações, por exemplo, na engenharia de tecidos (Asri *et al.*, 2017). Em contrapartida, os polímeros por apresentarem propriedades mais interessantes como, por exemplo, maior flexibilidade em termos de processabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e resistência a ataques bioquímicos são amplamente utilizados no campo de aplicações biomédicas (Ulery *et al.*, 2011). De modo geral, a composição e a estrutura dos polímeros permitem que os materiais desenvolvidos a partir dos mesmos sejam construídos para atenderem necessidades específicas para cada aplicação (Oliveira *et al.*, 2009). Alguns polímeros possuem em sua estrutura grupos funcionais que podem sofrer hidrólise por exposição ao ambiente aquoso do corpo, e outros grupos podem se degradar por via celular ou enzimática (Mehtani *et al.*, 2019). Ainda, esses grupos funcionais presentes nos polímeros podem ser úteis para funcionalização ou derivatização. Tais processos, têm o intuito de

melhorar certas limitações encontradas em alguns polímeros como, por exemplo, a baixa hidrofiliabilidade (Kanikireddy *et al.*, 2020), atribuir propriedades que sejam interessantes do ponto de vista biológico (antioxidante (Luo *et al.*, 2021), antimicrobiana (Gularte *et al.*, 2019), etc.) e, também, proporcionar características que permitam modular a taxa de degradação dos biomateriais e liberação de fármacos (Nair and Laurencin, 2007).

Tanto os polímeros sintéticos quanto os de origem natural podem ser usados para a fabricação de biomateriais. Os mais usados e que são dispersíveis em água incluem alguns polissacarídeos (alginato, amido), poli(ácido láctico), poli(álcool vinílico). Apesar dos materiais de origem natural apresentarem vantagens no reconhecimento biológico suportando positivamente a adesão celular, os mesmos podem conter impurezas patogênicas ou exibir imunogenicidade e limitações quanto a sua obtenção (Fang *et al.*, 2022). Além disso, sua degradação enzimática pode afetar consideravelmente o tempo e a forma de degradação no meio fisiológico, dependendo do local onde estará enxertado o biomaterial (Nair and Laurencin, 2007). Por outro lado, os polímeros sintéticos podem ser produzidos em larga escala e dependendo de sua estrutura química são biodegradáveis e sofrem reabsorção metabólica. Eles também apresentam maior resistência mecânica, característica importante dependendo de qual finalidade será utilizado o biomaterial (Dhandayuthapani *et al.*, 2011). Essas características os tornam opções valiosas para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos.

Ainda, dentro da classe dos polímeros naturais, temos os polissacarídeos que são macromoléculas formadas a partir de unidades de monossacarídeos unidas por ligações glicosídicas. Os polissacarídeos além de serem amplamente encontrados e produzidos por plantas, animais e microrganismos alguns deles, também, apresentam importantes características que são promissoras para a produção dos biomateriais, como: a baixa toxicidade, a fácil disponibilidade e atividades biológicas (antitumorais, antioxidantes, antidiabéticos, antivirais, imunomoduladores, entre outras) (Zhang *et al.*, 2024).

Apesar das características promissoras dos polissacarídeos na fabricação de biomateriais aplicáveis, por exemplo, na entrega de fármacos, um dos principais desafios enfrentados por esses sistemas é a baixa biodisponibilidade dos fármacos após a administração (Efthimiadou *et al.*, 2015). Por esse motivo, os derivados dos

polissacarídeos estão sendo explorados como alternativas para o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos. Essa abordagem visa não apenas melhorar a eficácia terapêutica, mas também garantir a segurança e a tolerabilidade aos processos terapêuticos (Chen et al., 2024; T. Liu et al., 2023; W. Wang et al., 2018).

A derivatização de polissacarídeos pode ser realizada por meio de reações físicas, enzimáticas e químicas, no qual, ocorre modificações nas propriedades estruturais e conformacionais, incluindo a introdução de novos grupos funcionais que podem, com isso, melhorar propriedades relacionadas a solubilidade, aprisionamento de fármacos, melhorar a proliferação celular (Efthimiadou *et al.*, 2015). A modificação física é um método convencional e depende, principalmente, das interações intermoleculares entre as moléculas de polissacarídeos para produzir novas estruturas, porém dependendo da força de interação ela pode ser reversível (Zhang *et al.*, 2013). Na modificação enzimática apesar dos derivados serem produzidos por métodos seguros, os reagentes utilizados normalmente são de alto custo e produzem derivados com baixos rendimentos, o que torna esse método não atrativos para serem produzidos em escala industrial (Wang *et al.*, 2023). Já a modificação química tem se mostrado um método viável e eficiente, além disso, tem sido amplamente utilizado na modificação de polissacarídeos usando reações químicas, tais como: sulfatação, selenização, oxidação seletiva, carboximetilação, entre outras (Apriyanto *et al.*, 2022; Compart *et al.*, 2023). Um polissacarídeo comumente utilizado na síntese de derivados com o objetivo de obter melhorar diferentes propriedades dos biomateriais é o amido (St), o qual será discutido com maior profundidade na próxima seção.

2. Amido (St) e seus derivados

O St é quantitativamente o carboidrato de armazenamento mais comumente encontrado na Terra e é produzido por plantas e algumas espécies de cianobactérias (Apriyanto *et al.*, 2022). Além de desempenhar um papel fundamental como principal fonte de energia e nutrientes para plantas, animais e organismos humanos, o St também é utilizado como matéria-prima em diversas indústrias, incluindo a farmacêuticas, alimentícia e de embalagens (Kong *et al.*, 2023).

Estruturalmente, o St é biosintetizado na forma de grânulos semicristalinos e é um polissacarídeo composto por duas macromoléculas distintas: a amilose e a

amilopectina (**Figura 1**). A amilose é formada por cadeias lineares e é composta unidades de glicose unidas por ligações α -D-glicoses, enquanto a amilopectina é altamente ramificada, sendo constituída por unidades de glicose na cadeia principal unidas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ e nos pontos de ramificação, os meros de glicose são unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ (Willfahrt *et al.*, 2019).

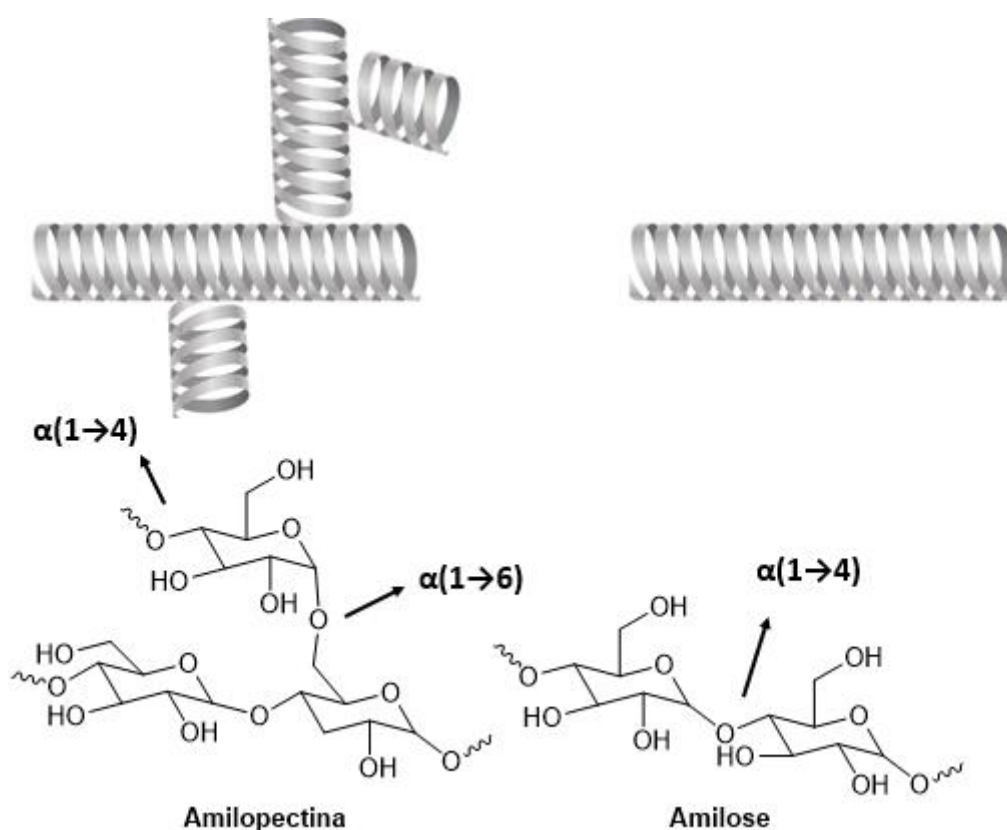


Figura 1. Estrutura química da amilopectina e amilose, constituintes do amido (St).

No St, a proporção da amilose e da amilopectina varia de acordo com a espécie de origem, impactando diretamente nas propriedades físico-químicas desse polissacarídeo. Um exemplo disso está na cristalinidade do St, caso a extração ocorra em espécies de milho a composição será entorno de 24% de amilose e 76% de amilopectina, com uma cristalinidade de até 48%. Já a batata apresenta valores de 20% e 80% de amilose e amilopectina, respectivamente, com uma cristalinidade de até 53% (Ojogbo *et al.*, 2020). Isso é justificado, pois a amilose possui uma estrutura linear com cadeias helicoidais que interrompem a ordem estrutural e levam a formação de domínios amorfos no St, enquanto as duplas hélices formadas pela ordenação das cadeias ramificadas da amilopectina, formam domínios cristalinos altamente

ordenados (Compart *et al.*, 2021). Por haver essa combinação de domínios amorfos e cristalinos, os grânulos de amido extraído de diferentes espécies, apresentam diferentes percentuais de cristalinidade, sendo caracterizado como um polissacarídeo semicristalino.

Em contato com a água a temperatura ambiente, os grânulos de St são dispersos e intumescem devido a difusão de água nas regiões amorfas, mas este é um processo reversível com a secagem. Ou seja, a proporção de amilose e amilopectina desempenha um papel importante no processo de absorção e retenção de moléculas de água. O St *in natura* que possui em seus grânulos altos percentuais de amilopectina, apresenta um intumescimento maior, mas não chegam a formar gel e, sim uma solução altamente viscosa (Ojogbo *et al.*, 2020). No entanto, quando os grânulos de St dispersos em água a temperatura ambiente são aquecidos, há o afastamento entre as cadeias de amilose e amilopectina, ocasionando na perda de proporções de amilopectina o que causa a solubilização na forma de uma solução semelhante a um gel, irreversível. Esse processo é conhecido como gelatinização do St (Apriyanto *et al.*, 2022).

Na **Figura 2** é possível observar uma ilustração referente ao processo inicial da derivatização do St denominada gelatinização, no qual, ocorre a perda da ordem estrutural do polissacarídeo devido ao aumento da temperatura do meio aquoso. Esse aumento na temperatura resulta na ruptura das ligações de hidrogênio existentes dentro dos grânulos, inicialmente nas regiões amorfas onde as ligações são mais fracas (Copeland *et al.*, 2009). Durante essa ruptura, moléculas de amilose começam a ser lixiviadas dos grânulos, a medida em que ocorre o cisalhamento há o aumento da viscosidade da solução resultante. Esse aumento acontece até que há uma cisão das ligações glicosídicas dos grãos de St e, isso pode ser visivelmente observado pela diminuição da viscosidade da solução. Ao final desse processo, ao ser resfriado, o St começa a passar pelo processo de retrogradação. Essa etapa, ocorre quando as moléculas de St gelatinizados começam a se reorganizar, voltando a realizar interações intermoleculares, formando uma estrutura mais ordenada e, uma solução ainda mais viscosa. Isso irá influenciar na qualidade, textura e na estabilidade do produto produzido a partir desse processo de gelatinização (Falcão *et al.*, 2022). Além disso, a proporção de amilose lixiviada durante esse processo atinge diretamente as propriedades mecânicas do material produzido.

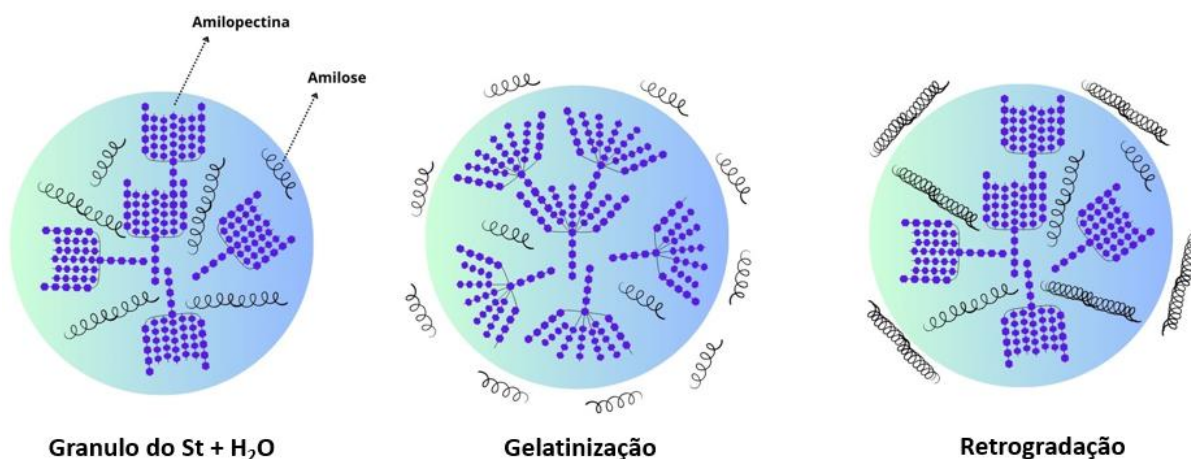


Figura 2. Ilustração do processo da derivatização do St. Fonte: Adaptado de Sukhija et al., 2016.

Embora o St *in natura* possua propriedades atraentes para ser um possível candidato para a formulação de novos biomateriais, por ser de baixo custo, biodegradável, ser extraído de fontes renováveis e ter uma boa biodisponibilidade; ainda existem certas limitações que podem dificultar o seu uso em escala industrial. Essas limitações, conforme já mencionado, estão associadas à sua insolubilidade em água a temperatura ambiente, processos de retrogradação, baixa estabilidade térmica, alta viscosidade e limitadas propriedades mecânicas após o processo de gelatinização (Ojogbo *et al.*, 2020). Portanto, a fim de minimizar esses problemas e melhorar as suas aplicações, uma estratégia é realizar a modificação do St.

As macromoléculas presentes nos grãos de St, apresentam em suas estruturas química grupos hidroxilas reativos, que podem atuar como pontos de ancoragem de para ser realizado modificações químicas, físicas e enzimáticas (Ogunsona *et al.*, 2018; Sujka and Wiącek, 2024; Tan *et al.*, 2016). A modificação química permite o bloqueio ou a introdução de grupos funcionais, conferindo propriedades físicas e químicas desejáveis sem comprometer a integridade da cadeia polissacarídica do St. Devido à grande quantidade de grupos hidroxilas presentes nas macromoléculas desse polissacarídeo diferentes reações e processos podem ser utilizadas para a síntese de novos derivados, incluindo a eterificação, oxidação, acetilação, esterificação, enxertia polimérica, reticulação, siliação, hidrólise, entre outros (Apriyanto *et al.*, 2022; Ojogbo *et al.*, 2020; Watcharakitti *et al.*, 2022).

De maneira geral, essas modificações químicas afetam diretamente as propriedades físico-químicas dos derivados do St e estão claramente relacionadas com o grau de substituição decorrentes dessas modificações. Por exemplo, Utrilla-Coello *et al.*, 2014 realizaram a hidrólise ácida do St de milho e, nesse tipo de modificação química o grau de substituição é calculado pela quantificação de amilose presente na estrutura do grânulo. Os autores observaram que houve uma redução significativa da amilose, obtendo apenas 2,94% de amilose ainda presente no grânulo de St modificado. Por consequência disso, houve um aumento na solubilidade do novo derivado em água a temperatura ambiente. Isso beneficiou um caráter hidrofílico para o novo derivado formulado, proporcionando assim, a possibilidade de fabricação de biomateriais que podem ser utilizados na liberação controlada de fármacos, visto que, polímeros hidrofílicos podem fornecer um ambiente adequado para ocorrer mecanismos de intumescimento, dissolução ou erosão que determinam a cinética de liberação de compostos presentes nos biomateriais.

Golachowski *et al.*, 2020 sintetizaram o citrato de St por meio de reações de esterificação. Nessa modificação química, os autores observaram alterações nas propriedades do St, incluindo a redução da cristalinidade relativa do derivado, resultando em uma diminuição com a afinidade com a água, nos parâmetros de gelatinização e na viscosidade. No entanto, o novo derivado apresentou uma melhora na resistência à ação das enzimas amilolíticas, principal agente de degradação do amido. Entretanto, esse tipo de modificação beneficia a fabricação de biomateriais que precisam de uma taxa de degradação lenta. A regulação dessa taxa proporciona um biomaterial que consegue realizar a regeneração de tecidos ósseos de forma gradativa.

Dependendo do tipo de grupo funcional introduzido por essas reações de modificação na estrutura do St, o derivado resultante pode ser utilizado na formação de redes tridimensionais, por meio de reticulações covalente e não covalente. A formação de materiais reticulados pode beneficiar o processo de formação de biomateriais com propriedades e características importantes para a regeneração tecidual, por exemplo (Dong *et al.*, 2018; Qamruzzaman *et al.*, 2022). Ainda, a combinação desses derivados com outros compostos químicos tem proporcionado a regulação da taxa de liberação de fármacos (Amaraweera *et al.*, 2021).

Além disso, alguns derivados do St exibem uma gama de características atraentes para as aplicações médicas e farmacêuticas, incluindo as atividades antioxidantes, antimicrobiana e antibacteriana. Como no caso do St catiônico (CSt), obtido por Heinze *et al.*, 2004 com grau de substituição de 1,5 além de apresentar solubilidade em água a temperatura ambiente, exibiu propriedades interessantes, tal como atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Já Yong *et al.*, 2022 demonstraram em seus estudos que a fabricação de biomateriais contendo o DAS melhorou algumas propriedades inexistentes no material fabricado sem a presença desse derivado como, por exemplo, a atividade antioxidante. Considerando o que foi exposto e os exemplos da literatura, fica evidente a necessidade de explorar derivados capazes de melhorar ou atribuir novas características ao St *in natura* aprimorando assim a fabricação de novos biomateriais.

3. Sistemas de liberação transdérmica de fármacos (SLTF) baseados em amido e seus derivados

Os sistemas tradicionais de liberação de fármacos (comprimidos, xaropes, pomadas) muitas vezes apresentam certas limitações que podem inviabilizar a eficácia terapêutica ou até mesmo a segurança do tratamento (Adepu and Ramakrishna, 2021). Nos sistemas tradicionais (**Figura 3**), a eficácia terapêutica é alcançada com administração de múltiplas dosagens dos fármacos ao longo do tempo. No entanto, apesar da dosagem inicial, logo após administração do fármaco ser extremamente alta, depois de um certo período é possível observar um declínio na concentração dessa dosagem, sendo necessário uma nova administração do fármaco, para que o nível de efetividade seja mantido dentro da janela terapêutica (Park, 2014). Isso pode estar relacionado com a baixa biodisponibilidade, a metabolização prematura do fármaco e o descontrole da especificidade do local alvo.

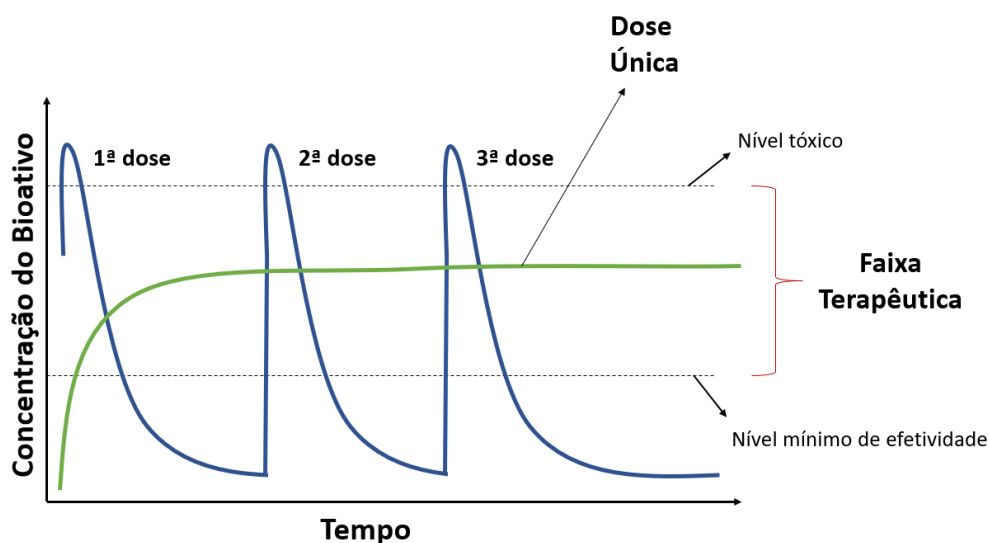


Figura 3. Comparação das variações de concentração dos fármacos administrados por sistemas convencionais (comprimidos, xaropes e pomadas) e sistemas de liberação controla. Fonte: Adaptado de Pandey et al., 2019.

Os sistemas de liberação de fármacos garantem que o ingrediente farmacêutico seja liberado de forma contínua e prolongada para alcançar a resposta terapêutica desejada para cada tipo de tratamento. Biomateriais a base de St, por exemplo, oferecem um mecanismo versátil para a obtenção de um sistema que consiga controlar a taxa de liberação de compostos farmacêuticos. A cinética de liberação desses biomateriais pode ser ajustada modulando diversos fatores, que estão relacionados a composição do material, a densidade de reticulação e os estímulos ambientais (Alshangiti *et al.*, 2023; Lee and Hwang, 2023; Thang *et al.*, 2023).

Um dos principais mecanismos de liberação de fármacos a partir de biomateriais a base de St é a difusão. Devido a hidrofiliabilidade que a maioria dos biomateriais apresentam, pode ocorrer a absorção e retenção de uma certa quantidade de fluídos (Malik *et al.*, 2023). Essa absorção influencia diretamente na liberação dos fármacos, pois compostos farmacêuticos podem ser difundidos das matrizes dos biomateriais de regiões de alta concentração para regiões de menor concentração, até que se atinja um equilíbrio. Entretanto, a taxa de liberação irá depender de alguns fatores, tais como a concentração dos componentes utilizados para a fabricação do material, a densidade da matriz, porosidade e o ambiente que será utilizado o biomaterial (Lee and Hwang, 2023).

Por exemplo, a pele além de fornecer uma barreira protetora contra infecções e substâncias externas, pode ser utilizada como meio de administração de fármacos. Esse tecido é constituído por três principais camadas: a epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é composta por cinco camadas anatômicas, sendo a camada mais externa conhecida como estrato córneo. É nessa camada onde ocorre o processo de difusão dos fármacos, no qual, compostos terapêuticos depositados nessa camada permeiam pelo estrato córneo para regiões interfolicular. Em seguida, as moléculas de fármacos difundem para o local alvo para então produzir o efeito terapêutico, antes de ser excretado na circulação sistêmica (Sabbagh and Kim, 2022).

A tecnologia de SLTF é um método emergente que fornece produtos farmacêuticos a uma taxa eficaz, **Figura 4**. Esse sistema proporciona uma liberação controlada dos fármacos sob o tecido da pele e, ainda possibilita que o fármaco consiga alcançar a circulação sistêmica em uma determinada taxa e manter as concentrações clínicas reais por um longo período (Kim *et al.*, 2021). Um SLTF pode realizar a entrega de fármacos diretamente no local alvo a ser tratado, minimizando os problemas de toxicidade sistêmica do tratamento medicamentoso convencional (administração oral, injetável ou na forma de pomadas de uso tópico) e aumentar a concentração efetiva do fármaco no local lesionado. De modo geral, essa técnica não invasiva de administração de medicamentos através da pele, apresenta inúmeras vantagens, incluindo ser indolor, facilmente administrável, flexibilidade na administração, alta adesão no paciente (Sabbagh and Kim, 2022).

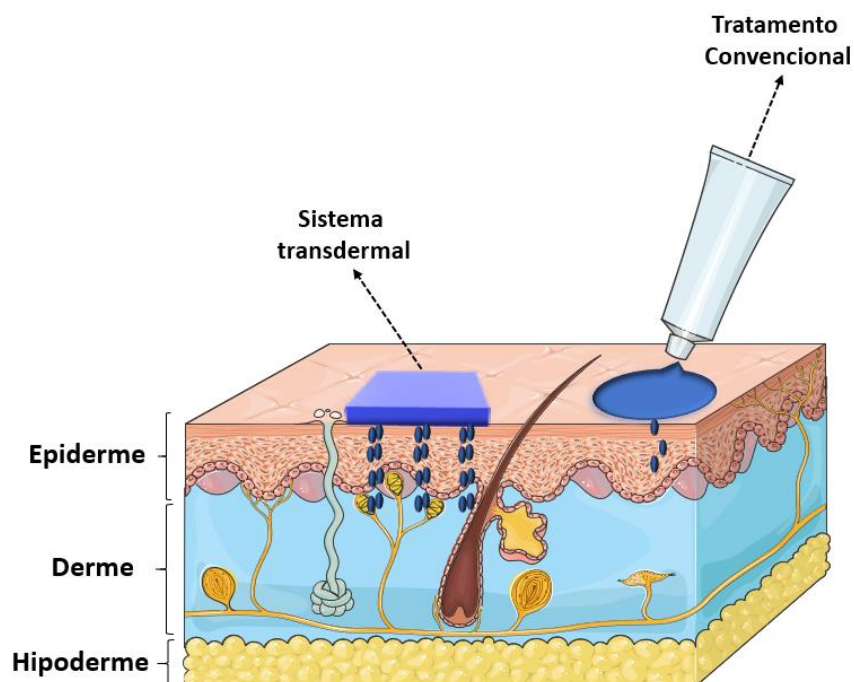


Figura 4. Ilustração da administração do fármaco nos sistemas de liberação transdermal e tratamento convencional.

Estratégias promissoras têm sido desenvolvidas e relatadas na literatura, com relação ao uso do St e/ou de seus derivados como componentes base para a fabricação e biomateriais que possam ser utilizados como SLTF. Na **Tabela 1**, são ilustrados alguns exemplos desses dispositivos.

Tabela 1. Exemplos de estudos disponíveis na literatura que utilizaram amido e/ou derivados de amido para o preparo de sistemas de liberação transdérmica de fármacos.

Composição	Tipo de material	Fármaco carregado	Ref.
Amido de milho	Filme obtido por <i>casting</i>	Clorexidina	(Queiroz <i>et al.</i> , 2020)
Propil amido	Nanopartículas	Ácido flufenâmico, testosterona e cafeína	(Santander-Ortega <i>et al.</i> , 2010)
Carboximetil amido	Filme obtido por <i>casting</i>	Clonidina	(Saboktakin <i>et al.</i> , 2014)
Amido de feijão	Filmes obtido por irradiação UV	Sulindac	(Tak <i>et al.</i> , 2019)
Amido de feijão	<i>Scaffold</i> obtido por 3DP	Alopurinol	(Kim <i>et al.</i> , 2021)
Amido de batata	Nanopartículas	Diclofenaco de sódio	(El-Naggar <i>et al.</i> , 2015)
Amido catiônico	Filme obtido por <i>casting</i>	Metotrexato	(Nornberg <i>et al.</i> , 2022)
Amido de trigo	Microagulhas	Insulina	(Ling and Chen, 2013)
Amido de batata	Membrana	Fluorouracil	(Berkkan <i>et al.</i> , 2021)
Carboximetil amido	Filme obtido por <i>casting</i>	Dexametasona	(Ishchenko <i>et al.</i> , 2022)
Carboximetil amido	Microagulhas	Curcumina	(Cheng <i>et al.</i> , 2020)
Amido pré-gelatinizado	Filme obtido por <i>casting</i>	Lidocaína	(Waiprib <i>et al.</i> , 2017)
Amido catiônico	Gel	miR-197	(Lifshiz Zimon <i>et al.</i> , 2018)
Amido de feijão	<i>Scaffold</i> obtido por 3DP	Atenolol	(Sabbagh and Kim, 2022)

Os SLTF baseados em derivados do amido surgem como uma estratégia promissora para a encapsulação de diversas substâncias bioativas, como é o caso dos fármacos. Os sistemas de liberação formulados usando esse polissacarídeo e seus derivados e, fabricados com diferentes dimensões e técnicas de fabricação aparecem como potenciais alternativas para realizar a liberação controlada dessas substâncias. Esses exemplos, demonstram a importância do St *in natura* e da obtenção de seus derivados para serem utilizados na obtenção de materiais voltados para área farmacêutica e biomédica. Essas modificações, por exemplo, podem modular e adaptar as propriedades do St para que o mesmo possa ser utilizado como constituinte de SLTF.

CAPÍTULO III – SÍNTESE DE AMIDO CATIÔNICO E APLICAÇÃO NO PREPARO DE UM SISTEMA DE LIBERAÇÃO LOCAL DE METOTREXATO

1. Introdução

O amido catiônico (CSt) é um derivado do St que apresenta em sua estrutura química grupos carregados positivamente. Esse derivado é comumente sintetizado a partir de uma reação de eterificação onde ocorre a substituição (comumente parcial) dos grupos hidroxila do St por grupos funcionais carregados positivamente ou que em dadas condições possam adquirir carga positiva como, por exemplo, grupos amina, imina, sulfônicos, fosfônicos ou amônio quaternário (Anthony and Sims, 2013; Razali *et al.*, 2012).

Além de apresentar excelentes propriedades biológicas, como atividade antioxidante e antibacteriana, o CSt também se destaca por sua boa solubilidade em meio aquoso à temperatura ambiente e por sua excelente capacidade de formação de filmes e membranas (Z. Wang *et al.*, 2018). Devido à essas características, o CSt é utilizado no preparo de cápsulas, pastilhas ou emulsões que aplicáveis como sistemas de liberação controlada de fármacos como ibuprofeno, ácido acetilsalicílico e metformina (Lefnaoui and Moulai-Mostefa, 2015; Mulhbachter *et al.*, 2001). Embora essas características associadas ao CSt sejam atraentes para o preparo de SLTF, sua natureza altamente hidrofílica pode dificultar o controle do processo de liberação de fármacos em locais alvo, principalmente onde há fluídos fisiológicos (exsudato, por exemplo). Neste tipo de aplicação, as matrizes hidrofílicas são incapazes de alcançar uma liberação constante do fármaco durante todo o período de tratamento. Ainda, há uma diminuição na taxa de liberação do fármaco, ao longo do tempo, devido a uma mudança no comprimento da trajetória difusional que o mesmo executa (Bagde and Rohera, 2024). Por outro lado, a incorporação de outros compostos (poliméricos, cerâmicos, argilominerais) podem realizar o ajuste desta taxa de liberação em matrizes poliméricas preparadas a partir de compostos hidrofílicos (Hawthorne *et al.*, 2022). No caso do CSt, a incorporação de compostos que diminuam as ligações de hidrogênio intermolecular, pode beneficiar o processo de liberação do composto disperso na matriz, além de aumentar a estabilidade do mesmo (Tang *et al.*, 2019). Um polímero que pode ser utilizado para esta finalidade é o poli(álcool vinílico) (PVA).

O PVA é um exemplo de polímero sintético que possui em sua estrutura química inúmeros grupos hidroxilas, o que beneficia as interações físicas entre esse polímero e os grupos funcionais do CSt. Além de ser um polímero solúvel em água, possui excelente perfil para ser utilizado na produção de biomateriais, como: lentes de contato, microagulhas e curativos por apresentar baixa toxicidade, propriedades mecânicas atrativas e biocompatibilidade em meio biológico (Tekko *et al.*, 2020). Devido à essas características, o PVA pode ser considerado um candidato promissor para o preparo de filmes poliméricos em conjunto com CSt, não sendo necessário o uso de agentes de reticulação. Espera-se que os filmes de CSt e PVA tenham características úteis para aplicação dos mesmos como SLTF, por exemplo, na liberação do fármaco metotrexato (MTX), utilizado no tratamento de AR.

O MTX é um fármaco promissor na inibição e na desaceleração da taxa de destruição articular, reduzindo a inflamação iniciada por citocinas pró-inflamatórias comuns na AR (Friedman and Cronstein, 2019). Apesar da alta eficiência do MTX, quando administrado via oral, ele altera os principais componentes da microbiota oral e intestinal, afetando a resposta inflamatória associada aos danos ao epitélio da mucosa (W. Wang *et al.*, 2018). Outra forma de administração do MTX é de maneira intra-articular, ou seja, o fármaco é liberado diretamente na cavidade sinovial de uma articulação (Tada *et al.*, 2019). No entanto, estudos demonstram que é preciso altas concentrações ou diversas aplicações para que o MTX seja eficiente no local afetado, o que além de obter uma curta tempo de eficiência terapêutica, também aumenta o risco de infecção (Bogusz *et al.*, 2019; Tekko *et al.*, 2020; W. Wang *et al.*, 2018). Como alternativa para contornar essas limitações associadas à rápida liberação e altas concentrações do MTX, o uso de SLTF se mostra interessante uma vez que o mesmo pode regular a liberação desse fármaco e direcionar a sua entrega em locais alvo. Ainda, o uso de um SLTF pode minimizar os efeitos adversos causados pelo MTX ao trato gastrointestinal decorrentes do uso oral, além de proporcionar um método indolor e minimamente invasivo de administração (Ciro *et al.*, 2019; Gularte *et al.*, 2020). Em suma, esses sistemas podem prolongar a ação terapêutica do MTX no local tratado. Tais características são essenciais para o tratamento da AR, devido à sua facilidade de se depositar no local que será realizado o tratamento para que, posteriormente, ocorra o fornecimento do fármaco por uma liberação contínua, inibindo a proliferação de citocinas pró-inflamatórias (Tada *et al.*, 2019).

Considerando todos esses aspectos, este capítulo descreve o preparo de filmes de CSt/PVA via *casting* como estratégia para a incorporação e a entrega do MTX. Os filmes preparados foram testados *in vivo* utilizando um modelo de AR em camundongos a fim de validar a eficiência dessa abordagem. Ainda, como forma de ampliar a resposta biológica dos filmes CSt/PVA carregados com MTX no tratamento e atenuação dos sintomas da AR, sulfato de condroitina (ChS) foi incorporado à formulação dos mesmos. A AR, uma patologia autoimune crônica e sistêmica é caracterizada pela presença de hiperplasia sinovial e inflamação crônica (Xia *et al.*, 2020). Por conta destas características, ocorrem à interrupção da homeostase imune e falta do mecanismos de vigilância imunológica do hospedeiro, o que leva a destruição progressiva da cartilagem que envolve os ossos, além da secreção excessiva de citocinas e olefinas pró-inflamatórias que ajudam no progresso da doença (Garg *et al.*, 2016). Os pacientes que possuem essa doença são tratados, principalmente, por meio de terapias medicamentosas e de cirurgias. Normalmente, as terapias medicamentosas fazem o uso de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais e glicocorticóides. Estudos demonstram que a AR afeta principalmente pessoas do sexo feminino, por estar diretamente relacionada com os hormônios sexuais, como o estrogênio, que apresentam efeito regulador imunológico (Raine and Giles, 2022). Além disso, alterações causadas por infecções microbianas e bacterianas, principalmente, na microbiota intestinal influenciam no aumento do processo inflamatório da doença. Por sua vez, o ChS que é um glicosaminoglicano (GAG) predominantemente encontrado na matriz extracelular, especialmente ao redor da cartilagem, pele, vasos sanguíneos, ligamentos e tendões (Largo *et al.*, 2010), possui um papel importante na redução de sinais e sintomas de sinovite, prevenindo a infiltração de células inflamatórias, formação de tecido granulado, destruição da cartilagem articular e redução do edema (Mahtab *et al.*, 2020). O ChS se destaca por suas propriedades anti-inflamatórias, que podem ser benéficas para reduzir o processo inflamatório associado a AR. Este GAG é capaz de diminuir as concentrações de diversos agentes pró-inflamatórios, incluindo o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B), a proteína C reativa (PCR) e o interleucina-6 (IL-6) (Siddiqui *et al.*, 2024). Essa capacidade de modular a resposta inflamatória pode ajudar a aliviar os sintomas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com AR.

Considerando o exposto, temos como hipótese que associação desses polímeros (CSt, PVA e ChS) resulte em um material capaz de controlar e modular a taxa de liberação do fármaco MTX reduzindo assim o processo inflamatório gerado pela AR.

2. Experimental

2.1. Materiais

Amido de arroz, com 6% de amilose determinada por Colussi *et al.*, 2014 foi gentilmente doado pelo LabGrãos/UFPel (Pelotas, Brasil). Poli(álcool vinílico) (PVA) 98% hidrolisado e Mw de 124.000 g mol⁻¹, sal sódico de sulfato de condroitina A (ChS) da traqueia bovina (Mw 20.000–30.000 g mol⁻¹), (3-cloro-2-hidroxilpropil)cloreto de trimetilamônio (CHPTAC) e hidróxido de sódio (NaOH) foram comprados da Sigma-Aldrich (EUA). Etanol (P.A.) e ácido clorídrico (HCl) foram comprados da Synth (Brasil). Metotrexato (MTX, 99%) foi adquirido da Libbs Pharmaceutical (Brasil). Metanol foi adquirido da Dinâmica (Brasil). Acetonitrila (grau HPLC) foi adquirida da LiCHrosolv (Darmstadt, Alemanha). Trietanolamina foi comprada da Vetec (Brasil). O hidrogel Carbopol Ultrex® foi adquirido da Galena (Brasil). Todos os outros reagentes e solventes eram de grau analítico e usados como recebidos sem uma purificação adicional.

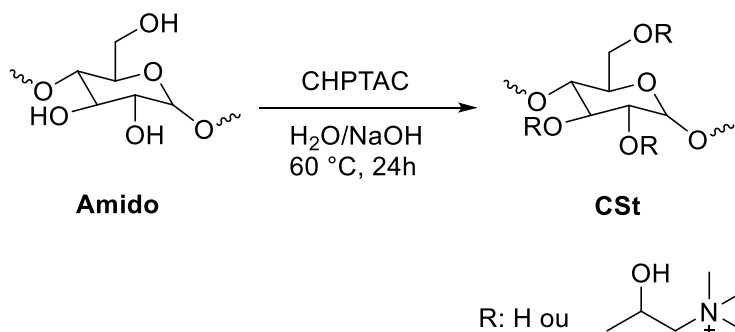
2.2. Animais

Camundongos Swiss, machos e adultos (dois meses de idade, 25–35 g), foram obtidos no Biotério Central da UFPel (Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, com o biotério climatizado (22 ± 2 °C), sob ciclo de 12 h de luz e 12 h escuro (as luzes foram acesas às 7 h). Uma dieta comercial de roedores e água filtrada foram fornecidas *ad libitum*. Os camundongos foram adaptados à sala de experimentação uma semana antes do início dos experimentos. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Cuidado e Utilização de Recursos Experimentais da UFPel (Brasil), filiada ao Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal, e registrada com o número 22123-2020. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de

acordo com o Guia dos Institutos Nacionais de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (NIH Publications No. 823, revisado em 1978), além disso, todos os esforços foram feitos para reduzir o número de animais usados e o seu desconforto.

2.3. Síntese do amido catiônico (CSt)

O derivado CSt foi sintetizado de acordo com o procedimento relatado por Gularte *et al.*, 2020 (**Esquema 1**). Resumidamente, num frasco de 50 mL foram adicionados 1500 mg de amido de arroz, 5000 mg de NaOH (razão mássica amido/NaOH igual a 1,0:3,3) e 50 mL de água destilada. A mistura reacional foi deixada por 1 h, sob agitação magnética à temperatura ambiente (~ 25°C). Em seguida, uma solução de CHPTAC (1600 µL) com pH ajustado para 12, foi adicionada ao frasco reacional, permanecendo sob agitação a 60 °C por 24 h. Após isso, a reação foi resfriada até a temperatura ambiente. O produto foi recuperado por precipitação da solução em etanol e seco em estufa a 40 °C.



Esquema 1

O teor de nitrogênio (*N*) do CSt foi determinado pelo método Şen *et al.*, 2017, e o grau de substituição (DS) foi calculado pela **Equação 1**, na qual 162 g mol⁻¹ é a massa molecular da unidade de anidroglicosídica do amido, *N* é o teor de nitrogênio da amostra CSt determinada pelo método Kjeldahl, e 154,64 g mol⁻¹ é o massa molar do CHPTAC. A determinação do DS foi realizada em triplicata. Com a equação foi possível observar que o DS médio para o CSt sintetizado foi de 0,7. Esse resultado é comparável com outros estudos que utilizaram um procedimento semelhante para a síntese de CSt (Chemelli *et al.*, 2020; Killinger *et al.*, 1995; Şen *et al.*, 2017).

(1)

$$DS = \frac{162 \times N}{1400 - (154,65 \times N)}$$

2.4. Preparo dos filmes CSt/PVA e CSt/PVA/ChS

Num frasco reacional de 50 mL, o CSt (100 mg) foi solubilizado em água destilada (5 mL), permanecendo sob agitação magnética à temperatura ambiente até a sua total solubilização (~15 min). Em outro frasco foi feita a solubilização do PVA (1000 mg) em água destilada (15 mL) utilizando agitação magnética e uma temperatura de 80 °C. Em seguida, as soluções de CSt e PVA foram misturadas e homogeneizadas sob agitação magnética branda (100 rpm) por 3 h à temperatura ambiente. Vale informar que a proporção mássica entre CSt e PVA foi estipulada a partir de estudos prévios de otimização (Gularte *et al.*, 2020). Após a obtenção de uma solução homogênea, a mesma foi vertida em uma placa de Petri (85 x 10 mm), que foi posteriormente mantida em uma estufa a 40 °C por 24 h para evaporação do solvente (*casting*).

Em paralelo, os filmes CSt/PVA contendo ChS (denotados como CSt/PVA/ChS, respectivamente) foram preparados usando um protocolo semelhante, mas com pequenas modificações. Após a homogeneização da solução de CSt/PVA, 55 mg de ChS (1 m/m-% em relação à massa total de CSt e PVA) foram adicionados ao frasco reacional, permanecendo sob agitação branda (100 rpm) por 3 h. Posteriormente, a solução foi vertida numa placa de Petri (85 x 10 mm) e o solvente foi evaporado em uma estufa a 40 °C por 24 h.

2.5. Preparo dos filmes CSt/PVA-MTX e CSt/PVA/ChS-MTX

A fim de realizar a dispersão do MTX na matriz polimérica, diferentes concentrações do fármaco (1 e 5 m/m-% em relação à massa total de polímeros) foram adicionadas em soluções de CSt/PVA e CSt/PVA/ChS, mantendo-se sob agitação magnética durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as soluções foram vertidas em placas de Petri e secas em estufa a 40 °C por 24 h. As concentrações

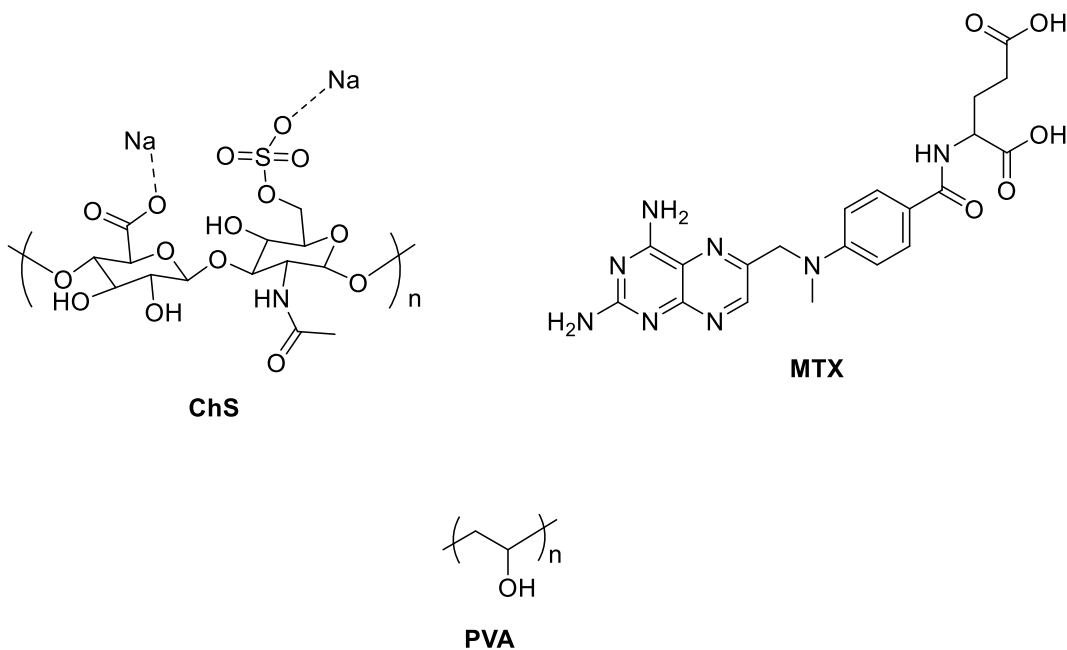
iniciais foram determinadas, levando em consideração o limite de dosagem terapêutica do fármaco, garantindo que não excedesse a dose terapêutica recomendada (Bello *et al.*, 2017). A composição de todas as amostras de filmes preparadas estão e a codificação das amostras são descritas na **Tabela 2**, mostrada a seguir.

Tabela 2. Composição e codificação das amostras de filme preparadas (carregadas ou não com MTX).

Filme	CSt (mg)	PVA (mg)	ChS (mg)	MTX (mg)	MTX carregado (m/m-%) ^a
CSt/PVA	100	1000	-	-	-
CSt/PVA-MTX1	100	1000	-	11	1
CSt/PVA-MTX5	100	1000	-	55	5
CSt/PVA/ChS-MTX1	100	1000	55	11	1
CSt/PVA/ChS-MTX5	100	1000	55	55	5

^a Percentual relação à massa total de polímeros utilizada no preparo do filme.

A fim de auxiliar na visualização e interpretação dos resultados, as estruturas químicas do PVA, ChS, e MTX são ilustradas abaixo no **Esquema 2**.



Esquema 2

3. Caracterização

O composto sintetizado CSt e as diferentes amostras (CSt/PVA, CSt/PVA-MTX, CSt/PVA/ChS e CSt/PVA/ChS-MTX) foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX) e análises termogravimétricas (TGA). Além dessas técnicas de caracterização, outros parâmetros como teor e distribuição do fármaco nos filmes, propriedades estudos de permeação foram avaliados em parceria com o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFSM e são detalhados a seguir.

3.1. Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A composição química dos filmes preparados foi avaliada por FTIR utilizando um equipamento da marca Shimadzu, modelo IR-Affinity-1 (Japão). Para as análises, foram preparadas pastilhas contendo as amostras sólidas previamente maceradas e misturadas com KBr anidro. As análises foram realizadas em um intervalo de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} com 80 varreduras por amostra.

3.2. Difração de raios-X (DRX)

As análises de DRX foram realizadas em convênio com outra instituição (CEME-Sul/FURG de Rio Grande). As medidas de DRX foram feitas em um difratômetro da marca Siemens, modelo D500 (Alemanha), equipado com uma fonte de radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($\approx 1,54 \text{ \AA}$), utilizando uma tensão de 40 kV e uma corrente de 1,75 mA. As medidas foram feitas em um ângulo de varredura (2θ) de 5 a 80°, com resolução de 0,02° e velocidade de varredura de 2° min^{-1} . As amostras foram analisadas na forma de pó.

3.3. Análises termogravimétricas (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas no equipamento SDT Q600, da marca TA Instruments, modelo TA60 (EUA) em uma faixa de temperatura de 30 a 500 °C, sob um fluxo de $\text{N}_{2(g)}$ de 100 mL min^{-1} , a uma taxa de aquecimento de

10 °C min⁻¹. Amostras com peso entre 0,1–10,0 mg foram pesadas previamente e colocadas em um porta amostras antes da análise.

3.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPCL-UV/Vis)

A quantidade de MTX efetivamente dispersas nos filmes foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por (Macedo *et al.*, 2021), porém com algumas modificações. Um sistema de HPLC Shimadzu LC-10AT (Japão) equipado com uma bomba LC-20AT, um detector UV-VIS SPD-M20A, um controlador de sistema CBM-20A e um injetor automático de amostra de válvula SIL-20A HT foi usado para a análise. A separação foi realizada a temperatura ambiente usando a coluna Gemini C18 Phenomenex (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) acoplada a uma coluna de guarda C18. A fase móvel isocrática consistia em tampão de fosfato de potássio (pH 3, 15 mmol L⁻¹) e acetonitrila (85:15, v/v-%) corrido a uma taxa de fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e o MTX foi detectado a 303 min.

3.5. Teor de MTX e homogeneidade dos filmes

Para a extração do MTX dos filmes, porções dos filmes (1 x 1 cm) foram cortadas e previamente pesadas (aproximadamente 30 mg). Cada amostra foi colocada em um frasco volumétrico (25 mL), dispersa em 25 mL de água destilada e mantida sob agitação magnética por 20 min. Após esse período, para amostras com concentração de 1 e 5 m/m-% de MTX, uma alíquota de 2 e 4 mL foram coletadas dos frascos volumétricos, respectivamente. Posteriormente, ambas as amostras foram diluídas em 10 mL de água destilada. A solução final das amostras, foram filtradas usando uma membrana de 0,45 µm e injetadas no equipamento de HPLC para que fosse obtido a quantificação. A avaliação foi realizada em triplicatas. A homogeneidade do fármaco nos filmes foi avaliada em três seções de cada lote de filme quantificado com a mesma metodologia.

3.6. Estudo de permeação *in vitro*

O estudo de permeação do MTX a partir dos filmes foi realizado utilizando as células verticais de difusão de Franz e a pele da orelha de um suíno como uma barreira biológica. Os implantes de pele foram extraídos e fixados cuidadosamente nas células de difusão, com o estrato córneo voltado para cima, para o compartimento do doador. O meio receptor consistiu em uma solução tampão de fosfato com pH 7,4 que foi mantido sob agitação magnética a 37 °C (n = 6). Cortes de 1,0 x 1,0 cm das formulações de filmes selecionados (CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5) foram aplicados na superfície da pele e umedecidos com 100 µL de solução tampão. Após 12 h, as amostras de filme foram removidas e o tecido e o meio receptor foram analisados. A pele foi dissecada em camadas para a quantificação do MTX. O *estrato córneo* (SC) foi separado pela técnica de *strip stripping*, com 18 fitas (Flax®). A epiderme viável (VE) e a derme (DE) foram separadas por exposição do tecido em banho-maria a 60 °C por 45 s. O meio receptor, também, foi quantificado para avaliar se haveria resíduos de MTX na solução. O composto foi extraído das camadas da pele com metanol (24 mL para SC, 1 mL para VE e 2 mL para DE), seguido por mistura de vórtice (2 min) e sonificado (15 min). Cada amostra foi filtrada através de uma membrana de celulose de 0,45 µm e injetada (50 µL) no sistema de HPLC e quantificada pelo método descrito anteriormente (seção 3.4). Este método também foi validado para determinar a especificidade do MTX para este experimento. A especificidade foi testada com amostras de fita e pedaços de pele inteira, as quais foram submetidas ao mesmo protocolo experimental e posteriormente analisadas em sistema de HPLC. Nenhuma interferência no cromatograma do MTX foi observada.

3.7. Estudos *in vivo*

3.7.1. Modelo de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) em camundongos

O desenho experimental para experimentos *in vivo* realizado em parceria com o LaFarBio (UFPel) está ilustrado na **Figura 4**. Primeiramente, os animais foram

divididos aleatoriamente em seis grupos independentes (n = 7 animais/grupo), conforme descrito na **Tabela 3**.

Tabela 3. Grupo de animais utilizados no design do experimento *in vivo*.

Grupo	Descrição
1	Controle
2	CFA
3	CFA + MTX
4	CFA + filme CSt/PVA-MTX5
5	CFA + filme CSt/PVA/ChS-MTX5
6	CFA + filme CSt/PVA

No dia 1 do protocolo experimental, foram realizadas avaliações do limiar e da latência da retirada da pata dos animais por meio dos testes do von-Frey e da placa quente, respectivamente. Em seguida, para estabelecer um modelo de artrite monoarticular em camundongos, uma injeção intraplantar de Adjuvante de Freund Completo (CFA) (1 mg mL^{-1} de *Mycobacterium tuberculosis* em óleo de parafina) foi administrada, conforme o protocolo previamente estabelecido (Omorogbe *et al.*, 2018). Uma injeção subcutânea contendo 0,1 mL de CFA foi então administrada na pata traseira direita de cada camundongo em todos os grupos experimentais, exceto o grupo controle. Os animais controles (Grupo 1) receberam injeção de 0,1 mL de soro fisiológico no mesmo local.

Quatorze dias após a imunização com CFA, os animais foram submetidos a testes comportamentais para verificar a sensibilidade mecânica e térmica, confirmando o desenvolvimento de dor. Após isto, os camundongos dos Grupos 1, 2 e 3 (controle, CFA e CFA + MTX) foram tratados por via oral, com solução salina (10 mL kg^{-1}) ou MTX na dose de 5 mg kg^{-1} , nos dias 15, 18 e 21 estipulado no protocolo experimental. Para os grupos 4 a 6, a pele dorsal de cada animal foi preparada com raspagem e, em seguida, os filmes de CSt/PVA-MTX, CSt/PVA/ChS-MTX e CSt/PVA (2,0 cm altura x 2,0 cm de comprimento, com aproximadamente 60 mg) foram aplicados nesta área com o auxílio de uma fita micropore, nos mesmos dias mencionados com os grupos 1 ao 3. A eficácia das formulações dos filmes foi avaliada através da sensibilidade mecânica e térmica nos dias 18 e 21 do experimento.

No dia 22, vinte e quatro horas após o último tratamento, os animais foram sacrificados por inalação do anestésico isoflurano. Foram coletas as patas traseiras direitas de cada camundongo e as amostras foram rapidamente congeladas a -20 °C para análises bioquímicas adicionais.

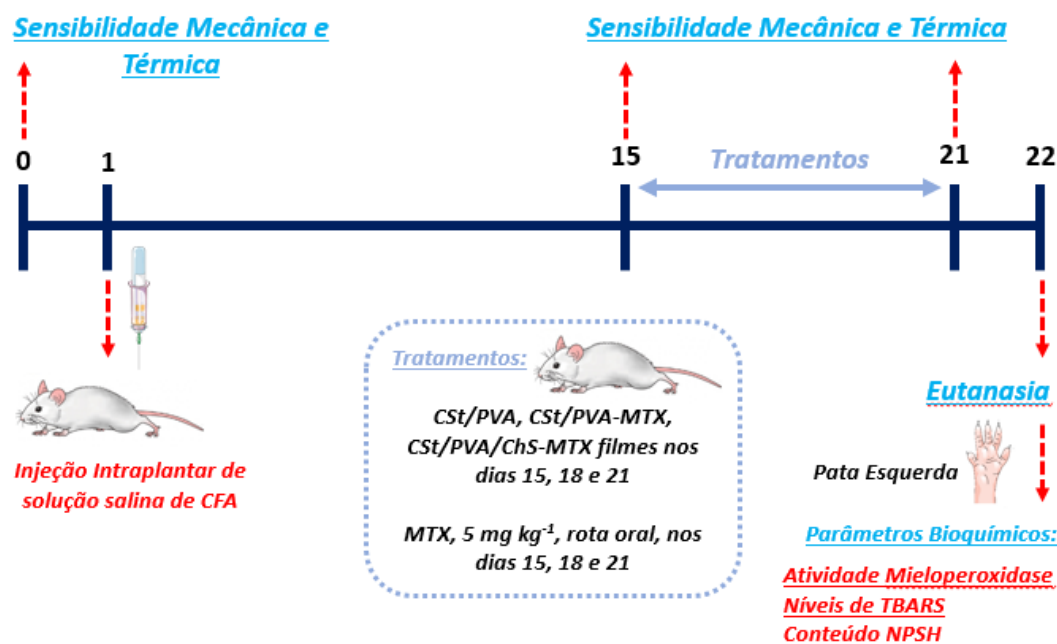


Figura 5. Ilustração do design experimental in vivo.

3.7.2. Avaliação da sensibilidade mecânica

A sensibilidade mecânica dos animais foi avaliada utilizando um analgesímetro eletrônico (Insight, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Este dispositivo é composto por um transdutor de pressão específico da pata, conectado a um aparelho. Inicialmente, os animais foram aclimatados por 30 min em câmaras individuais de plástico transparente, localizadas em uma plataforma elevada com tela de arame que permite o acesso à superfície plantar das patas. Esse teste consiste em evocar um reflexo de flexão da pata traseira por meio de um transdutor de força manual adaptado com ponta de polipropileno. O limiar da retirada da pata foi determinado aplicando-se uma pressão progressiva e constante perpendicularmente no centro da superfície plantar da pata traseira, até que o animal retirasse a pata. Após essa resposta, a intensidade da pressão foi registrada automaticamente. Os resultados foram expressos como limiar de retirada da pata (g).

3.7.3. Avaliação da sensibilidade térmica

Os reflexos da dor em resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente foram avaliados de acordo com o método de (Macdonald *et al.*, 1946). Os camundongos foram colocados individualmente em uma placa de superfície metálica aquecida (52 ± 1 °C), que foi circundada por uma gaiola de acrílico transparente. O tempo entre a colocação do animal no aparelho e o evento de resposta nociceptiva (pular da superfície, sacudir ou lambear as patas traseiras) foi registrado. Para evitar qualquer lesão nas patas dos animais, um tempo de corte de 45 s foi estabelecido. Os resultados foram expressos como latência (s) de retirada da pata.

3.7.4. Estimativa dos parâmetros inflamatórios

3.7.4.1. Avaliação do edema da pata

No dia 22 do protocolo experimental, os animais foram sacrificados e ambas as patas traseiras foram cortadas na articulação do tornozelo e pesadas na balança analítica. O edema da pata foi medido pela diferença entre a pata direita (tratamento com CFA) e a pata esquerda (tratamento com veículo) e os resultados foram expressos em mg.

3.7.4.2. Estimativa da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para este ensaio, as amostras das patas foram homogeneizadas em PBS (20 mmol/L, pH 7,4) contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 0,1 mmol L⁻¹). Em seguida, os tecidos homogeneizados foram sonificados por 2 min, congelados e descongelados (três vezes). Logo após a etapa de homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 2.000g por 15 min, no qual foi coletado o sobrenadante (S₁). Em seguida, a fração S₁ também foi centrifugada a 14.000g por 30 min a 4 °C para produzir um produto (P₂) que foi ressuspenso em um meio contendo tampão de fosfato de potássio (50 mmol L⁻¹, pH 6,0) e brometo de hexadeciltrimetil amônio (0,5 m/v-%) antes de realizar o ensaio enzimático. Seguindo o método previamente descrito

(Suzuki et al., 1983), utilizou-se uma alíquota de P₂ ressuspensa e adicionado a um meio contendo o tampão de ressuspensão, bem como *N,N,N',N'*-tetrametilbenzidina (1,5 mmol L⁻¹). A atividade cinética do MPO foi iniciada após a adição de H₂O₂ (0,01 v/v-%), e a reação de cor foi medida por espectrofotometria a λ = 655 nm a 37 °C. Os resultados foram expressos como densidade óptica (DO)/mg de proteína/min.

3.7.5. Estimativa dos marcadores de estresse oxidativo

3.7.5.1. Preparo da amostra

As amostras de pata foram homogeneizadas (1:10 m/v) em tampão Tris-HCl (50 mmol L⁻¹) a pH 7,4. O tecido homogeneizado foi, então, centrifugado a 2.500x *g* por 10 min a 4 °C e o sobrenadante (S₁) foi utilizado para as análises bioquímicas. A concentração de proteína em S₁ foi estimada de acordo com o método descrito por Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA, 1 mg mL⁻¹) como padrão. A cor foi medida por espectrofotometria a λ = 595 nm.

3.7.5.2. Ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio do TBARS foi realizado para determinar indiretamente os níveis de malondialdeído (MDA), um importante marcador de peroxidação lipídica. Conforme descrito anteriormente por Ohkawa *et al.*, 1979 o MDA reage com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) sob condições ácidas e altas temperaturas para produzir o cromógeno. As alíquotas de S₁ foram incubadas com TBA (0,8 m/v-%), tampão de ácido acético (pH 3,4) e dodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1 m/v-%) por 2 h a 95 °C. A reação com cor foi medida a λ = 532 nm e os resultados foram expressos como nmol de MDA/mg de tecido, respectivamente.

3.7.4.3. Conteúdo de tiol não proteico (NPSH)

O conteúdo de NPSH, uma defesa antioxidante não enzimática, foi determinado pelo método de Ellman, 1959. Resumidamente, S₁ foi misturado (1:1)

com ácido tricloroacético (TCA), (10 v/v-%). Após a centrifugação (3.000g por 10 min), uma alíquota de sobrenadante contendo grupos -SH livres foi adicionada em tampão de fosfato de potássio (1 mmol L⁻¹) pH 7,4 e ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, 10 mmol L⁻¹). A reação com cor foi medida a $\lambda = 412$ nm e os níveis de NPSH foram expressos como nmol de NPSH/g lenço de papel.

3.8. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. Os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad® (EUA). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M.). O teste *Post Hoc* foi realizado apenas quando o valor *F* atingiu o nível necessário de significância estatística ($p < 0,05$) e quando os dados foram considerados homogêneos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos filmes preparados

A **Figura 6** exibe imagens fotográficas dos filmes CSt/PVA, CSt/PVA-MTX5, CSt/PVA/ChS e CSt/PVA/ChS-MTX5 após o processo de secagem. Ambas as amostras mostram a formação de filmes com superfícies aparentemente lisas e regulares. Além disso, observa-se uma alteração no espectro visual dos filmes contendo o fármaco em comparação com aqueles sem o fármaco.

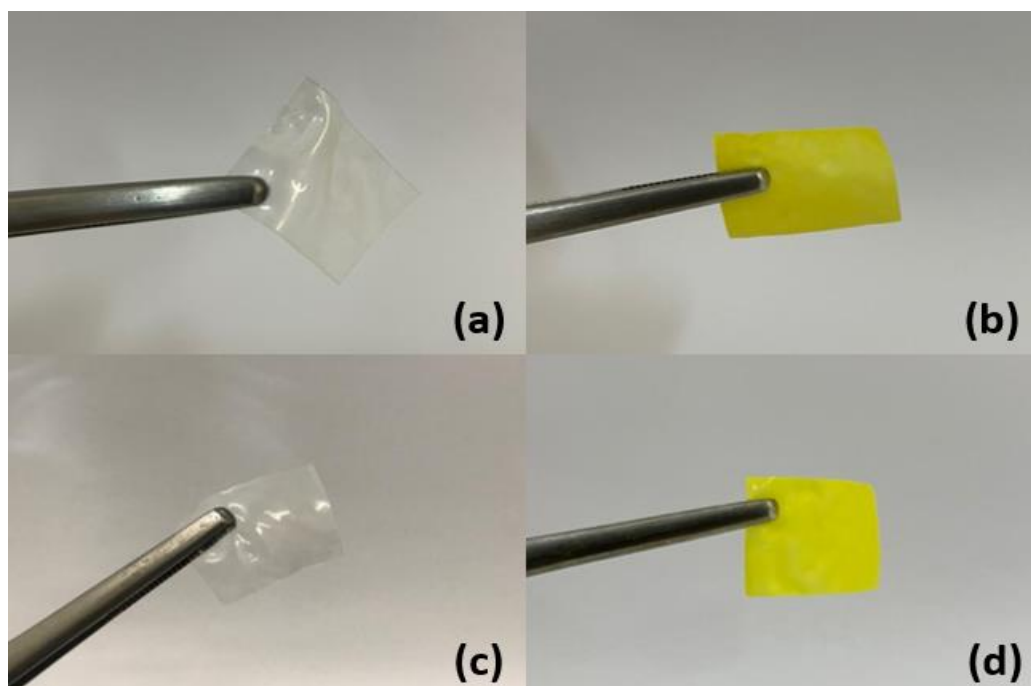


Figura 6. Imagens fotográficas dos filmes de CSt/PVA, CSt/PVA/ChS, CSt/PVA-MTX e CSt/PVA/ChS-MTX.

Após a formulação dos filmes CSt/PVA-MTX (1 e 5 m/m-%) e CSt/PVA/ChS-MTX (1 e 5 m/m-%), os parâmetros de eficiência de encapsulação e a homogeneidade, foram avaliados em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os resultados dessas análises estão dispostos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Teor de MTX nos filmes preparados.

Filmes	Teor de MTX (%)
CSt/PVA-MTX1	104,5 ± 7,6
CSt/PVA-MTX5	68,4 ± 1,3
CSt/PVA/ChS-MTX1	110,5 ± 10,2
CSt/PVA/ChS-MTX5	70,4 ± 1,4

As amostras de filmes com menor teor de MTX carregado (CSt/PVA-MTX1 e CSt/PVA/ChS-MTX1) apresentaram maior eficiência de encapsulação (104,5% e 110,5%, respectivamente). Esses resultados indicam que os filmes preparados com 1 m/m-% de MTX apresentam valores aproximados das doses terapêuticas recomendadas, do que quando comparadas com os filmes preparados com 5 m/m-%

de MTX (Patrick, 2002). Por outro lado, mesmo que as amostras com maior teor de MTX (CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5) tenham apresentado menor eficiência de encapsulação (68,4% e 70,4%, respectivamente), foi possível observar uma maior homogeneidade do fármaco nos filmes preparados, quando comparadas com as amostras com menor teor de fármaco carregado. Essa homogeneidade é um critério importante para os SLTF, pois a mesma quantidade de fármaco poderá ser encontrada em qualquer parte do filme, atribuindo uma maior confiabilidade relacionada a dose que será utilizada durante o tratamento. Além disso, conforme observado, a presença de ChS não causou diferença significativa nos valores calculados para as amostras contendo a mesma quantidade de MTX. Em vista disso, os filmes com menor eficiência de encapsulação e com maior homogeneidade, CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5, foram selecionados para realizar as análises de caracterização e os experimentos *in vitro* e *in vivo* do fármaco MTX.

Os experimentos de permeação cutânea do fármaco MTX, foram realizados a fim de estimar o perfil de distribuição do fármaco nas diferentes camadas da pele. Neste estudo, foram utilizadas orelhas de suínos e os resultados podem ser observados na **Figura 7**. Os resultados demonstraram que ambas as amostras de filme (CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5) apresentaram permeação uniforme do fármaco em ambas as camadas da pele. Esse resultado corrobora com os resultados obtidos nos testes de homogeneidade do filme, visto que, nas camadas adjacentes ao local onde foi depositado o filme foi possível observar uma permeação constante do fármaco em ambas as camadas. Na aplicação local com doses farmacêuticas, o principal desafio é vencer a barreira da pele para que o medicamento administrado seja eficiente. Além disso, pode ser observado uma maior concentração do MTX no centro do local onde foi liberado o fármaco, sugerindo que a formulação pode proporcionar uma absorção sistêmica do fármaco. Para as amostras CSt/PVA-MTX5, a permeação máxima foi calculada em 62,0%, enquanto para os filmes CSt/PVA/ChS-MTX5 a permeação máxima foi de 58,3%. Entretanto, esses valores foram estatisticamente semelhantes. Além disso, o pH dos meios foi selecionado, levando em consideração o pH fisiológico, desde a administração cutânea dos filmes visando uma ação sistêmica. Ainda, vale ressaltar que a composição polimérica da formulação bem como as propriedades físico-químicas do MTX pode influenciar no perfil de permeação. Embora que no estudo anterior demonstra que a conjugação do MTX

(hidrofóbico) com ChS pode aumentar a solubilidade em água, absorção e, portanto, sua biodisponibilidade; neste material não houve o efeito sobre a permeação de MTX.

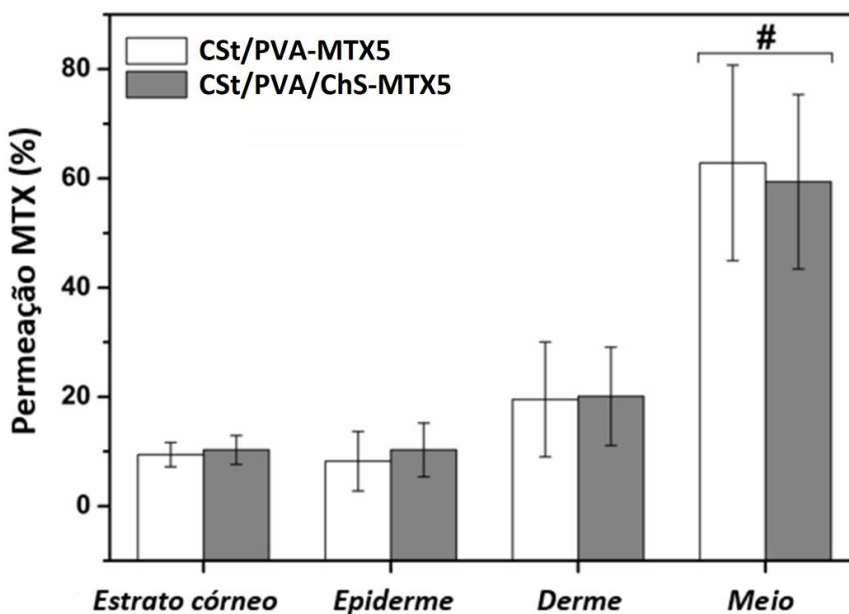


Figura 7. Porcentagem da permeação de MTX para os filmes CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5. Hashtag denota nível de significância quando comparado a todas as outras camadas: (#) $p < 0,05$ (ANOVA unidirecional pelo teste de Tukey).

A fim de identificar os diferentes grupos funcionais presentes na estrutura dos materiais preparados, utilizou-se a técnica de FTIR a partir da qual foram obtidos os espectros reportados nas **Figuras 8a e 8b**.

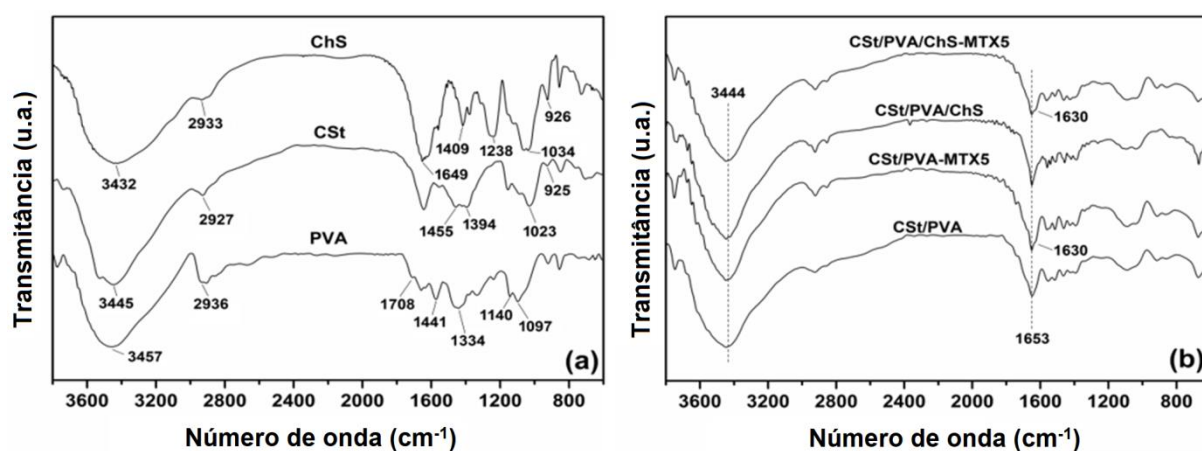


Figura 8. Espectros de FTIR para (a) os materiais precursoros PVA, CSt e ChS e (b) dos filmes de CSt/PVA, CSt/PVA/ChS e dos filmes contendo MTX disperso.

O espectro de FTIR obtido para o PVA apresentou bandas características em 3457 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação O-H dos grupos -OH, 2936 cm^{-1} referente ao estiramento assimétrico da ligação C-H dos grupos alquil, 1708 cm^{-1} atribuída ao estiramento de grupos acetato residuais, 1441 cm^{-1} referente ao dobramento da ligação C-H, 1140 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações C-OH e em 1097 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-O (Costa-Júnior *et al.*, 2009). Já o espectro do CSt exibiu bandas em 3445 cm^{-1} devido ao estiramento O-H dos grupos -OH, em 2927 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico da ligação C-H, em 1455 cm^{-1} referente ao estiramento característico dos grupos $\text{-N}^+(\text{CH}_3)_3$ (deformação C-H de grupos metila). Conforme reportado na literatura, a presença dessa banda confirma a síntese do derivado CSt (Chatterjee *et al.*, 2023; Yu *et al.*, 2018). Ainda no espectro obtidos para CSt, a banda em torno de 1630 cm^{-1} é atribuída à flexão O-H associada aos grupos -OH, enquanto as bandas na região de $1150\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento assimétrico da ligação C-O-C e ao estiramento C-O das unidades glicosídicas do amido (Wang and Xie, 2010). Quando comparado com o espectro do St *in natura* (não mostrado aqui), o espectro obtido para o CSt apresenta indicativos que confirmam a viabilidade da rota química escolhida para a síntese desse derivado. Por fim, o espectro de FTIR do ChS exibiu bandas em 3432 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações O-H dos grupos -OH, 2933 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico das ligações C-H, 1649 cm^{-1} referente ao estiramento C=O dos grupos amida, 1619 cm^{-1} devido ao estiramento C=O dos grupos -COOH, 1049 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C-O e acoplamento da vibração angular do grupo -OH e em 1238 cm^{-1} referente às vibrações das ligações S=O dos grupos -OSO₃H (Foot and Mulholland, 2005). Bandas em 1037 e 926 cm^{-1} são devido ao estiramento C-O e as ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ do ChS.

Os espectros de FTIR obtidos a partir das amostras de filmes, **Figura 8b**, exibiram predominantemente as bandas características dos materiais precursores, PVA e CSt. Os espectros de CSt/PVA apresentam a combinação das bandas características de ambos os polímeros, com pequenas discrepâncias. Aparentemente, bandas associadas aos grupos -OH do CSt e do PVA, foram deslocadas para regiões de menor número de onda, sugerindo uma interação por ligação de hidrogênio entre os polímeros. O espectro do filme contendo ChS, exibiu mudanças quase que

imperceptíveis, quando comparadas com o espectro do filme CSt/PVA. No geral, as bandas características de ChS ocorrem na mesma região de número de onda que o CSt e PVA, sugerindo a sobreposição das bandas do ChS. Além disso, a proporção de ChS usado na formulação dos filmes é muito pequena (1 m/m-%) em relação à proporção de CSt/PVA, o que também pode explicar este resultado. No entanto, o alargamento da banda em 3444 cm^{-1} associada ao estiramento da ligação O-H foi reduzido e afinado, como pode ser observado no espectro de CSt/PVA/ChS em comparação com CSt/PVA. Isso é um indicativo de redução das ligações de hidrogênio entre o CSt e o PVA. A natureza aniônica do ChS (devido aos grupos COOH e $\text{-OSO}_3\text{H}$) (Jardim *et al.*, 2015) pode favorecer as interações eletrostáticas com os grupos catiônicos de CSt durante a preparação do filme. Com isso, a interação CSt–ChS pode prejudicar as interações intermoleculares com as cadeias de PVA. Os espectros de FTIR obtidos para os filmes carregados com MTX mostraram-se muito semelhantes aos espectros dos filmes sem o fármaco. No entanto, o aparecimento de bandas do tipo ombro a 1630 cm^{-1} pode ser atribuído ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático presente no MTX, indicando assim a presença do fármaco na estrutura dos filmes. Como notado na literatura, esta banda tem sido usada por alguns pesquisadores para confirmar o encapsulamento do MTX em diferentes veículos de entrega (Ram Prasad *et al.*, 2019; Rostamizadeh *et al.*, 2018).

Padrões de DRX dos filmes preparados foram obtidos a fim de investigar a estrutura os mesmos. Conforme mostrado na **Figura 9**, o padrão de difração do filme CSt/PVA apresentou picos de difração em $2\theta \approx 19,4^\circ$, $22,8^\circ$ e $40,6^\circ$, que são atribuídos aos planos de reflexão (101), (102) e (200) dos microdomínios cristalinos do PVA na matriz polimérica (Zhang *et al.*, 2013). Estes microdomínios são formados pela interação física das cadeias de PVA durante a preparação do filme. Este resultado é consistente com um estudo anterior realizado por nosso grupo, onde verificamos que o CSt tem uma baixa cristalinidade e sua presença em uma matriz de PVA não afeta a formação desses domínios cristalinos (Zhang *et al.*, 2013). Da mesma forma, a presença de ChS, um polissacarídeo pouco cristalino, não deve alterar a ordem estrutural dos filmes obtidos.

Os biomateriais fabricados com o intuito de serem utilizados como SLTF, podem contribuir no impedimento da recristalização de medicamentos carregados (Santos *et al.*, 2018). Esse fato pode contribuir para manter as propriedades

farmacológicas e farmacocinéticas de fármacos cristalinos, como o MTX. Conforme pode ser observado na **Figura 9**, os padrões de DRX para as amostras de filme carregadas com 5 m/m-% de MTX (CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5) são semelhantes ao padrão de DRX de CSt/PVA, indicando que o fármaco permaneceu no estado amorfo em ambas as matrizes poliméricas. Normalmente, o padrão de XRD de MTX livre exibe vários picos de difração ao longo da região 2θ de 10° a 30° (Tekko *et al.*, 2020). A ausência desses picos confirma que, após o encapsulamento, as moléculas de MTX não foram capazes de formar cristais. Provavelmente, o MTX interage com a matriz polimérica. Nas condições experimentais utilizadas para a preparação dos filmes, as moléculas de MTX são carregadas negativamente (pKa 5,71) devido à desprotonação de seus grupos carboxílicos (Alvarez-Figueroa, 2001). Portanto, o MTX pode estar interagindo com o CSt, que tem uma natureza catiônica. Essa sugestão é reforçada uma vez que os picos de difração atribuídos aos microdomínios cristalinos do PVA não são afetados pela presença do MTX. No geral, este resultado corrobora nossos ensaios anteriores que demonstraram uma distribuição homogênea do MTX nas amostras de filme preparadas.

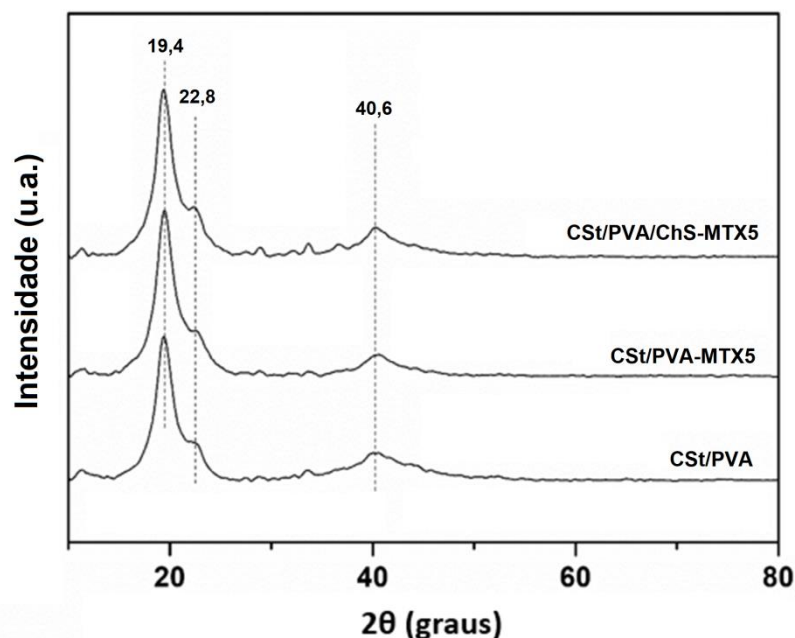


Figura 9. Padrões de DRX obtidos para os filmes CSt/PVA, CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5.

As propriedades térmicas dos filmes CSt/PVA, CSt/PVA-MTX e CSt/PVA/ChS-MTX foram investigadas com o intuito de avaliar a relação estrutura–propriedades dos filmes preparados e sua estabilidade térmica. As curvas de TGA e DTG obtidas são apresentadas nas **Figuras 10a e 10b**.

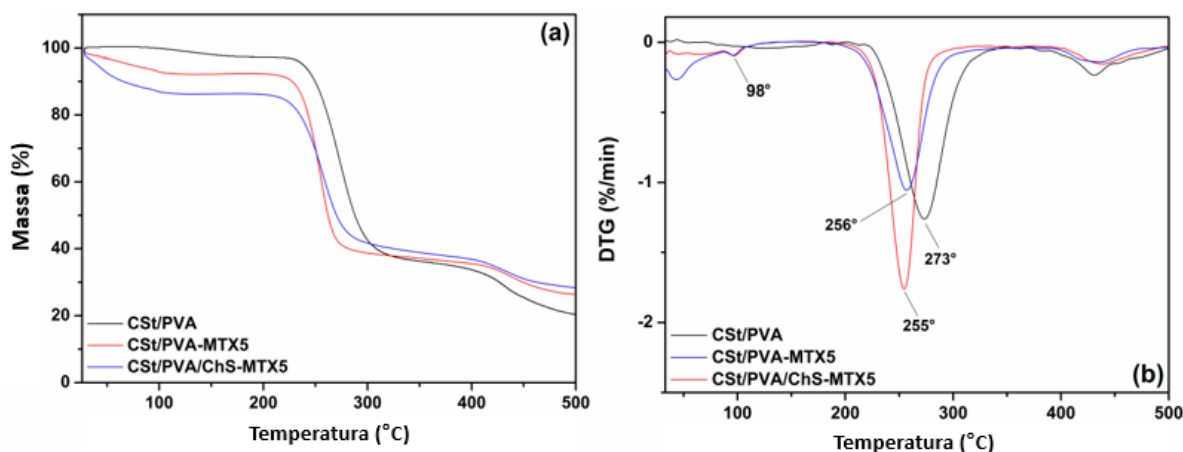


Figura 10. Curvas de TG (a) e de DTG (b) dos filmes CSt/PVA, CSt/PVA-MTX e CSt/PVA/ChS-MTX.

A curva TGA dos filmes CSt/PVA exibiu três estágios principais de perda de massa, que são atribuídos à volatilização da umidade (de 50 a 150 °C), decomposição térmica do CSt combinada com a eliminação de grupos laterais –OH do PVA (de 210 a 350 °C, com máximo em 273 °C) e degradação do esqueleto poliênico do PVA (de 350 a 500 °C) (El-Zaher and Osiris, 2005). A ausência de estágios de perda de massa, separados para a decomposição térmica de cada polímero (CSt e PVA) indica boa compatibilidade entre eles. Isto, corrobora com os dados de FTIR que indicam interações por ligações de hidrogênio entre CSt e PVA. Comparativamente, a presença de MTX exerceu um leve efeito no comportamento térmico dos filmes carregados com o fármaco. As principais alterações estão relacionadas ao aumento do percentual de perda de massa devido à volatilização da umidade e redução da temperatura máxima de decomposição térmica. Para CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5 a volatilização de umidade (de 30 a 125 °C) resultou em perda de peso em torno de 8% e 14%, respectivamente. Provavelmente, a presença de MTX prejudicou as interações intermoleculares por ligações de hidrogênio entre CSt e PVA aumentando sua higroscopia. Este efeito é pronunciado pela presença de ChS que pode interagir com CSt via interação eletrostática. Além disso, o ChS é um polímero

hidrofílico, que pode contribuir para a retenção de umidade. A redução das interações CSt e PVA também explica o deslocamento da temperatura máxima de decomposição para temperaturas mais baixas (256 °C para CSt/PVA-MTX5 e 255 °C para CSt/PVA/ChS-MTX5). É importante mencionar que a decomposição térmica de MTX e ChS puros geralmente ocorre na faixa de temperatura de 225–350 °C (Fernández-Villa *et al.*, 2022; Vasconcelos Oliveira *et al.*, 2017). Além disso, as curvas DTG dos filmes carregados com MTX exibiram um pequeno pico centrado a 98 °C que segundo a literatura é devido à eliminação das moléculas de água de hidratação ligadas à estrutura do MTX (Dhanka *et al.*, 2018). Além disso, analisando o peso residual a 500 °C para todas as amostras de filmes, nota-se que o resíduo de CSt/PVA corresponde a cerca de 20% do seu peso inicial, enquanto para CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5 o resíduo corresponde a aproximadamente 25% e 29%. Praticamente, o aumento do peso residual se ajusta às quantidades iniciais de MTX e MTX+ChS adicionadas à formulação dos filmes. Com base nesses dados, pode-se confirmar que o MTX foi eficientemente carregado nas matrizes poliméricas.

4.2. Estudos *in vivo*

A fim de, avaliar a eficiência terapêutica dos filmes preparados, foi escolhido um dos três principais modelos animais de artrite crônica. Diversos estudos empregam modelos monoartrítico, induzido por CFA, como forma de investigar as características da AR, incluindo propriedades neurais periféricas e centrais (Costa-Júnior *et al.*, 2009), comportamentos nociceptivos induzidos por inflamação, bem como novas estratégias de tratamento (Kargutkar and Brijesh, 2016). Chillingworth and Donaldson, 2003 relataram que uma injeção intradérmica de CFA na pata de camundongos induz uma condição inflamatória localizada semelhante a AR.

Assim, na **Figura 11**, é possível observar que no teste do von-Frey, os animais exibiram um limiar de retirada da pata basal semelhante entre os grupos experimentais no dia 0 ($F_{(5,36)} = 2,09$; $p > 0,05$). Após 15 dias, os camundongos expostos ao CFA apresentaram redução de 53% no limiar de retirada da pata quando comparados ao grupo controle, o que caracteriza uma hipersensibilidade mecânica ($F_{(5,36)} = 75,05$; $p < 0,0001$). Já no dia 21, os camundongos que foram tratados com MTX ou com os filmes CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5, apresentaram uma

diminuição na hipersensibilidade mecânica induzida por CFA ($F_{(5,36)} = 21,73$; $p < 0,01$), com uma inibição máxima de 67%, 69% e 69%, respectivamente. O experimento, também, demonstrou que o tratamento com filme CSt/PVA, sem o fármaco carregado, foi ineficaz para aumentar o limite de retirada da pata em camundongos tratados com CFA.

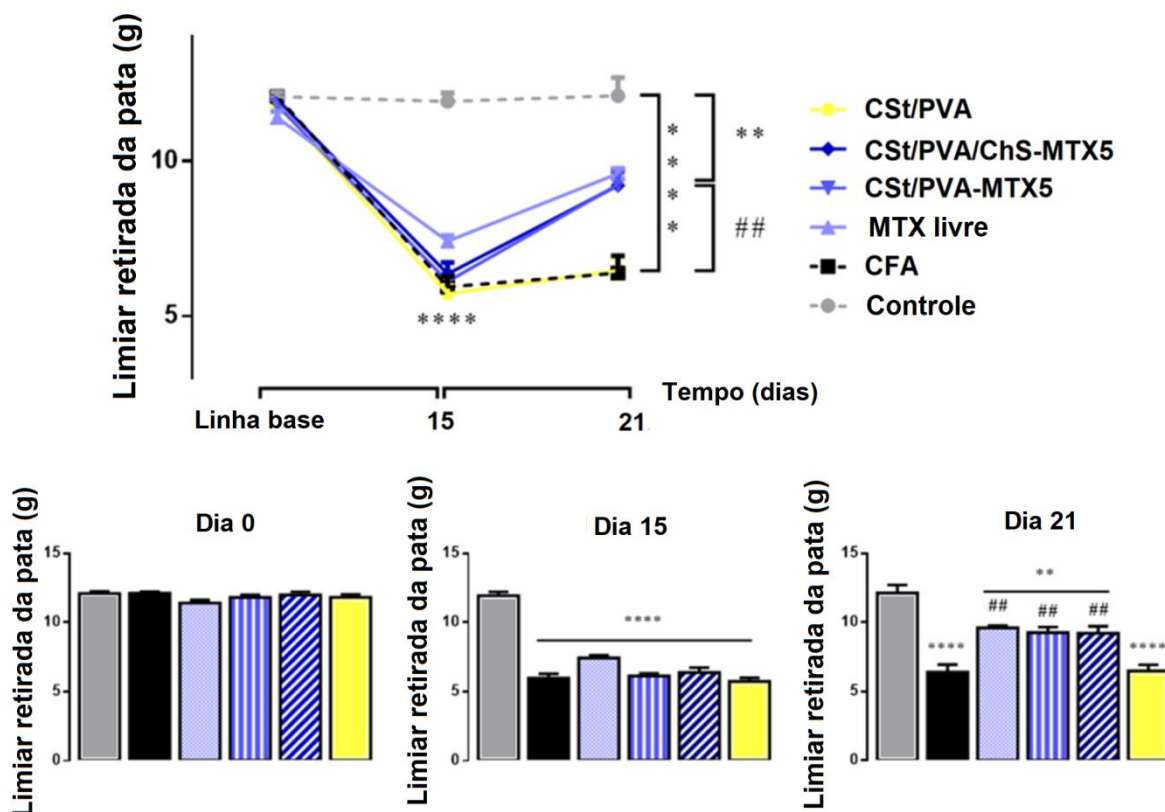


Figura 11. Efeito dos filmes CSt/PVA-MTX5, CSt/PVA/ChS-MTX5 e CSt/PVA sem MTX na hipersensibilidade mecânica na artrite induzida por CFA em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ S.E.M. de 7 camundongos em cada grupo. O asterisco denota níveis de significância quando comparado ao grupo controle: (****) $p < 0,0001$ e (**) $p < 0,01$; hashtag denota níveis de significância quando comparados com o grupo CFA: (##) $p < 0,01$ (ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey).

De forma similar, na **Figura 12** são mostradas as respostas ao estímulo térmico em camundongos. Como pode ser observado no dia 0 não houve diferença significativa na latência de retirada da pata basal entre os grupos experimentais ($F_{(5, 36)} = 1,77$; $p > 0,05$). Porém, após 15 dias a administração de CFA diminuiu em cerca de 57% a latência de retirada da pata, indicando hipersensibilidade térmica quando comparado com o grupo controle ($F_{(5, 36)} = 3,77$; $p > 0,01$). O tratamento por um curto

período apenas com MTX ou com os filmes CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5 restauraram a hipersensibilidade térmica dos camundongos tratados com CFA ($F_{(5, 36)} = 6,46$; $p > 0,001$), sendo possível obter uma inibição máxima de 69%, 68% e 67%, para esses grupos. Neste teste, o tratamento com o filme CSt/PVA também não alterou a latência de retirada da pata em comparação com camundongos tratados com CFA.

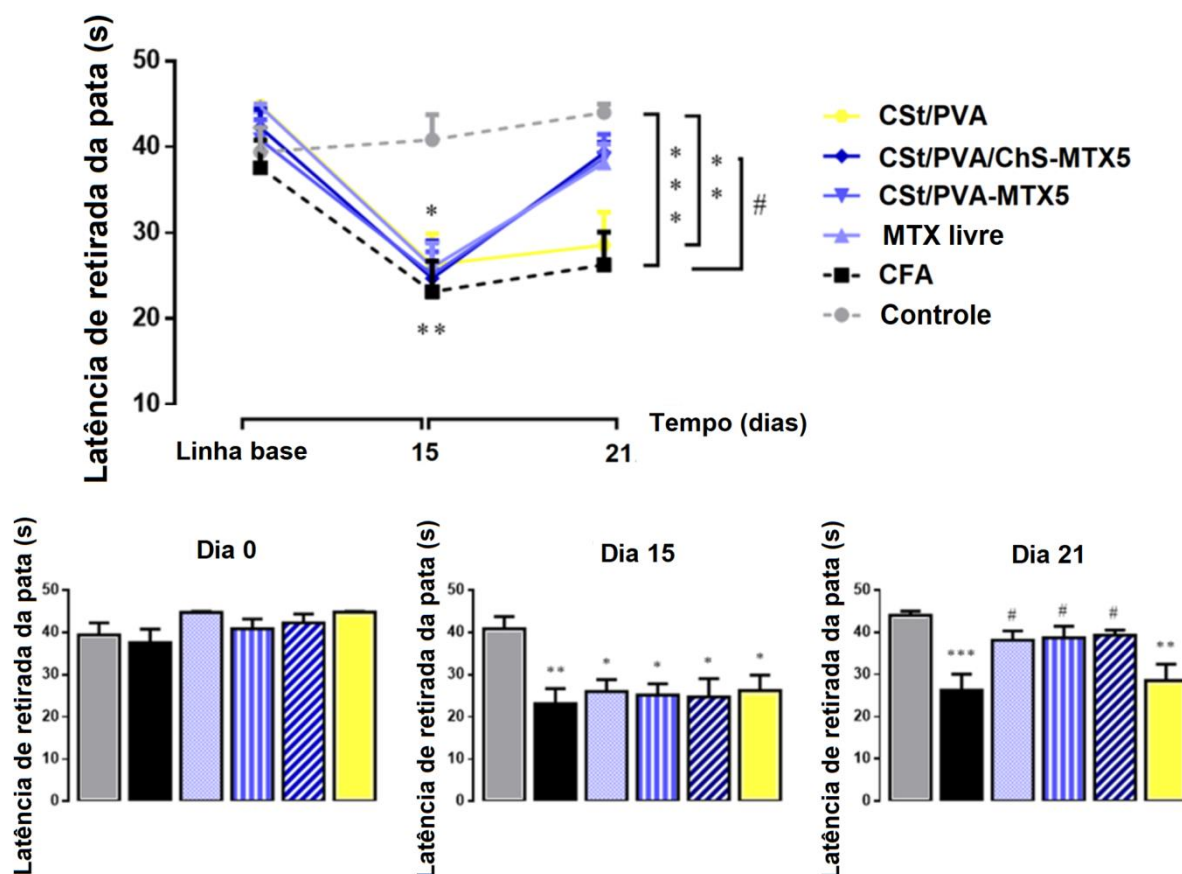


Figura 12. Efeito do MTX livre e dos filmes CSt/PVA-MTX5, CSt/PVA-ChS-MTX5 e CSt/PVA na hipersensibilidade térmica em artrite induzida por CFA em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ S.E.M. de 6–7 camundongos em cada grupo. O asterisco denota níveis de significância quando comparado ao grupo controle: (**) $p < 0,01$ e (*) $p < 0,05$ (ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey).

Com os dados obtidos a partir dos estudos descritos acima foi possível observar que a inoculação de CFA em camundongos altera suas respostas nociceptivas conforme evidenciado por um aumento nas sensibilidades mecânica e térmica. Além disso, todos os filmes carregados com MTX reduziram ambas as hipersensibilidades (térmica e mecânica) em camundongos tratados com CFA

indicando um efeito antinociceptivo. Com esses dados é possível sugerir que os filmes CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5 foram tão eficazes quanto o fármaco MTX contra distúrbios do tipo RA em camundongos. No entanto, os filmes preparados com e sem ChS não apresentaram efeitos perceptíveis nos camundongos tratados com CFA. Isso pode estar relacionado com a pouca quantidade de ChS adicionada à matriz de CSt/PVA, sendo essa insuficiente para promover resultados perceptíveis nos testes realizados.

Além de causar hipersensibilidade mecânica e térmica, o tratamento dos camundongos com o CFA, também induz dor inflamatória crônica como aquela encontrada em pacientes acometidos com AR. O CFA promove a liberação de vários mediadores inflamatórios que podem levar a sensibilização dos neurônios nociceptivos, caracterizada pela redução no limiar de dor. Com isso, a formação de edema, evidenciado por um aumento no volume da pata, representa uma marca de resposta inflamatória na artrite induzida por CFA (Kumar *et al.*, 2020).

A MPO, por ser uma enzima presente nos grânulos dos leucócitos, principalmente, neutrófilos e macrófagos, intercede na infiltração dessas células na lesão local e é responsável pela secreção de hipoclorito. Por esse motivo, a MPO tem sido considerada um marcador de resposta inflamatória e pode estar relacionada à patogênese da AR (Strzepa *et al.*, 2017). Os resultados do estudo *in vivo*, demonstram um aumento de cerca de 205 vezes no volume da pata ($F_{(5, 36)} = 14,38$; $p < 0,0001$), enquanto a atividade de MPO aumentou 2,5 vezes ($F_{(5, 36)} = 6,15$; $p < 0,001$) em camundongos expostos ao CFA (**Figuras 13a e 13b**).

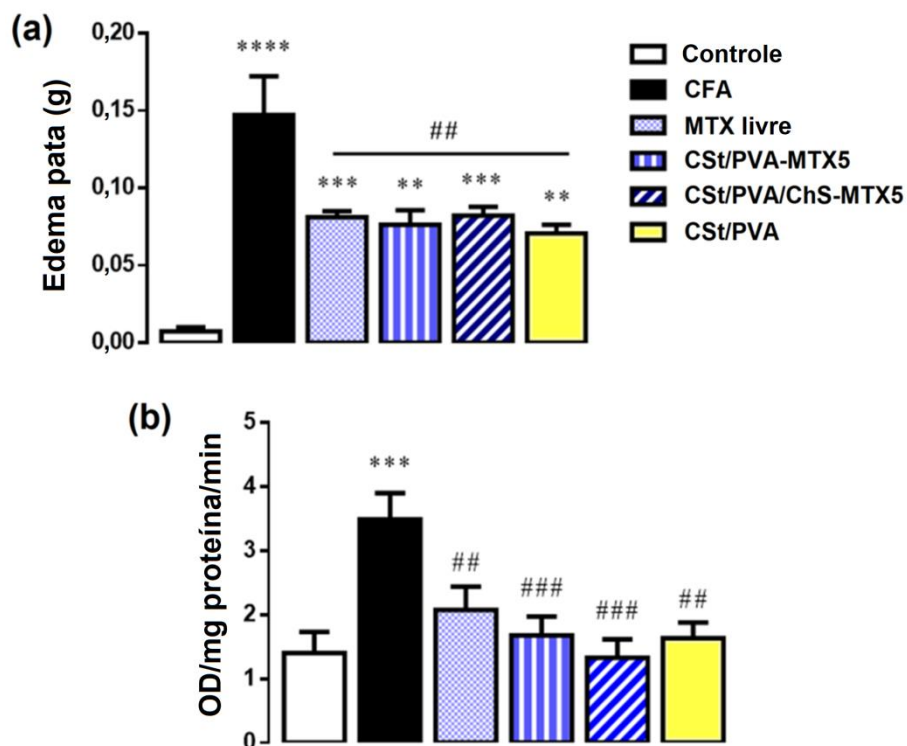


Figura 13. Efeito do MTX livre e dos filmes CSt/PVA-MTX5, CSt/PVA/ChS-MTX5 e CSt/PVA sobre (a) a formação de edema e (b) a atividade de MPO no tecido da pata de artrite induzida por CFA em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ S.E.M. de 6–7 camundongos em cada grupo. O asterisco denota níveis de significância quando comparado ao grupo controle: (****) $p < 0,0001$ e (***) $p < 0,001$; hashtag denota níveis de significância quando comparados com o grupo CFA: (###) $p < 0,001$ e (##) $p < 0,01$ (ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey).

O tratamento por um prazo curto com as amostras dos filmes (carregados ou não com o fármaco), bem como apenas com o fármaco MTX, atenuaram a formação do edema ($p < 0,01$) e restauraram a atividade de MPO ($p < 0,01$) na pata de camundongos tratados com CFA. Tais resultados, induzem a acreditar que os filmes formulados com CSt/PVA (sem MTX) reduziram o processo inflamatório na lesão local, mas a incorporação de MTX nos filmes CSt/PVA-MTX5 ou CSt/PVA/ChS-MTX5 exerceu um efeito antiartrítico, semelhante ao do fármaco MTX, pois os filmes foram capazes de atenuar, não só os parâmetros inflamatórios, mas também o comportamento nociceptivo em camundongos tratados com CFA.

O estresse oxidativo contribui para desencadear o processo inflamatório na fisiopatologia da AR cuja relação é interdependente. De fato, os estudos anteriores

mostraram que altos níveis de estresse oxidativo e inflamação estão positivamente correlacionados com a gravidade dos sintomas em pacientes afetados pela AR (Quiñonez-Flores *et al.*, 2016; Stamp *et al.*, 2012). Além disso, os biomarcadores de estresse oxidativo são modificados nos tecidos extra-articulares de modelos animais de AR (Chen and Liu, 2016). Nas **Figuras 14a e 14b**, observa-se o aumento nos níveis de TBARS ($F_{(5, 36)} = 5,25$; $p > 0,001$), enquanto a defesa antioxidante não enzimática (NPSH) não foi alterada no tecido da pata camundongos expostos ao CFA ($F_{(5, 36)} = 0,95$; $p > 0,05$). Além disso, o tratamento em curto prazo com todos os filmes preparados (com e sem MTX) e apenas com o fármaco MTX, não alteram os níveis de NPSH ($p > 0,05$), mas foram capazes de reduzir os níveis de TBARS quando comparados com o grupo CFA ($p < 0,01$). Essas descobertas sugerem que, tanto os filmes baseados em CSt/PVA quanto o MTX livre, atenuaram o estresse oxidativo na pata de camundongos tratados com CFA.

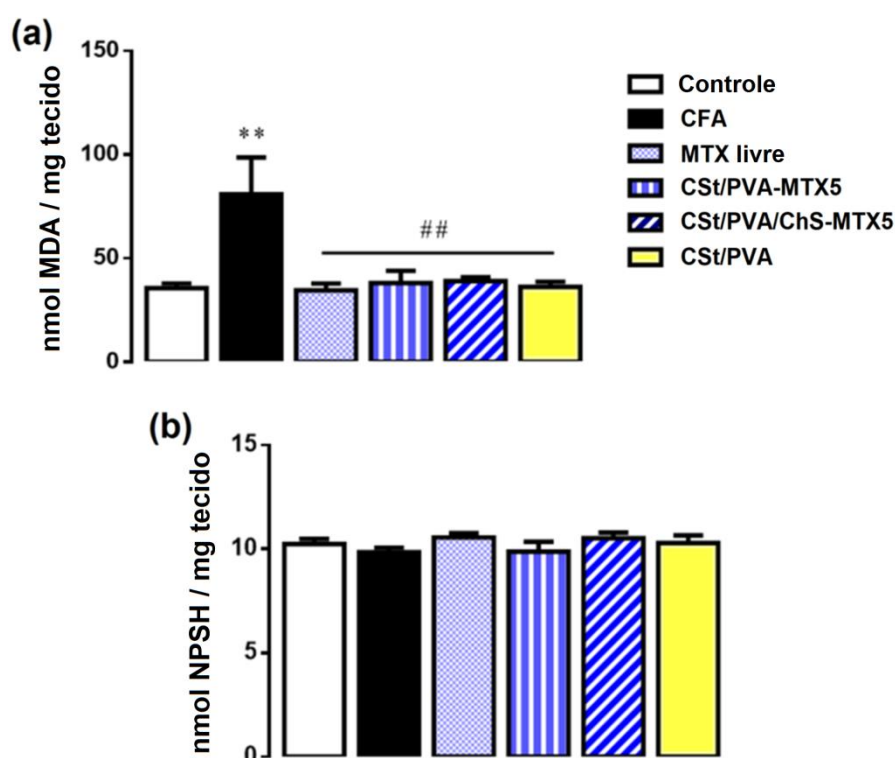


Figura 14. Efeito do MTX livre e dos filmes CSt/PVA-MTX5, CSt/PVA-ChS-MTX5 e CSt-PVA em biomarcadores de estresse oxidativo, incluindo (a) TBARS e (b) níveis de NPSH no tecido da pata de artrite induzida por CFA em camundongos. Cada coluna representa a média $\pm$ S.E.M. de 7 camundongos em cada grupo. O asterisco denota níveis de significância quando comparado ao grupo controle: (**) $p < 0,01$; hashtag

denota níveis de significância quando comparados com o grupo CFA: (##) $p < 0,01$ (ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey).

A enzima MPO catalisa a reação entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o cloreto, levando a geração do ácido hipocloroso (HClO). Em altas concentrações, está forte espécie de oxidação e cloração, ataca rapidamente as moléculas lipídicas presentes na membrana plasmática das células, incluindo ácidos graxos poli-insaturados, fosfolipídios e colesterol, para desencadear a peroxidação lipídica (Panassenko, 1997). Além disso, um aumento na atividade de MPO, pode estar relacionado a um aumento nos níveis de TBARS, um índice de peroxidação lipídica (Jelkmann *et al.*, 2019). Com base nisso, os resultados obtidos reforçam a hipótese de que a atividade enzimática aumentada da MPO na AR poderia causar danos às moléculas lipídicas, conforme evidenciado pelo aumento dos níveis de TBARS, na lesão local. Um distúrbio nas atividades da MPO está relacionado na produção de radicais livres e citocinas pró-inflamatórias, o que sugere que essa enzima contribui para a patogênese da AR. Por outro lado, o tratamento em um intervalo curto com MTX (carregado ou não) diminuiu a infiltração de neutrófilos e a resposta inflamatória, evidenciada pela redução da atividade de MPO e do volume da pata dos camundongos tratados com CFA. Consequentemente, o MTX reduz os níveis de TBARS que podem levar a uma diminuição na oxidação dos lipídios das membranas dos condrócitos e fibrócitos (Mongia *et al.*, 1996). Além disso, o MTX reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica em camundongos expostos ao CFA, por meio da modulação de parâmetros bioquímicos.

Embora o MTX seja considerado um agente de primeira linha para o tratamento da AR, esse fármaco administrado por via oral exibiu uma absorção intestinal variável e um baixo perfil farmacocinético, que interfere diretamente na biodisponibilidade do medicamento, meia-vida plasmática e eficácia clínica (Wang *et al.*, 2017). As formulações orais estão associadas à efeitos adversos ao sistema gastrointestinal como, por exemplo, náuseas, diarreia, dor abdominal, ulceração da mucosa e estomatite (Prasad and Koul, 2012). Nesse contexto, o encapsulamento do MTX em SLFT surge como uma alternativa atraente e eficiente, por evitar o trato gastrointestinal e a farmacocinética não linear que, por sua vez, reduz os efeitos adversos relacionados à administração do MTX por via oral (Prasad and Koul, 2012).

Estudos anteriores, relatam que hidrogéis usados como veículos de transporte transdérmico do MTX, demonstram a mesma ou melhor eficácia do fármaco, quando comparados ao comportamento do MTX livre em modelos animais induzidos a AR (Qindeel *et al.*, 2020). Com isso, o atual estudo sugere que os filmes de CSt/PVA ou CSt/PVA/ChS podem ser usados como veículos de transporte transdérmico do fármaco MTX, visto que, os resultados descritos aqui demonstram que o fármaco consegue romper a barreira cutânea e chegar até o tecido inflamado no modelo de artrite induzido pelo CFA. Portanto, a aplicação dos filmes baseados em CSt/PVA carregados com MTX na pele dorsal dos animais nos dias 15, 18 e 21 do protocolo experimental foi tão eficaz quanto o fármaco MTX livre, na modulação de alguns sinais característicos da artrite induzida por CFA em camundongos, incluindo a resposta inflamatória, estresse oxidativo e comportamento nociceptivos.

5. Conclusão

Neste capítulo foi possível demonstrar a eficiência do protocolo experimental escolhido para a síntese do CSt, o qual permitiu obter um derivado catiônico com um DS médio de 0,7. A associação do derivado com PVA possibilitou o preparo de filmes relativamente homogêneos, mecanicamente estáveis e com bom manuseio. Usando o método de *casting*, o qual é relativamente simples, uma série de filmes foram preparados com diferentes quantidades de MTX (1 e 5 m/m-%) e com ChS (5 m/m-%). Ensaios de caracterização iniciais revelaram que as amostras de filme preparadas com maior teor de MTX, exibiram uma melhor distribuição do fármaco na matriz polimérica, porém com uma menor eficiência de encapsulação. Apesar disso, os filmes contendo 5 m/m-% do fármaco MTX, foram usados para realizar as análises de caracterização e os testes *in vitro* e *in vivo*, visto que, uma maior homogeneidade apresentará uma maior confiabilidade perante a quantidade que cada amostra terá de fármaco despesa na matriz polimérica.

Testes *in vitro* demonstraram que as amostras de filme permitiram a penetração do MTX carregado na pele, validando assim a empregabilidades dos filmes como SLTF. As análises de caracterização (FTIR, DRX e TGA/DTG) confirmaram a interação entre os polímeros, a qual ocorre preferencialmente por ligações de hidrogênio. Estas análises também confirmaram a presença do MTX nas matrizes

poliméricas. No entanto, há uma interação mínima entre o fármaco e a matriz polimérica; entretanto, essa interação é suficiente para evitar a recristalização do MTX após a incorporação. Estudos *in vivo*, usando um modelo de artrite induzida por CFA em camundongos mostraram que os filmes CSt/PVA carregados com 5 m/m-% de MTX, aplicados topicamente exibiram desempenho comparável ao fármaco livre (controle positivo), que foi administrado por via oral. Conforme avaliado, os filmes carregados com MTX, exibiram efeitos antinociceptivos e antiartríticos, o que permite classificá-los como biomateriais promissores para o tratamento da AR. É importante mencionar que nas condições experimentais utilizadas neste estudo a adição de ChS na composição do filme não causou efeito perceptível nos parâmetros biológicos investigados. Estudos futuros alterando a quantidade do ChS nos filmes devem ser realizados para confirmar ou descartar os benefícios anteriormente apontados ao uso desse glicosaminoglicano. Em suma, os resultados indicam que filmes baseados em CSt/PVA podem ser usados como SLFT para o fármaco MTX, o que pode ajudar a superar problemas e efeitos adversos associados às vias de administração convencionais no tratamento e redução dos sintomas da AR.

Como perspectivas futuras, gostaríamos ainda de investigar um tratamento de longo prazo com filmes de CSt/PVA-MTX5 e CSt/PVA/ChS-MTX5 neste modelo animal de artrite para avaliar propriedades farmacológicas e toxicológicas.

CAPÍTULO IV – SÍNTESE DO DIALDEÍDO AMIDO E APLICAÇÃO NO PREPARO DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO POR IMPRESSÃO 3D

1. Introdução

Uma das modificações químicas utilizadas para a formação de novos derivados do St são as reações de oxidativas (Vanier *et al.*, 2017). A oxidação é um método de modificação química amplamente utilizado para introduzir grupos funcionais, incluindo grupos carbonila e carboxilas, na estrutura química do St e de outros polissacarídeos (Yong and Liu, 2024). Em geral, o St oxidado é preparado reagindo o St com uma quantidade específica de um agente oxidante, sob temperatura e pH controlados. Os grupos hidroxilas encontrados nas posições C2, C3 e C6 das moléculas de St, como pode ser observado no **Esquema 3**, são oxidados em grupos carbonila e/ou carboxila, alterando assim as características do St (Li *et al.*, 2020).



Esquema 3

Existem diferentes tipos de agentes oxidantes utilizados nessas reações, incluindo o persulfato de amônio, permanganatos, hipocloritos e os periodatos. Notavelmente, os mecanismos de oxidação do amido diferem de acordo com o agente oxidante utilizado no processo reacional (Vanier *et al.*, 2017; Yong and Liu, 2024). Por exemplo, os periodatos (IO_4^-) se destacam por induzirem uma oxidação seletiva, no qual ocorre a cisão do diol vicinal nos carbonos C2 e C3 das unidades *D*-glicopiranosil e oxida ainda os grupos hidroxila presentes nessas posições para então haver a formação exclusiva de grupos aldeídos, produzindo ao final do processo reacional o dialdeído amido (DAS) (Lewicka *et al.*, 2015). Paralelamente ao processo oxidativo,

ocorre a despolimerização do St, com a clivagem das ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ responsáveis pela união dos monômeros, ao mesmo tempo há formação de grupos carboxílicos (Zhang *et al.*, 2009). Essa fragmentação acompanhada da oxidação altera as propriedades físico-químicas do derivado incluindo mudanças nas propriedades térmicas, de gelatinização, reológicas, viscosidade, intumescimento e solubilidade em água (Yong and Liu, 2024).

Os derivados do St provenientes desse tipo de oxidação exibem propriedades interessantes, incluindo as atividades antioxidantes e antimicrobianas, importantes para o uso no campo biomédico e/ou farmacêutico (Yong *et al.*, 2020). Ainda, os grupos dialdeídos formados são altamente reativos e podem reagir com compostos que apresentam em sua estrutura química grupos amino, carbonilas e hidroxilas através de reações formando a base de Schiff e aldólicas, respectivamente (Falsafi *et al.*, 2023). Devido a essas propriedades de reticulação, o DAS possui potencial para o desenvolvimento de diversos tipos de materiais em diferentes campos industriais, tais como embalagens de alimentos, produção de termoplásticos, imobilização enzimática, encapsulamento e liberação de fármacos (Gao *et al.*, 2019; Yong and Liu, 2024).

Por exemplo, Aslrad *et al.*, 2022 descrevem o desenvolvimento de um biomaterial utilizando DAS para aplicação oftalmológica. Os autores produziram um hidrogel formado através da reação da formação da base de Schiff entre os grupos amina da quitosana e os grupos aldeídos do DAS, resultando em uma reticulação covalente pela formação da ligação imina. Este hidrogel foi utilizado como veículo de transporte do fármaco betametasona. Os resultados do estudo indicaram que a proporção do derivado do St na composição do hidrogel, afetou a taxa de liberação do fármaco. Mais especificamente, ao aumentar as proporções do DAS na composição do hidrogel influenciou a difusão e a taxa de liberação da betametasona, durante o tratamento oftalmológico.

Pensando neste tipo de reatividade entre os grupos aldeído do DAS e grupos amino e na característica dos materiais obtidos, um composto que pode ser utilizado para a obtenção de reticulações, que podem ajustar essa taxa de liberação de fármacos carregados é a gelatina (Gel). Obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno, a Gel é uma proteína amplamente empregada na formação de biomateriais cutâneos graças às suas propriedades atrativas, incluindo a biocompatibilidade,

biodegradabilidade e não ser imunogênico (Ahmady and Abu Samah, 2021). No entanto, sua aplicação é tipicamente limitada, devido a cisão das ligações de hidrogênio em temperaturas elevadas (acima de 35 °C) (Dash *et al.*, 2013). Por exemplo, materiais produzidos a base de Gel destinados a proliferação celular precisam ser submetidos a processos de esterilização, o que normalmente é realizado em temperaturas elevadas. Uma estratégia para superar essas limitações é a mistura da Gel com DAS, seguida de uma reticulação formando a base de Schiff, permite a geração de materiais com maior estabilidade mecânica e térmica (Yang *et al.*, 2017).

Dentre os biomateriais que podem ser preparados a partir da reticulação entre Gel e DAS estão o SLTF, que conforme já mencionado, são um tipo de tratamento medicamentoso, não invasivo, no qual os fármacos são administrados de forma transdérmica, onde realizam o processo de difusão através das camadas da pele até a corrente sanguínea, onde ativam a resposta terapêutica (Kim *et al.*, 2018). Normalmente, SLTF são biomateriais poliméricos, fabricados por diferentes técnicas que dentre seu nicho de aplicação podem ser utilizados no tratamento de doenças dérmicas, as quais incluem os eczemas, a psoríase e a dermatite atópica (DA) (Shukla *et al.*, 2023). As propriedades dos polímeros que compõem os biomateriais aplicados como SLTF, aliadas ao método de fabricação, contribuem para o desenvolvimento de materiais com as características adequadas para serem utilizados no tratamento desse tipo de doença. Através da seleção adequada de polímero e técnicas de fabricação é possível, por exemplo, modular propriedades como a biocompatibilidade, barreira à microrganismos, permeação gasosa e de remoção do excesso de exsudato (Borbolla-Jiménez *et al.*, 2023). Dentre os métodos empregados para a fabricação desses biomateriais, encontram-se o *casting* e a impressão 3D, no qual, são obtidos filme e hidrogéis impressos, respectivamente (Economidou *et al.*, 2018; Sivasankarapillai *et al.*, 2021).

O método de *casting* é o mais comumente utilizado para a fabricação de filmes para serem usados como curativos, durante o processo de cicatrização de feridas. Esse método envolve a solubilização de um polímero em um solvente (água, etanol, acetato, hexano) e, a solução resultante é depositada em um molde, no qual, há formação de filmes pela evaporação do solvente (Deng *et al.*, 2018). Apesar desse método ser eficiente quanto a produção de filmes com alta flexibilidade, com permeação gasosa ao mesmo tempo que penetração de microrganismos, a fabricação

desse tipo de filmes poros regulares para ocorra uma permeabilização adequada para o processo de cicatrização, não é facilmente obtida por esse método (Borbolla-Jiménez *et al.*, 2023). Já os métodos de impressão 3D (3DP) se destacam por garantir a porosidade do biomaterial ao ajustar as porcentagens de preenchimento, ao mesmo tempo em que o material é impresso com geometrias arbitrária (Naseri and Ahmadi, 2022). Basicamente, a 3DP envolve três etapas: o fatiamento do projeto desenvolvido no software adequado, após isso, o software permite o armazenamento do formulário de saída com uma linguagem e no formato digital de tesselação de superfície (STL) e por último o projeto é impresso usando uma impressora adequada, em uma plataforma adequada com o objetivo de fabricar um material com geometria, espessura e com tamanhos de poros adequado para cada tipo de tratamento. Apesar dos estudos relatados na literatura, terem demonstrado a alta eficiência dessa tecnologia em SLTF, os biomateriais fabricados a partir dessa tecnologia, ainda são pouco explorados, pois normalmente os biomateriais fabricados para esses sistemas possuem em sua estrutura microagulhas (BG *et al.*, 2023). No entanto, ainda restam alguns desafios incluindo o método de fabricação, disponibilidade de polímero/materiais adequados, e como consequência, a formação do biomaterial com alta resolução (Parhi, 2023).

Por esse motivo, novas estratégias estão sendo desenvolvidas para a fabricação de biomateriais, usando a 3DP, para que possam ser utilizados nos SLTF. Um deles foi descrito por Chaudhari *et al.*, 2021, no qual, fabricaram um adesivo por meio da técnica de extrusão de filamentos contendo carregado em poli(vinil pirrolidona) (PVP) a quercetina, um fármaco anti-inflamatório e antioxidante usado no tratamento de doenças como a tuberculose. Ainda, os autores realizaram estudos *in vivo*, onde conseguiram observar a redução de flutuações nas concentrações plasmáticas após 18 dias contínuos de protocolo terapêutico. Azizoğlu and Özer, 2020, fabricaram filamentos adesivos sob uma embalagem os quais foram formados pelo processo de extrusão de soluções formadas por blendas de PVP, polietilenoglicol e poli(óxido de etileno), usando temperaturas de 70 °C, para encapsular o montelucaste de sódio. Os autores relatam em seu trabalho, que foi possível obter um material com filamentos de forma semelhante as tintas comerciais de PLA, podendo obter um biomaterial com camadas. Ainda, estudos *in vitro* demonstram que a liberação do fármaco ocorreu de forma contínua durante 24 h, sendo liberado 52% ao

meio. Já Maurizii *et al.*, 2023, fabricaram bioadesivos transdérmicos, a partir da copolimerização do etileno acetato de vinila (EVA) para testar a liberação de dois diferentes fármacos, ibuprofeno e diclofenaco de sódio. Nesse trabalho, os autores realizaram a fabricação do bioadesivo usando a técnica de extrusão direta de pó, onde o processo de extrusão é realizado com altas temperaturas a fim de realizar o processo de fusão dos compostos. Devido a compatibilidade entre o polímero e os fármacos, foi possível obter um biomaterial com uma boa estabilidade térmica do material e morfológica dos materiais extrudados.

Nesse contexto, o estudo apresentado nesse capítulo propõe o preparo de SLTF empregando a técnica 3DP por extrusão e utilizando tintas preparadas com Gel quimicamente reticulada com DAS como alternativa aos filmes obtidos por de forma convencional por *casting*. Para demonstrar a eficiência e aplicabilidade dos materiais preparados como SLTF, o fármaco hidrocortisona (HC) foi selecionado para encapsulamento e posterior liberação. A escolha do fármaco se deu considerando uma potencial aplicação desses materiais no tratamento e atenuação de sintomas de dermatite atópica (DA). DA é uma doença de pele inflamatória crônica, na qual, os pacientes apresentam prurido intenso e lesões eczematosas recorrentes. Essa doença é reconhecida como uma condição vitalícia com várias manifestações e expressões clínicas, nas quais defeitos da barreira epidérmica desempenham papéis centrais (Weidinger and Novak, 2016). Atualmente, os tratamentos da DA concentram-se na restauração da função da barreira epidérmica, com terapias de primeira linha, incluindo corticoides tópicos que são usados como agentes anti-inflamatórios e antipruriginosos, em crises agudas. Dentre a classe dos corticoides, a HC é bastante empregada para reduzir os sintomas de dermatose devido as suas excelentes propriedades farmacológicas. Apesar do seu uso ser eficiente para os diferentes sintomas que a DA apresenta, a HC é hidrofóbica e sua aplicação pode prejudicada, principalmente em lesões exsudativas (Chuah *et al.*, 2023). Além disso, a administração prolongada de HC pode levar a alguns riscos de efeito sistêmico, acarretando sintomas como cansaço, tontura e ao escurecimento e manchas da pele (Kolbe *et al.*, 2001). Como alternativa, biomateriais poliméricos têm sido testados como sistemas de liberação controlada de HC, para atenuar as limitações associadas desse fármaco no tratamento da DA (Chuah *et al.*, 2023; Hemrajani *et al.*, 2022; Siddique *et al.*, 2019). Ainda, espera-se que a fabricação de biomateriais impressos

utilizando Gel/DAS, ampliem o leque dos materiais utilizados nos SLTF, demonstrando a sua eficiência na encapsulação e liberação do fármaco, HC.

2. Experimental

2.1. Materiais

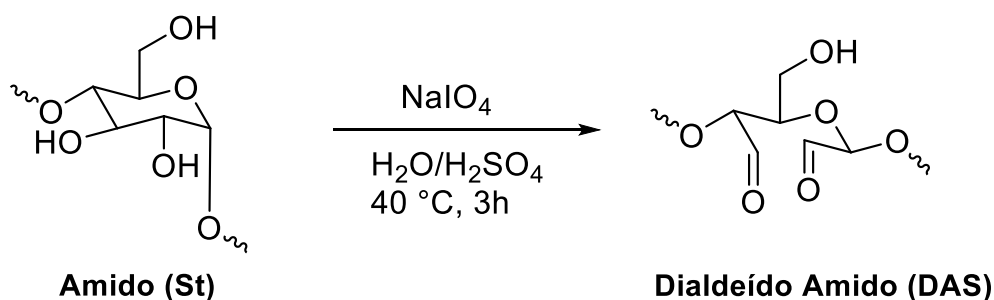
Amido de arroz (St), com 6% de amilose determinada por Colussi *et al.*, 2014 foi gentilmente cedido pelo LabGrãos/UFPel (Pelotas, Brasil). Gelatina (Gel, tipo B de pele bovino) foi adquirida da Sigma-Aldrich (EUA). Periodato de sódio (NaIO_4), hidróxido de sódio (NaOH) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram adquiridos da LabSynth (Brasil). Hidrocortisona (HC, pureza > 98%) foi obtida da Gemini (Brasil), e um creme HC tópico comercial (1 p/p%, Bayer®) foi adquirido em uma farmácia local (Pelotas, Brasil). Etanol (P.A.) e ácido clorídrico (HCl) foram comprados da Synth (Brasil). Metanol foi adquirido da Dinâmica (Brasil). Acetonitrila (grau HPLC) foi adquirida da LiCHrosolv (Darmstadt, Alemanha). Trietanolamina foi comprada da Vetec (Brasil). O hidrogel Carbopol Ultrex® foi adquirido da Galena (Brasil). Todos os outros reagentes e solventes eram de grau analítico e usados como recebidos sem uma purificação adicional.

2.2. Animais

Camundongos BALB/c fêmeas (6-8 semanas de idade) foram utilizados nos experimentos. Eles foram alojados em uma sala designada para animais, sob um ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 6h), a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com acesso ad libitum a comida e água. Os ensaios biológicos aderiram às diretrizes institucionais e nacionais de cuidados com animais. A aprovação do estudo experimental foi obtida junto à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pelotas (CEUA 041709/2022-37), e todas as medidas necessárias foram implementadas para amenizar qualquer potencial sofrimento vivenciado pelos animais.

2.3. Síntese do dialdeído amido (DAS)

O derivado DAS foi sintetizado utilizando o procedimento reportado por Zhao *et al.*, 2023 com algumas alterações (**Esquema 4**). Em um frasco reacional de 100 mL foram adicionados 1010 mg de St em 20 mL de água destilada. A suspensão resultante foi mantida sob agitação magnética durante 1 h a 40 °C. Logo após esse intervalo, 900 mg NaIO₄ foram adicionados ao sistema (razão mássica St/NaIO₄ de 1,12:1) o qual permaneceu sob agitação por mais 1 h. Em seguida, 10 gotas de H₂SO₄ (1,0 mol L⁻¹) foram adicionadas à solução, a qual foi agitada por mais 1 h. Após o término da reação, o produto DAS foi recuperado por precipitação em etanol e filtração a vácuo. O sólido resultante foi lavado abundantemente com uma mistura de acetato de etila/hexano (razão 1:1 v/v) para remoção completa do agente oxidante que não reagiu com o St. Por fim, o produto obtido foi seco em estufa a 40 °C por 24 h.



Esquema 4

O teor de grupos aldeídos do DAS foi determinado de acordo com o método proposto por Zuo *et al.*, 2017. DAS (200 mg) foi dissolvido em 10 mL de uma solução NaOH (0,25 mol L⁻¹), a qual foi aquecida à 70 °C brevemente e, então, arrefecida à temperatura ambiente. Após, 15 mL de uma solução H₂SO₄ (0,125 mol L⁻¹) foram adicionados à solução anterior, a qual foi agitada até que houvesse mudança de coloração de marrom para amarelo pálido. A solução foi purificada utilizando carvão ativado (200 mg), filtrada à vácuo e titulada com uma solução padrão de NaOH (0,1 mol L⁻¹). Fenolftaleína foi utilizada como indicador. Após a titulação, o teor de grupos aldeído no DAS sintetizado foi calculado utilizando a equação abaixo:

$$\text{Grupos aldeído (\%)} = \left(\frac{(C_1V_1 + C_2V_2) - [2 \times (C_3V_3)] \times 161}{m \times 1000} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde C_1 é concentração da solução de NaOH ($0,25 \text{ mol L}^{-1}$), V_1 é o volume total da solução de DAS (10 mL), C_2 e V_2 são a concentração da solução padrão de NaOH utilizada na titulação ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e o volume gasto dessa solução na titulação. C_3 e V_3 são a concentração da solução de H_2SO_4 ($0,125 \text{ mol L}^{-1}$) e o seu volume (15 mL), enquanto m é a massa de DAS utilizada e 161 é a massa média relativa à unidade sacarídica do DAS (Zuo *et al.*, 2017). A determinação do teor de grupos aldeído foi realizada em triplicada e o valor médio obtido para o DAS sintetizado foi de 77%. Esse resultado é comparável com outros estudos que utilizaram um procedimento semelhante para a síntese de DAS (FIEDOROWICZ and PARA, 2006).

2.4. Preparo das tintas para impressão do material Gel/DAS e Gel/DAS@HC

Num frasco reacional de 10 mL com tampa foram solubilizados 50 mg de DAS em 5 mL de água destilada utilizando agitação magnética. O sistema foi aquecido à 100°C e permaneceu nessa condição por 3 h. Após a obtenção de uma solução homogênea, o sistema foi arrefecido até 40°C e, então, 450 mg de Gel foram adicionados. A razão mássica Gel/DAS utilizada foi estabelecida a partir de estudos prévios de otimização. A solução Gel/DAS foi mantida a 40°C sob agitação magnética por 1 h, sendo posteriormente gotejada na mesma 500 μL de uma solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. A tinta resultante foi adicionada em uma seringa de 5 mL para ser realizado a impressão 3D.

Em paralelo, as tintas Gel/DAS contendo HC disperso na matriz polimérica (denotado como Gel/DAS-HC 3D) foram preparados usando um protocolo semelhante, mas com pequenas modificações. Após a homogeneidade da solução Gel/DAS, 1474 mg de HC ao frasco reacional, permanecendo sob agitação branda (100 rpm) por 3 h. Por fim, a solução foi gotejada com 0,5 mL de uma solução de NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), que foi posteriormente adicionado em uma seringa de 5 mL para impressão 3D.

2.5. Impressão dos materiais 3D-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS@HC

Inicialmente, o projeto do material foi criado utilizando o software Slic3r, o que possibilitou a criação da estrutura em camadas para a impressão 3D. Após essa etapa, o desenho foi convertido para um formato g.code onde foi conduzida o processo de impressão pelo software Prontface, conforme mostrado na **Figura 15**.

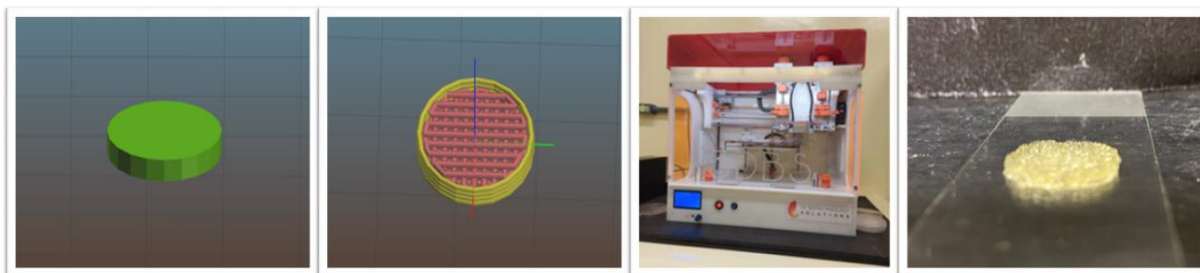


Figura 15. Etapas envolvidas no processo de bioimpressão 3D.

Após o preparo das tintas, as mesmas foram depositadas em seringas de impressão de 5 mL e extrusadas a 35 °C através de uma agulha cônica 22G (0,41 mm de diâmetro interno) a uma taxa de alimentação de 3 mm/s e velocidade de deposição de 140% em relação ao projeto. De modo preliminar, capacidade de printabilidade e fidelidade na formação de filamentos cilíndricos após o processo de impressão das tintas preparadas foi avaliada de forma qualitativa (Schwab *et al.*, 2020). Também foi avaliada a habilidade do material impresso ser empilhado em camadas sucessivas para formar estruturas coesas, onde a primeira camada desempenha um papel crucial, exigindo fidelidade de forma e estabilidade (Paxton *et al.*, 2017).

Na sequência da etapa de otimização do processo de impressão, os materiais foram fabricados em formato cilíndrico, com 4 camadas, medindo 14,97 mm de diâmetro e 2,12 mm de altura. Essas impressões foram realizadas em um padrão hachurado de 90°, utilizando uma impressora 3D GENESIS (3DBS, Brasil). Imediatamente após a impressão, os materiais foram congelados a -20 °C em um freezer e liofilizados por 24 h à -55 °C (Liofilizador LS 3000 B, TERRONI, Brasil). Após a impressão, os hidrogéis sem HC (denotados como 3D-Gel/DAS) e com HC (3D-Gel/DAS@HC) foram liofilizados e depois armazenados à temperatura ambiente para posterior caracterização e aplicação.

2.6. Preparo dos filmes F-Gel/DAS e F-Gel/DAS@HC por *casting*

Num frasco reacional de 10 mL com tampa foram solubilizados 50 mg de DAS em 5 mL de água destilada utilizando agitação magnética. O sistema foi aquecido à 100 °C e permaneceu nessa condição por 3 h. Após a obtenção de uma solução homogênea, o sistema foi arrefecido até 40 °C e, então, 450 mg de Gel foram adicionados. A razão mássica Gel/DAS utilizada foi estabelecida a partir de estudos prévios de otimização. A solução Gel/DAS foi mantida a 40 °C sob agitação magnética por 1 h, sendo posteriormente gotejada na mesma 500 µL de uma solução 1,0 mol L⁻¹ de NaOH. A solução resultante foi vertida em uma placa de Petri, a qual foi mantida à temperatura ambiente até a completa evaporação do solvente. Esse filme foi denotado como F-Gel/DAS, respectivamente.

Em paralelo, os filmes Gel/DAS contendo HC disperso na matriz polimérica (denotado como F-Gel/DAS@HC) foram preparados usando um protocolo semelhante, mas com pequenas modificações. Após a homogeneização da solução Gel/DAS, 74 mg de HC foram adicionados à mesma (14,8% com relação à massa total de Gel + DAS) sob agitação branda. A solução contendo o fármaco foi vertida em uma placa de Petri, mantida à temperatura ambiente para evaporação do solvente. Aqui é importante ressaltar que a quantidade de HC difere daquela utilizada no preparo da tinta para a impressão do hidrogel 3D- Gel/DAS@HC pois houve um ajuste a fim de garantir que a mesma massa de fármaco (5 mg) estive presente nas amostras testadas nos ensaios *in vivo* (gel e filme). Para isso aspectos como peso e área das amostras de filme e dos hidrogéis foram considerados.

2.7. Técnicas de caracterização

O derivado DAS, os materiais precursores, os filmes preparados por casting e os hidrogéis impressos foram caracterizados por diferentes técnicas. As análises de FTIR e TGA foram realizadas utilizando protocolos semelhantes aos descritos nas seções 3.1. e 3.3. do capítulo anterior. As análises adicionais de caracterização são descritas na sequência.

2.7.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN de ^1H) foram obtidos a 400 MHz utilizando um espectrômetro Bruker DPX 400 (Austrália). Para aquisição dos espectros D_2O e DMSO-d_6 foram utilizados como solventes deuterados. Os deslocamentos químicos são reportados em ppm e o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência interna.

2.7.2. Análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Análises de MEV foram realizadas no CEME-Sul da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). As imagens das superfícies das amostras de filmes e hidrogéis preparados foram com auxílio de um microscópio da marca JEOL, modelo JSM - 6610LV (EUA) utilizando uma aceleração potencial de 15 kV diferentes magnificações. A porção superficial de cada amostra foi previamente recoberta com uma fina camada de Au em um metalizador da marca DentonVacuum, modelo Desky (EUA) antes da obtenção das imagens.

2.7.3. Grau de Intumescimento

A capacidade de intumescimento dos filmes e dos hidrogéis impressos foram avaliadas utilizando PBS (pH 7,4). Para isso as amostras secas, contendo aproximadamente 45 e 50 mg para os materiais preparados por casting e impressos, respectivamente, foram colocadas individualmente em béqueres contendo 30 mL de PBS e incubadas a 37 °C por até 90 min. Em tempos pré-estabelecidos, tanto os filmes quanto os hidrogéis impressos foram retirados da solução, o excesso de líquido na superfície dos mesmos foi removido cuidadosamente e o massa de cada amostra foi registrada utilizando uma balança analítica. O procedimento experimental foi realizado em triplicata para cada amostra. O grau de intumescimento após cada intervalo de tempo foi calculado utilizando a **Equação 3**:

$$\text{Grau de intumescimento (\%)} = \frac{m_w - m_d}{m_d} \times 100 \quad (3)$$

onde, m_d é a massa da amostra seca e m_w a massa da amostra intumescida em um intervalo de tempo t .

2.7.4. Teste de liberação *in vitro* do HC

O perfil de liberação de HC carregado no filme F-Gel/DAS@HC e no hidrogel 3D-Gel foi investigado utilizando uma célula de Franz, a fim de mimetizar o processo de liberação transdérmica (B. Sánchez *et al.*, 2019). Resumidamente, amostras do filme (44,1 mg carregados com 0,5 mg de HC) e do hidrogel impresso (22,2 mg carregados com 0,5 mg de HC) foram colocadas diretamente sobre membranas de diálise de celulose regenerada (MWCO 12–14 kDa, Spectra/Por®, EUA) com uma área de liberação efetiva de aproximadamente 1,5 cm². O frasco acceptor foi preenchido com PBS (25 mL, pH 7,4) e a temperatura foi mantida em aproximadamente 37 °C. Alíquotas (1 mL) foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados e analisadas usando um espectrômetro UV-Visível Micronal BS82 (Brasil) a um comprimento de onda de 248 nm (o máximo de absorção de HC em meio aquoso) (Lau *et al.*, 2013). Simultaneamente, um volume equivalente (1 mL) de PBS foi repostado ao sistema. Os dados de absorbância foram convertidos em concentração usando uma curva de calibração ($ABS = 0,003 + 0,005[HC]$, $R^2 > 0,999$) que foi construído usando concentrações padrão de HC em PBS (pH 7,4). Cada experimento foi realizado em triplicata.

2.8. Estudos *in vivo*

Os estudos *in vivo* descritos abaixo foram realizados em parceria com o LaFarBio da UFPel.

2.8.1. Modelo de dermatite atópica induzida por dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos

As lesões cutâneas comumente observadas na DA foram induzidas nos animais de acordo com o protocolo experimental descrito por Chan *et al.*, 2013. Para isso, a região dorsal de cada animal foi raspada e, durante a fase inicial de sensibilização, foram aplicados 200 µL de dinitroclorobenzeno (DNCB, 0,5% v/v) em

acetona/azeite 3:1 (v/v) nos dias 1 a 3 do protocolo experimental. Posteriormente, nos dias 14, 17, 20, 23, 26 e 29, os animais foram sensibilizados com 200 μ L de DNCB (1% v/v) na região dorsal e 20 μ L na orelha direita, conforme mostrado na **Figura 16**. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em sete grupos experimentais, contendo 7 animais por grupo, conforme descrito na **Tabela 5**.

Tabela 5. Grupo de animais utilizados no design do experimento. Grupo de animais utilizados no design do experimento.

Grupo	Descrição
1	Grupo controle
2	DNCB/sem tratamento
3	DNCB + HC
4	DNCB + F-Gel/DAS
5	DNCB + F-Gel/DAS@HC
6	DNCB + 3D-Gel/DAS
7	DNCB + 3D-Gel/DAS@HC

Os filmes e os hidrogéis forma fixados na região dorsal dos animais com o auxílio de uma fita micropore, a partir do 14º dia do protocolo experimental. Nos dias 14, 17, 20, 23, 26 e 29 (dias de aplicação de DNCB na região dorsal), os curativos contendo os materiais foram trocados.

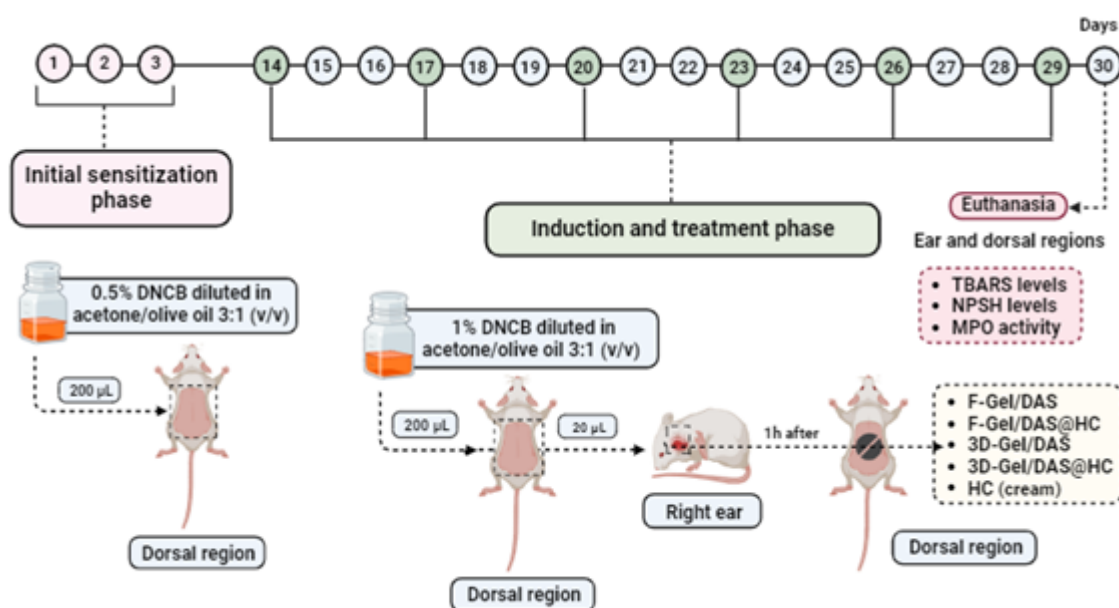


Figura 16. Resumo do protocolo experimental empregado na indução de lesões cutâneas semelhantes à DA em camundongos sensibilizados com DNCB.

2.8.2. Escores clínicos de gravidade da pele

A avaliação das lesões nas amostras da pele dorsal e os escores de severidade foram avaliados através das análises de fotografias registradas no último dia de experimento. Foram avaliados cinco sinais de lesão cutânea: prurido/coceira, eritema/hemorragia, edema, escoriação/erosão e descamação/ressecamento. Cada um desses sintomas foi classificado da seguinte forma: 0 (sem sintomas), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (grave), de acordo com Park, 2014.

2.8.3. Estudos dos parâmetros inflamatórios

Após o término do protocolo experimental, todos os animais passaram pelo teste comportamental de coçar e, foram eutanasiados para haver a obtenção das estimativas dos parâmetros inflamatórios, incluindo a espessura da orelha, parâmetros oxidantes: níveis MPO, TBARS e de NPSH. As análises de MPO, TBARS e NPSH foram realizadas utilizando o mesmo protocolo descrito na seção 3.7.4.2. e 3.7.4.3. do capítulo anterior, respectivamente. Além dessas características técnicas de caracterização, outros parâmetros como índice do baço, espessura da orelha e o

preparo dos materiais para avaliar os parâmetros oxidantes que foram realizados e estão detalhados a seguir.

2.8.3.1. Espessura da orelha

Após a avaliação do comportamento de coçar (30º dia), a espessura da orelha direita (porção centra do lóbulo) foi avaliada. Ambas as orelhas foram cortadas na base e pesadas em balança analítica. O inchaço da orelha foi quantificado comparando o peso da orelha sensibilizada com DNCB (direita) com o da orelha controle (esquerda). Os resultados são relatados em miligramas.

2.8.3.2. Parâmetros oxidativos

A pele dorsal e a orelha direita foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ em pH 7,4 (1:10 p/v) para determinação dos parâmetros de estresse oxidativo. O material homogêneo foi centrifugado a 900 xg por 10 min e o sobrenadante (S₁) foi coletado para determinação dos níveis de espécies reativas ao TBARS e NPSH.

2.9. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. Os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no software GraphPad® (EUA). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (S.E.M.). O teste *Post Hoc* foi realizado apenas quando o valor *F* atingiu o nível necessário de significância estatística ($p < 0,05$) e quando os dados foram considerados homogêneos.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização do dialdeído amido (DAS)

Um dos parâmetros relevantes da presente proposta encontra-se no teor de grupos aldeídos formados nas unidades de glicose presentes no St, os quais influenciam diretamente as propriedades físico-químicas da tinta produzida e no material impresso. No presente estudo, foi possível obter um DAS com um grau de substituição de 77% após a reação de oxidação do St. Esse alto teor de grupos aldeídos está intimamente relacionado a quantidade de agente oxidante utilizado durante o processo de oxidação do St (Ziegler-Borowska *et al.*, 2018). Ainda, o St utilizado para a obtenção do derivado DAS, possui baixo teor de amilose e isso favorece o processo de modificação do amido, devido a facilidade com que o agente oxidante se encontra de acessar as duplas hélices da amilopectina (Vanier *et al.*, 2017).

Após a síntese do DAS, sua estrutura e a natureza química caracterizada pela técnica de FTIR. Os espectros para o St *in natura* e o derivado são apresentados na **Figura 17**.

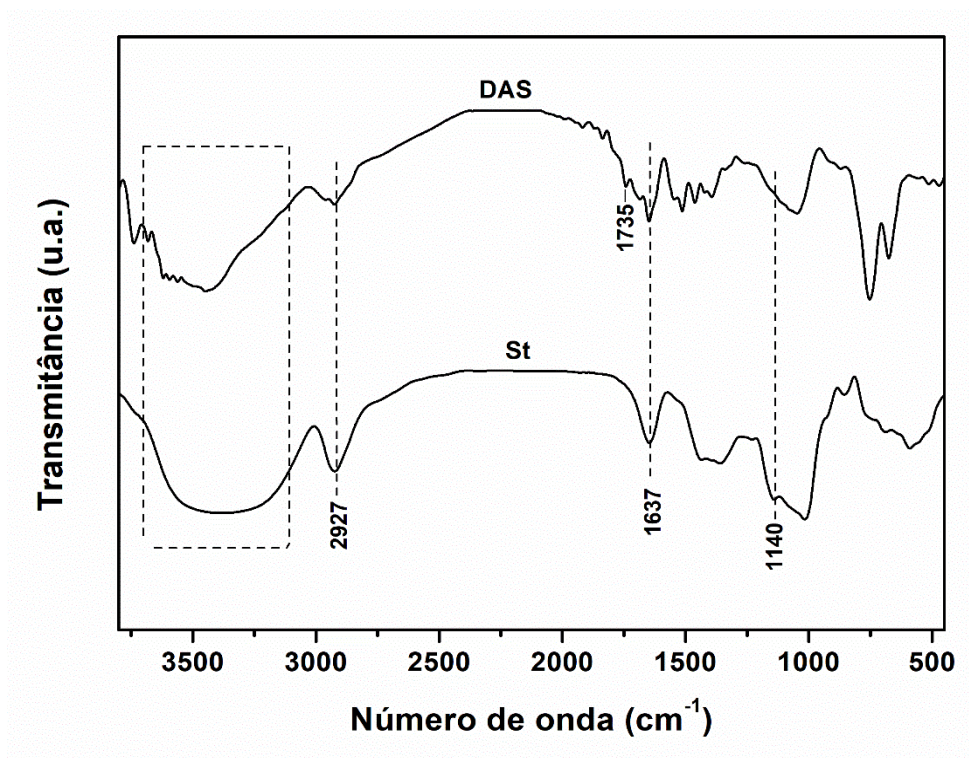


Figura 17. Espectros de FTIR obtidos para St e DAS.

Conforme observado, o espectro de FTIR do St apresentou uma banda alargada centrada próximo à 3400 cm^{-1} devido ao estiramento O-H dos grupos hidroxila e bandas em 2927 , 1140 e 1020 cm^{-1} referentes aos estiramento C-H assimétrico dos grupos CH_2 , estiramento C-O-C e estiramento da ligação C-O presente nas ligações glicosídicas e no anel piranóide do St (C. Liu *et al.*, 2023; Yong and Liu, 2024). Ainda, a banda em 1637 cm^{-1} pode ser relacionada à presença de água adsorvida na amostra. No espectro do DAS, nota-se um estreitamento da banda relacionado ao estiramento O-H, o que indica uma redução nas interações intra e intercadeias via ligações de hidrogênio provavelmente devido à redução na quantidade de grupos hidroxila após a reação de oxidação. O alargamento banda observada na região $2950\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ pode ser associada à contribuição do estiramento C-H de aldeídos e a nova banda em 1735 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=O característico dos grupos aldeídos. A presença dessa banda é utilizada para identificar a formação do derivado do DAS conforme apontado na literatura (Bajer and Burkowska-But, 2022). Ainda, pode ser observado no espectro do DAS a redução da banda em 1140 cm^{-1} que pode ser atribuída a diminuição das porções das ligações C-O e C-OH

presentes no anel glicosídico (Zhao et al., 2023). De modo geral, essas alterações com relação ao espectro do St *in natura* confirmam a síntese do derivado DAS.

Análises de RMN de ^1H também foram realizadas para caracterizar o processo de oxidação do St. Os espectros obtidos são apresentados na **Figura 18**.

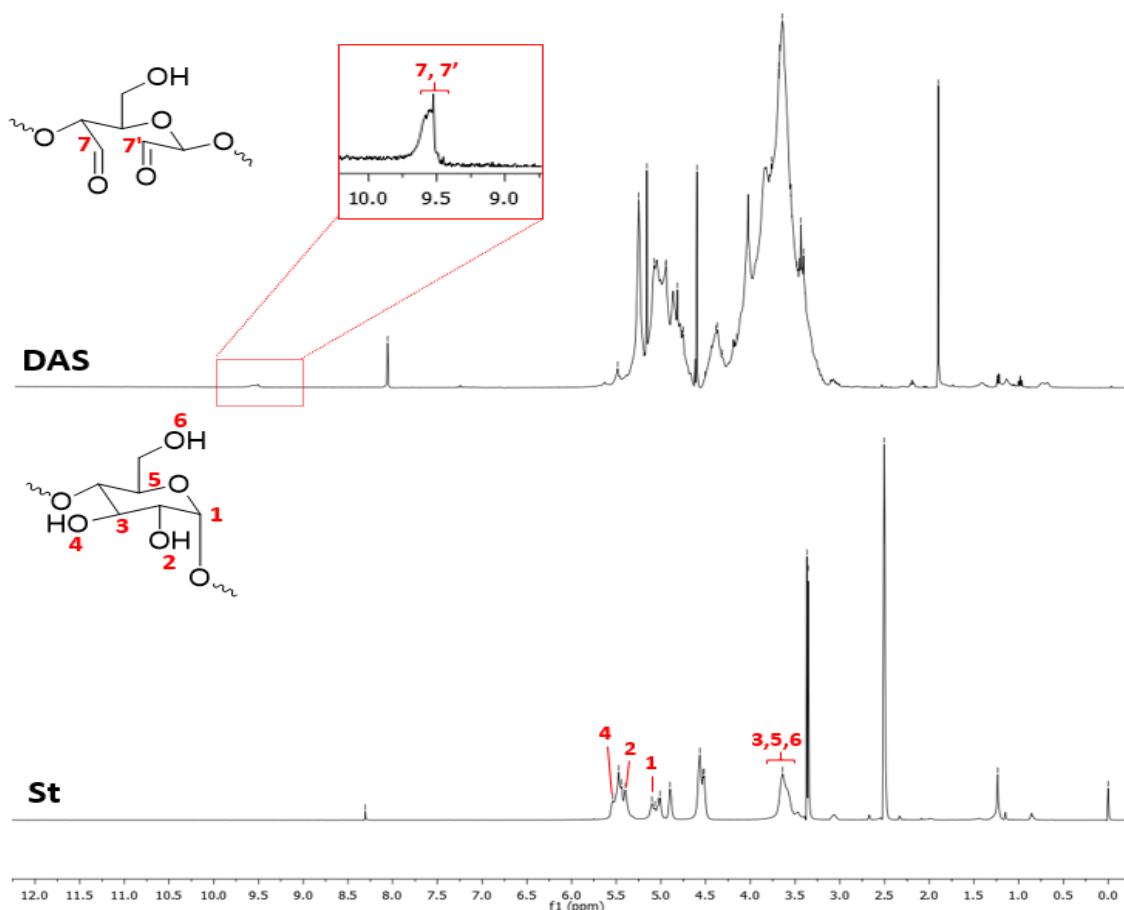


Figura 18. Espectros de RMN de ^1H do St (DMSO- d_6 como solvente) e do derivado DAS (D $_2$ O como solvente) a 400 MHz.

O espectro de RMN de ^1H do St exibiu picos de ressonância característicos das unidades glicosídicas do polissacarídeo como em 5,10 ppm (H1), 3,41 ppm (H2), 5,65 ppm (H3), 5,51 ppm (H4), 3,58 ppm (H5) e 3,6 ppm (H6) que estão em acordo com estudos anteriores (Wang and Xie, 2010). É importante ressaltar que o sinal próximo à 2,5 ppm é referente ao DMSO- d_6 utilizado como solvente. Já para o derivado DAS, o espectro de ^1H RMN exibiu os sinais de ressonância associados a estrutura do St e algumas alterações foram detectadas. Novos picos de ressonância na região 9,36 ppm e 9,56 ppm que são atribuídos aos prótons dos grupos aldeídos (H7 e H7'). Isso

demonstra que os grupos aldeídos no DAS foram oxidados a partir dos grupos hidroxilas que existiam nos carbonos C2-C3 das unidades glicosídicas do St (Zhao *et al.*, 2023). Embora o teor de oxidação seja alto, os anéis glicosídicos não modificados ainda estão presentes nas cadeias glicosídicas e predominam na amostra de DAS, sendo ainda detectadas nas análises apresentadas (Ziegler-Borowska *et al.*, 2018).

3.2. Otimização do processo de impressão dos hidrogéis 3D

Nesse trabalho foram fabricados filmes por *casting* e materiais impressos por 3DP, usando como base uma mistura Gel/DAS. A Gel foi selecionada para ser explorada como SLTF devido as suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os biomateriais a base dessa bioproteína conseguem realizar a absorção de quantidades relativas de exsudatos e ainda manter a maleabilidade do material, conseguindo se assemelhar ao tecido vivo e gerar um ambiente confortável ao ser utilizado em sistemas transdérmicos (Qu *et al.*, 2022). Já o DAS foi escolhido pois esse apresenta em sua estrutura química grupos funcionais que podem realizar reticulações com a estrutura química da Gel, sem haver a necessidade de um agente reticulante adicional na composição do material (Zhang *et al.*, 2019). Além disso, o processo de reticulação entre os grupos amina livres da Gel e os grupos aldeídos do DAS beneficia propriedades físicas que garantem a formação de materiais com propriedades físicas adequadas para a regulação da taxa de liberação do fármaco (Gao *et al.*, 2019).

Como uma das etapas iniciais do processo de caracterização foram realizados estudos para avaliar a concentração das soluções de Gel e DAS e da proporção mássica entre esses compostos para assegurar posteriormente a extrudabilidade do hidrogel formado, a fidelidade e reprodutibilidade no formato do filamento produzido. Todos esses aspectos são importantes considerando o processo 3DP por extrusão e compõem o parâmetro printabilidade, o qual pode ser definido qualitativamente. A seguir na **Tabela 6** estão dispostas as quantidades mássicas de Gel e DAS, a razão entre elas e a ponderação sobre a printabilidade.

Tabela 6. Composição das tintas Gel/DAS utilizadas no processo 3DP e definição da printabilidade das mesmas.

Entrada	Quantidade Gel (mg)	Quantidade DAS (mg)	Razão Gel/DAS (m/m)	Printabilidade
1	500	500	1:1	Não adequada
2	900	100	9:1	Não adequada
3	675	75	9:1	Não adequada
4	585	65	9:1	Não adequada
5	450	50	9:1	Adequada
6	495	50	10:1	Adequada

A seleção da tinta formulada com alta printabilidade desempenha um papel fundamental na impressão 3D (Smith *et al.*, 2021). Isso está relacionado diretamente com as propriedades finais do material fabricado. Tintas que apresentam boa printabilidade devem exibir características como viscosidade apropriada, capacidade de manter a forma após a deposição, aderência entre as camadas impressas e estabilidade estrutural (Naghieh and Chen, 2021). Dentre as diversas formulações testadas, detalhadas na **Tabela 6**, a tinta com a composição descrita na entrada 5 foi a única escolhida para a impressão dos materiais e para o preparo dos filmes por *casting*. Tanto o processo de extrusão como os filamentos formados a partir da tinta preparada com uma razão mássica 9:1 de Gel/DAS se mostrou adequada para a impressão dos materiais. É importante salientar que as tintas formuladas com concentrações mais elevadas de Gel/DAS, e consequentemente com maior viscosidade, exigiram uma pressão de extrusão mais elevada, aproximando-se do limite da capacidade da impressora utilizada. Após a fase de impressão, os materiais fabricados foram submetidos à liofilização para preservar sua estrutura tridimensional, enquanto a água era removida. Por outro lado, os filmes tiveram o solvente evaporado por meio da fundição em temperatura ambiente.

Ainda, é necessário destacar que foram realizadas avaliações sobre a formação de tintas com concentrações de DAS inferiores as mencionadas na entrada 6 (**Tabela 6**). No entanto, essas concentrações reduzidas de DAS não foram suficientes para gerar um hidrogel adequado para ser utilizado como uma tinta. Isso está relacionado, segundo Cui *et al.*, 2022 com a quantidade insuficiente de reticulações dinâmicas formadas pela formação do ligações imina (obtida pela reação de base de Schiff) e ligações de hidrogênio, entre a Gel e o DAS. Esse fato, evidência

a influência crítica da concentração média de DAS na formação dessa estrutura, que é fundamental para a 3DP dos hidrogéis impressos fabricados a partir da composição Gel/DAS. Além disso, formulações com concentrações mais elevadas de DAS, como na entrada 1, apresentaram alta viscosidade e isso está relacionado com a alta densidade de reticulação dinâmica entre a Gel e DAS, o que pode ter um impacto significativo na extrusão e conformação dos filamentos durante o processo de impressão.

Gillispie *et al.*, 2020 definiram o termo printabilidade como “a capacidade de um material, quando submetido a um determinado conjunto de condições de impressão, de ser impresso de forma com que resulte na obtenção de uma impressão desejável para uma determinada aplicação”. A fim de avaliar a printabilidade da tinta formulada alguns testes preliminares foram realizados, incluindo a capacidade de printabilidade e fidelidade na formação de filamentos cilíndricos realizados pelo teste de queda do filamento e a habilidade de empilhar camadas sucessivas. Como mostrado na **Figura 19** ambas as tintas foram capazes de fabricar hidrogéis impressos com uma estrutura claramente definida nas quatro camadas impressas, alta precisão de impressão e uma altura ilimitada dentro dos parâmetros testados. Além disso, os testes de queda do filamento demonstraram que ambas as tintas possuem propriedades adequadas; no entanto, a tinta com HC apresenta características de gel mais adequadas após a extrusão, produzindo um filamento mais consistente, contínuo e com uma extremidade lisa no bocal da agulha, sem a presença de pequenas dobras ao longo do filamento. Vale ressaltar que não foi possível alterar a quantidade de HC, pois essa já foi previamente calculada com base na quantidade de polímero final após a impressão do hidrogel impresso.

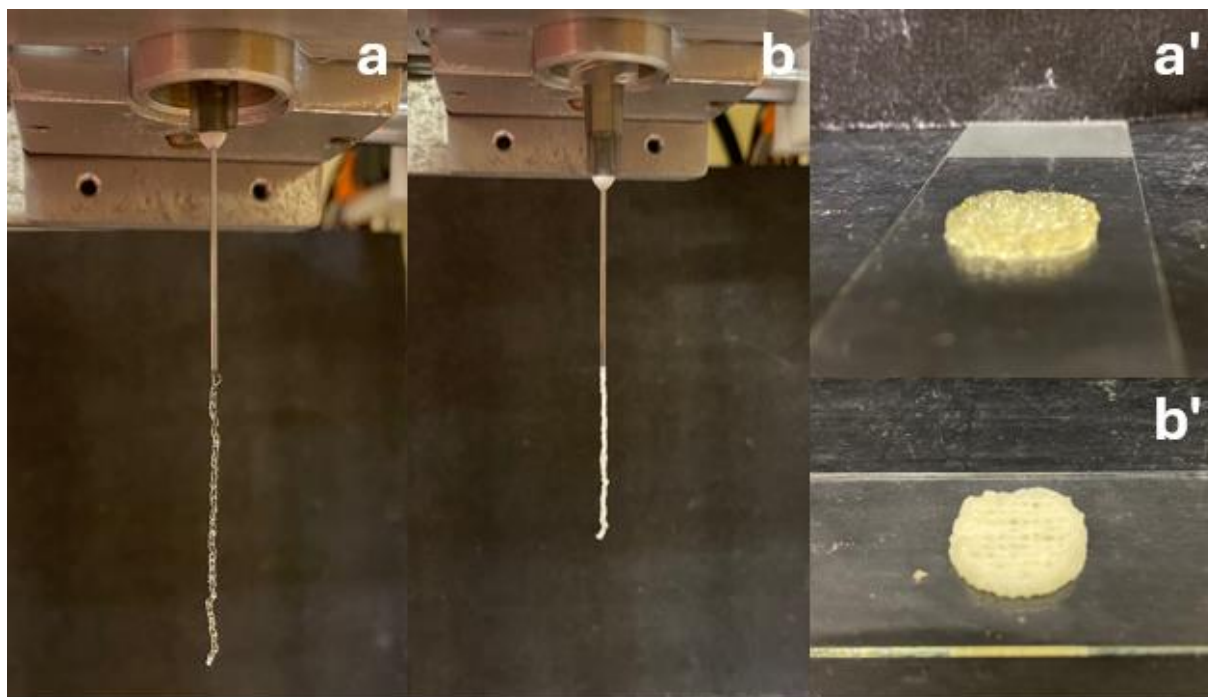


Figura 19. Imagens da avaliação da printabilidade da tinta para o teste de queda do filamento a) Gel/DAS e b) Gel/DAS@HC e habilidade de formação de camadas a') Gel/DAS e b') Gel/DAS@HC.

À medida que a concentração das soluções de Gel e DAS foram reduzidas foi observado que a tinta ficou extremamente fluida e não foi capaz de imprimir, resultando também na formação de gotículas na ponta do bocal da seringa e impedindo a formação de um filamento contínuo. Consequentemente, a formação de espaço de filamentos entre as camadas não pôde ser observada, uma vez que os filamentos se fundiam à mesa de impressão, perdendo sua estrutura e colapsando. Por outro lado, a tinta da entrada 6 foi adequada, porém ocorreu um excesso na viscosidade resultando na dificuldade de impressão da tinta.

Em processos baseados na impressão 3D, a tinta inicialmente apresenta em um estado de repouso, sofre uma transição para uma condição de alto cisalhamento ao passar pelo bocal, assumindo uma nova forma e, finalmente, atinge um novo estado de repouso. Uma vez que o material sai do bocal da agulha, ele deve manter a forma transmitida sem deformar ou fluir. Um meio de melhorar e manter a extrusão homogênea e estável dos filamentos é pela densidade de reticulação que altera propriedades reológicas importantes e, que determinam a qualidade da bioimpressão, que incluem a viscosidade, módulos viscoelásticos de cisalhamento, recuperação

elástica e tensão de cisalhamento (Petta *et al.*, 2018). Parâmetros reológicos importantes que devem ser determinados pela análise reológica.

Os testes preliminares ajudaram na definição da melhor concentração e viscosidade ideal para uma melhor printabilidade da tinta. Além disso, estes testes mesmo demonstrando que a printabilidade está diretamente relacionado com a quantidade de reticulação dinâmica poderá realizar, alterando as proporções de DAS presente na solução, testes quantitativos referente aos parâmetros reológicos ainda serão necessários para confirmar tal constatação. Visto que, a análise reológica nos possibilitará descrever como ocorre a deformação e o fluxo do material sob a influência de forças aplicadas durante o processo de impressão (Schwab *et al.*, 2020).

3.3. Caracterização dos filmes e dos hidrogéis impressos

A natureza química dos filmes e os hidrogéis impressos e de seus precursores foi analisada por FTIR e os espectros obtidos são apresentados nas **Figuras 20a e 20b**.

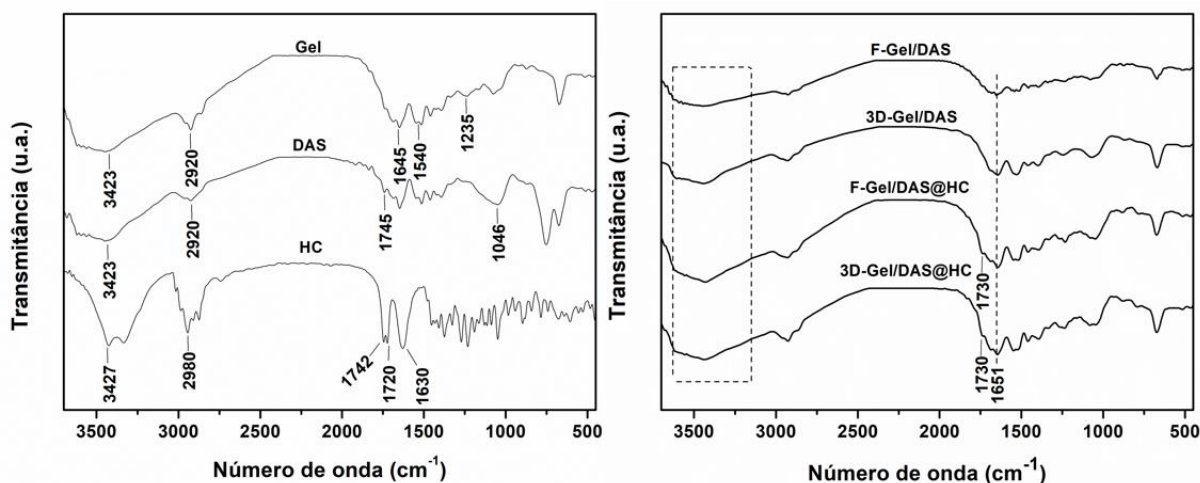
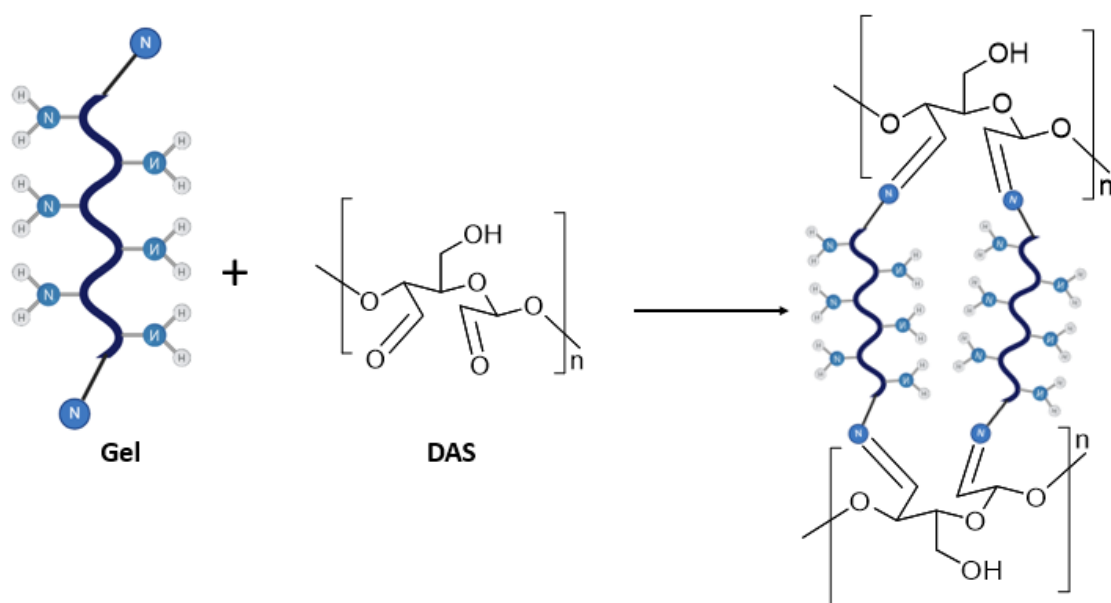


Figura 20. Espectros de FTIR para (a) os materiais precursores Gel, DAS e HC e (b) dos filmes F-Gel/DAS, F-Gel/DAS@HC e dos hidrogéis impressos 3D-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS@HC.

No espectro da Gel pura é possível observar uma banda em 3440 cm⁻¹ devido ao estiramento O–H dos grupos hidroxila, a qual sobrepõe a banda associada ao estiramento N–H de aminas primárias e amida e bandas na região de 2990–2820 cm⁻¹

¹ devido ao estiramento C–H dos grupos CH₂ e CH₃. Já as em 1645, 1540 e 1235 cm⁻¹ correspondem aos estiramentos dos grupos amida I (C=O), amida II (flexão N–H) e amida III (estiramento C–N e vibrações de deformação no plano N–H), respectivamente (Sun *et al.*, 2024). No espectro de FTIR da HC observa-se bandas em 3427 cm⁻¹ referente ao estiramento O–H, em 2980 cm⁻¹ devido ao estiramento C–H das ligações CH₂ e CH₃, em 1742 e 1720 cm⁻¹ referentes aos estiramento C=O dos grupos carbonílicos presentes no anel cíclico e em 1635 cm⁻¹ devido ao estiramento C=C da porção aromática da HC (Voss *et al.*, 2020).

Já nos espectros de FTIR obtidos para os materiais formados a partir da reticulação entre Gel e DAS (**Figura 20b**) é possível observar que todos, independentemente se são filmes ou hidrogéis, apresentam principalmente as bandas características da Gel, a qual é o componente majoritário desses materiais. Contudo, quando comparados com o espectro da Gel pura, os espectros obtidos para os materiais preparados apresentam algumas modificações. Por exemplo, há um alargamento das bandas torno de 3440 cm⁻¹, associada aos estiramentos O–H e N–H, nos espectros dos materiais preparados por *casting* o que pode sugerir um aumento nas interações inter e intramoleculares devido a ligações de hidrogênio entre a Gel e o DAS. Também, pode ser observado nos espectros F-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS a diminuição da intensidade da banda em 1745 cm⁻¹ a qual é associada aos grupos aldeídos do DAS. Essa mudança indica o consumo desses grupos devido a reação de formação de base de Schiff (Moreno *et al.*, 2017). Além disso, nota-se o aparecimento de uma banda em 1651 cm⁻¹ nos espectros dos materiais preparados, a qual é atribuída ao estiramento C=N da base de Schiff formada. Todas essas observações estão de acordo com estudos prévios reportados na literatura que utilizaram metodologia semelhante para o preparado de materiais reticulados (Cui *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2024). O **Esquema 5** ilustra o processo de reticulação entre Gel e DAS via formação de base de Schiff.



Esquema 5

Os espectros de FTIR obtidos para os materiais formulados carregados com HC (F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC), mostram-se muito semelhantes aos espectros dos materiais em o fármaco. Entretanto ao analisarmos os espectros na **Figura 20b**, observa-se nos espectros F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC o aparecimento de uma banda tipo ombro em 1730 cm^{-1} e o alargamento da banda em 1651 cm^{-1} que podem ser atribuídas ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ do grupo carboxílico e $\text{C}=\text{C}$ e anel aromático da HC, respectivamente, indicando a presença do fármaco disperso na estrutura dos materiais (Voss *et al.*, 2020). Ainda, nestes espectros é possível observar o deslocamento da bandas referentes as vibrações dos grupos $\text{O}-\text{H}$ que podem estar associadas as interações por ligação de hidrogênio que os grupos hidroxilas presentes na estrutura da HC realizam com a matriz polimérica (Davoudi *et al.*, 2018).

Análises de TGA/DTG foram realizadas para investigar a relação estrutura-propriedades dos filmes preparados por *casting* e dos hidrogéis impressos. Os resultados dessas análises estão expostos nas **Figura 21a** e **21b**.

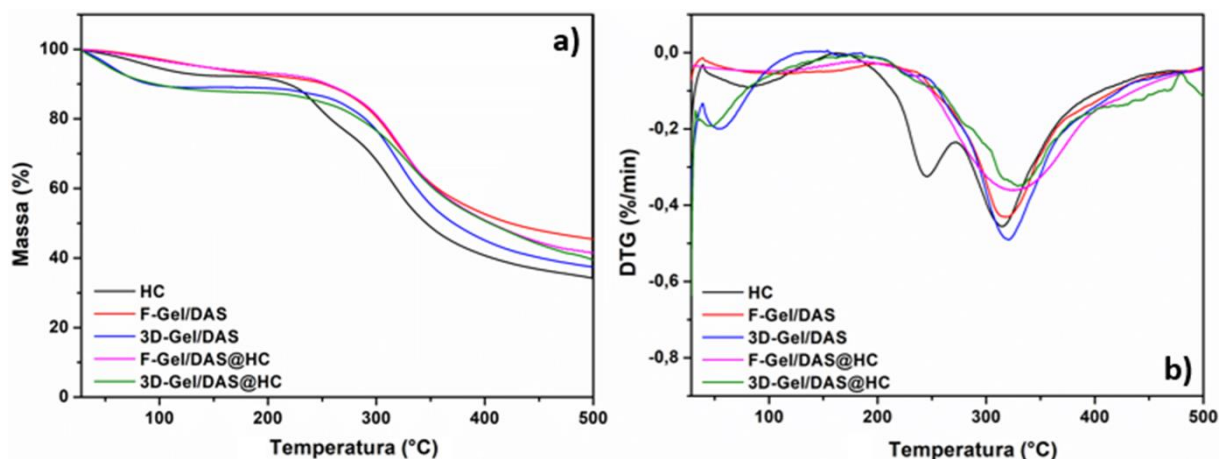


Figura 21. Curvas de TGA (a) e curvas de DTG (b) obtidas para os materiais F-Gel/DAS, 3D-Gel/DAS, F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC e para a HC pura.

Pelas curvas de TGA e DTG obtidas para a HC pura é possível observar que o fármaco apresenta dois estágios principais de perda de massa. A primeira etapa acontece na faixa de temperatura entre 164 e 270 °C que pode estar relacionada as reações de descarboxilação e desidratação da HC, enquanto a segunda etapa acontece entre 270 a 470 °C atribuível a carbonização do fármaco (Celebioglu and Uyar, 2020). Para as curvas de TGA/DTG dos materiais fabricados por *casting* e por 3DP, de maneira geral, estes exibiram apenas dois estágios de perda de massa, com algumas discrepâncias. Contudo, pode ser inferido que ambas as perdas estão associadas à degradação térmica da Gel, que se encontra em maior proporção nos materiais (Barreto et al., 2003). Além disso, a ausência estágios perda de massa específicos para cada componente (Gel e DAS) indica uma boa compatibilidade entre as estruturas químicas dos mesmos.

Para os materiais F-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS, o primeiro estágio de perda de massa ocorreu numa faixa de temperatura de 38–180 °C, aproximadamente e, pode ser atribuída à volatilização da umidade (8 e 11% de perda de massa, respectivamente). Já o segundo estágio, ocorreu na faixa de 136 a 473 °C e está relacionada à eliminação de água interna e à decomposição térmica da Gel e DAS. Esse estágio gerou uma perda de massa de 46% para F-Gel/DAS e de 50% para 3D-Gel/DAS, respectivamente. Ao analisar esses resultados foi possível observar que os materiais fabricados por *casting* apresentaram uma menor perda de massa no primeiro estágio em comparação com os hidrogéis impressos. Isso sugere que os materiais fabricados por *casting* são menos higroscópicos. Tal diferença pode ser

explicada pela técnica de fabricação dos materiais. No processo de *casting*, ao contrário dos hidrogéis impressos liofilizados, além de não favorecer a formação de uma estrutura porosa, os filmes fabricados realizaram a evaporação gradual do solvente. Isso leva a formação de reticulações dinâmicas em maior quantidade, resultando em uma menor quantidade de grupos funcionais disponíveis para as interações com a água (SIMONI *et al.*, 2017).

Os materiais produzidos com o fármaco disperso (F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC) apresentaram um comportamento térmico semelhante aos materiais F-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS, sendo observado para esses também dois estágios de perda de massa. Conforme observado nas curvas de DTG (**Figura 21b**) uma houve uma diminuição da faixa de temperatura do primeiro estágio (entre 29–179 °C) relativo à perda de umidade. No entanto, há um aumento na porcentagem de perda de massa para os materiais contendo o fármaco disperso, obtendo uma perda de massa de aproximadamente 7 e 13%, para F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC, respectivamente. Para o segundo estágio de perda de massa, um aumento na temperatura de degradação que ocorreu numa faixa de temperatura entre 174 e 500 °C foi observado, o que sugere um aumento na estabilidade térmica dos materiais. A presença do fármaco em ambos os materiais elevou a temperatura máxima relacionada ao processo de degradação térmica dos componentes que forma os materiais (Gel e DAS), conforme observados nas curvas DTG. Esse comportamento pode ser atribuído ao aumento de interações por ligações de hidrogênio realizadas entre a HC e a matriz Gel/DAS (SIMONI *et al.*, 2017). Por fim, foi possível observar nas curvas DTG dos materiais contendo o fármaco, os dois picos associados à degradação térmica do mesmo (em 245 e 320 °C). Na curva do hidrogel impresso (3D-Gel/DAS@HC) a observação desses picos é mais clara uma vez que para esse material a relação mássica entre fármaco e Gel/DAS é maior. De modo geral, esses dados de TGA/DTG confirmam o carregamento do fármaco nos materiais preparados e demonstram a interação entre os componentes, corroborando com a análise de FTIR.

A avaliação morfológica das porções superficiais dos materiais produzidos foi feita a partir de imagens obtidas por MEV. As imagens apresentadas nas **Figuras 22a** e **22b** são referentes às amostras de filme sem e com presença do fármaco (**22a'** e **22b'**).

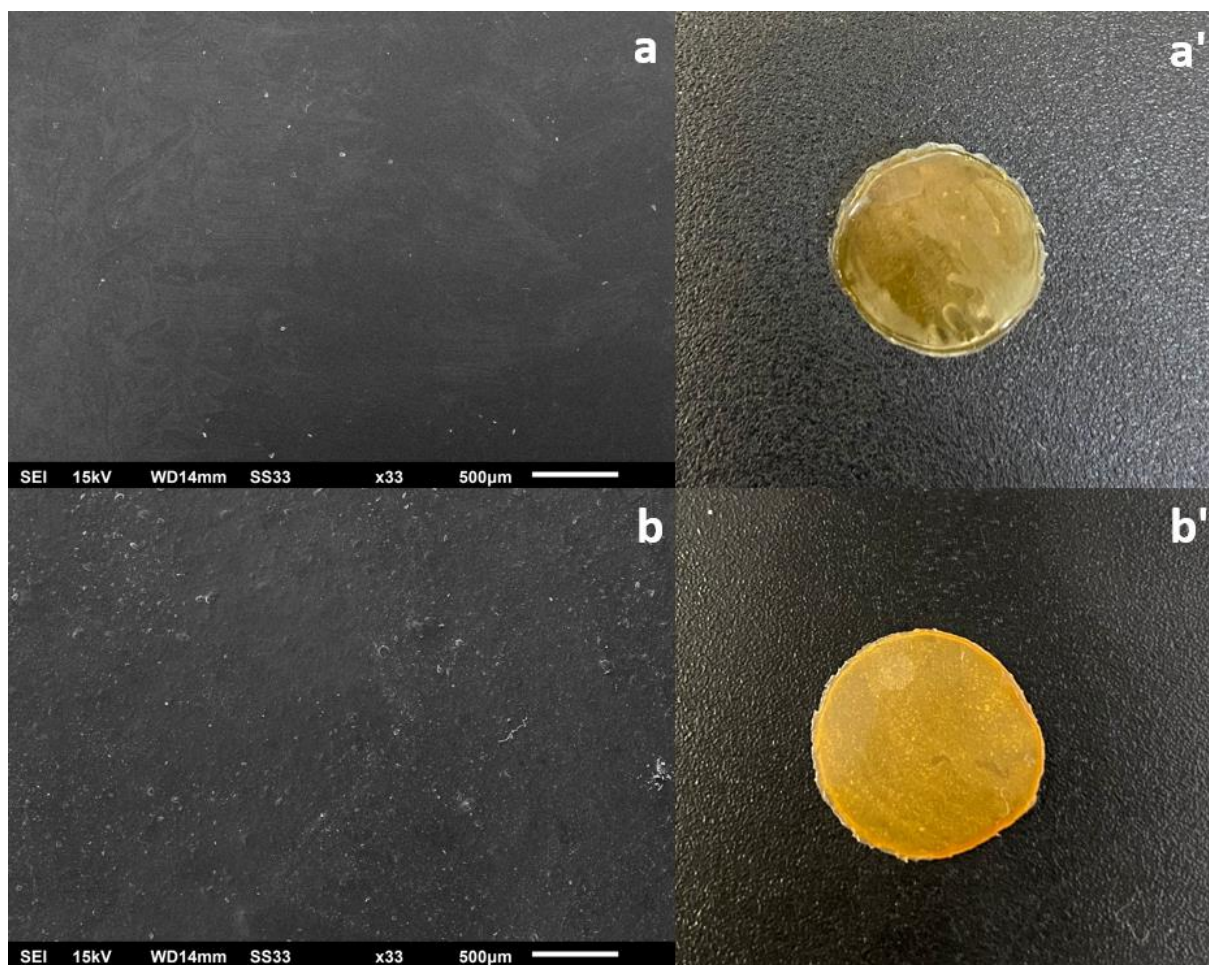


Figura 22. Imagens obtidas por MEV para (a) F-Gel/DAS e (b) F-Gel/DAS@HC e (a') e (b') são dos filmes de F-Gel/DAS e F-Gel/DAS@HC após o processo de formação.

De modo geral, o filme F-Gel/DAS (**Figuras 22a e 22a'**) exibiu uma superfície uniforme, livre de poros e homogênea, o que sugere uma boa compatibilidade entre os materiais de partida (Gel e DAS), o que corrobora a análise de TGA/DTG (Maroufi *et al.*, 2022). Essa uniformidade e a formação de uma estrutura densa dos filmes F-Gel/DAS associadas com a ausência de rugosidades ou fraturas. A dispersão da HC não demonstrou afetar a morfologia superficial dos filmes de F-Gel/DAS@HC (**Figura 22b**), ou seja, mesmo após o carregamento do fármaco na matriz polimérica não é possível observar a formação de aglomerados na superfície dos filmes, o que confirma que a HC não altera a morfologia superficial do material fabricado a base de Gel/DAS, o que ratifica com os resultados anteriores.

Na **Figura 23a e 23b** são apresentadas as imagens obtidas por MEV dos hidrogéis impressos com e sem a presença da HC (**23a' e 23b'**). Conforme observado, ambos os hidrogéis apresentaram uma estrutura porosa e por isso foi utilizado o software Size Meter® para se determinar o tamanho médio de poros desses materiais.

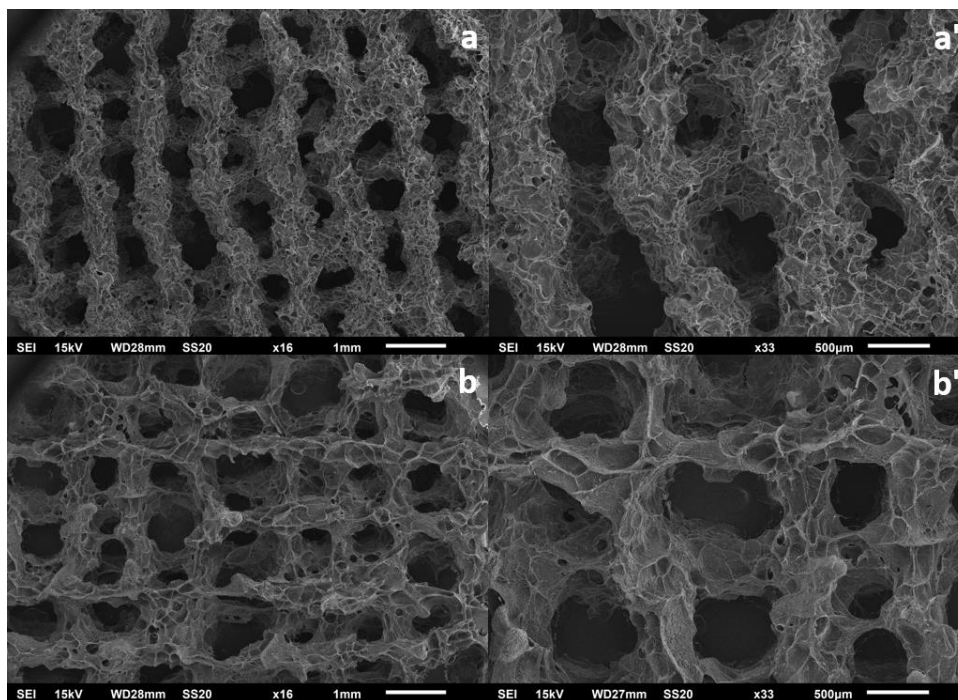


Figura 23. Imagens obtidas por MEV dos hidrogéis impressos, com diferentes magnitudes, das amostras (a, a') 3D-Gel/DAS, (b, b') 3D-Gel/DAS@HC e os hidrogéis impressos (a'') 3D-Gel/DAS e (b'') 3D-Gel/DAS@HC.

As imagens apresentadas nas **Figuras 23a e 23a'** confirmam que amostra 3D-Gel/DAS apresenta um arranjo espacial equivalente ao desenho padrão usado na 3DP. Conforme avaliado, o espaçamento entre os filamentos são de aproximadamente $530 \pm 37 \mu\text{m}$. Ainda, os filamentos apresentaram uma estrutura microporosa não homogênea com poros com tamanho médio de $89 \pm 24 \mu\text{m}$. Esses microporos foram formados durante o processo de liofilização utilizado durante a produção do material. O processo de liofilização é utilizado para a secagem de materiais e ao mesmo tempo que pode haver a formação de uma estrutura porosa dependendo da taxa de congelamento do material (Aslzad *et al.*, 2022). Esses poros são formados pela sublimação dos cristais de gelos formados no interior dos materiais, previamente congelados (Guastaferrero *et al.*, 2021). Ao observarmos as imagens obtidas para os hidrogéis impressos contendo o fármaco disperso na solução

formadora do gel (Gel/DAS) é possível notar um aumento no tamanho desses poros formados durante a 3DP e uma diminuição relativa dos filamentos impressos. As **Figuras 23b e 23b'** revelam que a superfície dos hidrogéis impressos com HC possuem filamentos com diâmetro de $571 \pm 19 \mu\text{m}$ e microporos tamanho médio de $119 \pm 58 \mu\text{m}$.

As imagens fotográficas apresentadas nas **Figuras 24a,a' e 24b,b'** permitem visualizar os hidrogéis impressos antes e após o processo de secagem dos mesmos por liofilização. Nota-se que antes e mesmo após o processo de liofilização os filamentos não colapsaram indicando a estabilidade dos materiais devido ao processo de reticulação nesse estudo. Ligações de Schiff possuem um caráter dinâmico o que possibilita que os hidrogéis mesmo após o processo de extrusão voltem a ter uma rede reticulada, o que confere essa estabilidade (Vítková *et al.*, 2023). Vale mencionar, que até o momento, não há registro na literatura mencionando a combinação de Gel/DAS via ligações dinâmicas por meio de reações de base de Schiff que foram utilizados para a fabricação de hidrogéis impressos usados em SLTF.

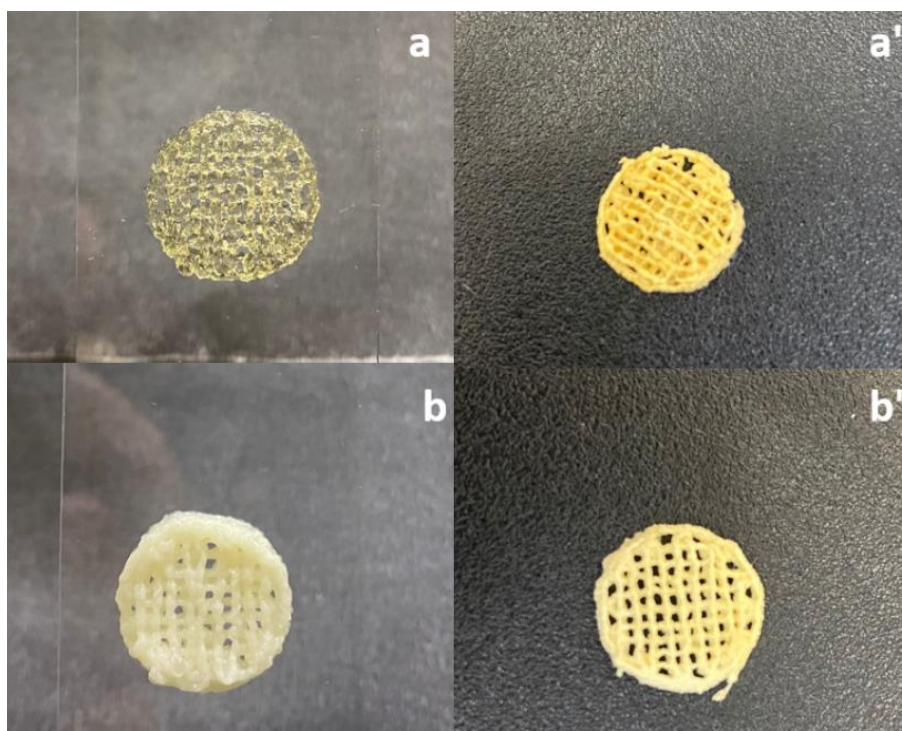


Figura 24. Imagens fotográficas obtidas dos hidrogéis (a) 3D-Gel/DAS e (b) 3D-Gel/DAS@HC impressos e após liofilização. (a') 3D-Gel/DAS e (b') 3D-Gel/DAS@HC.

De modo geral, materiais porosos são atraentes para serem utilizados como SLTF, pois exibem uma área superficial ampliada, com grande volume de poros e espaços entre os filamentos, permitindo a adsorção e deposição de fármacos (Farzan *et al.*, 2023). Além disso, a grande área superficial obtidas pela fabricação dos hidrogéis impressos, pode facilitar a taxa de dissolução de fármacos que são pouco insolúveis, como no caso da HC (Baumgartner and Planinšek, 2021). Por este motivo, a capacidade de absorção de fluídos biológicos dos materiais foi avaliada e suas curvas podem ser observadas na **Figura 25**.

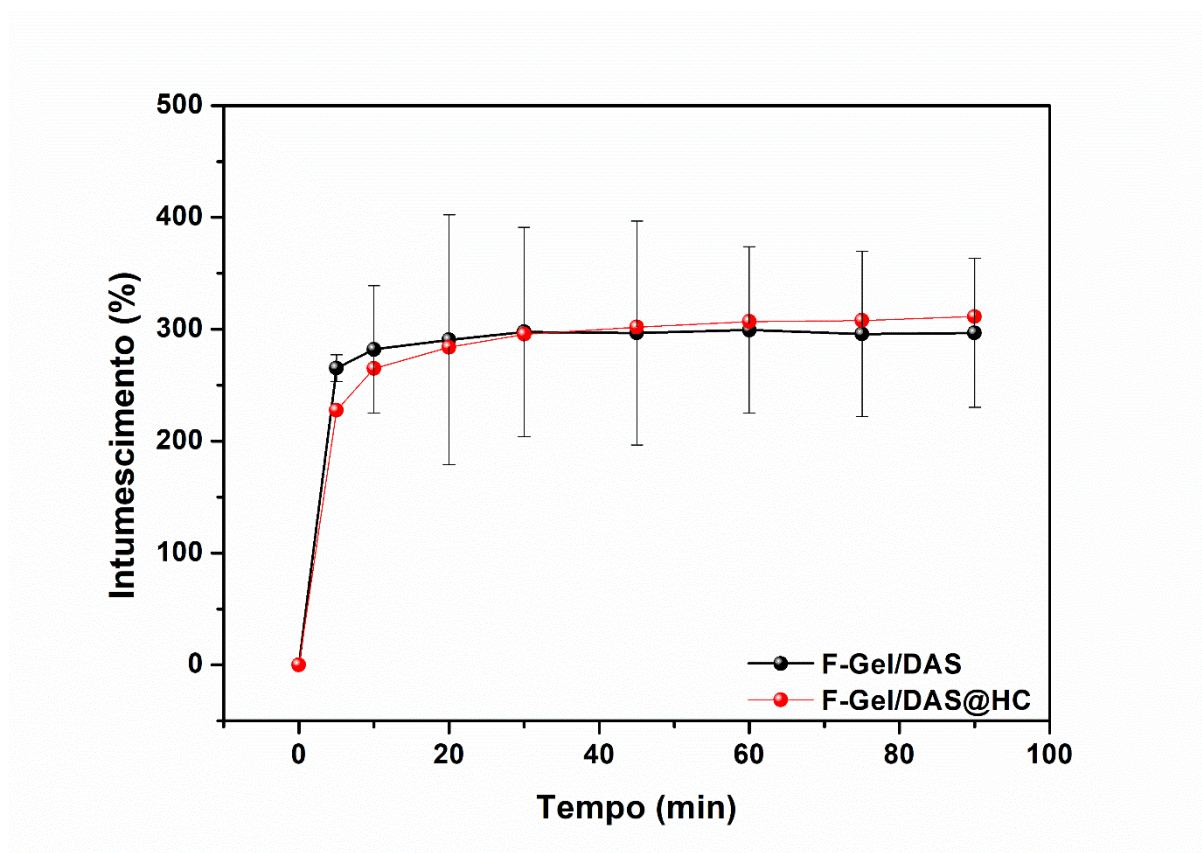


Figura 25. Curvas de intumescimento dos F-Gel/DAS e F-Gel/DAS@HC em PBS (pH 7,4) a 37°C.

Conforme observado, todos os materiais avaliados apresentaram uma rápida taxa de intumescimento inicial, com a maioria alcançando quase o máximo de intumescimento nos primeiros 5 min de imersão em PBS. Posteriormente, após 20 min de experimento, as curvas atingiram um platô, sugerindo que o processo de intumescimento atingiu um equilíbrio. Os materiais formados por *casting*, F-Gel/DAS e F-Gel/DAS@HC, apresentaram um grau de intumescimento máximo de 297 e 307%,

respectivamente. Esses dados obtidos corroboram com as análises realizadas anteriormente, visto que, na fabricação do material por técnica de *casting* as reticulações covalentes e iônicas foram formadas de forma gradativa ao longo do processo de volatilização do solvente e formação do filme, o que diminuiu a quantidade de alta grau de intumescimento está relacionado com os grupos livres para realizar interações com a água (Aslzad et al., 2022). Além disso, por essa técnica de fabricação dos filmes acaba por gerar materiais 2D livres de poros, o que dificulta ainda mais o processo de intumescimento. Ainda, pode ser observado que a HC não influenciou significativamente no intumescimento do material, demonstrando que o fármaco estava apenas disperso no material, sem realizar interações com a Gel e DAS o que pode facilitar o processo de liberação do fármaco.

Por outro lado, os materiais impressos (3D-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS@HC), além de apresentarem comportamentos semelhantes aos filmes, pode ser observado um intumescimento máximo de 699 e 853% , respectivamente, **Figura 26**.

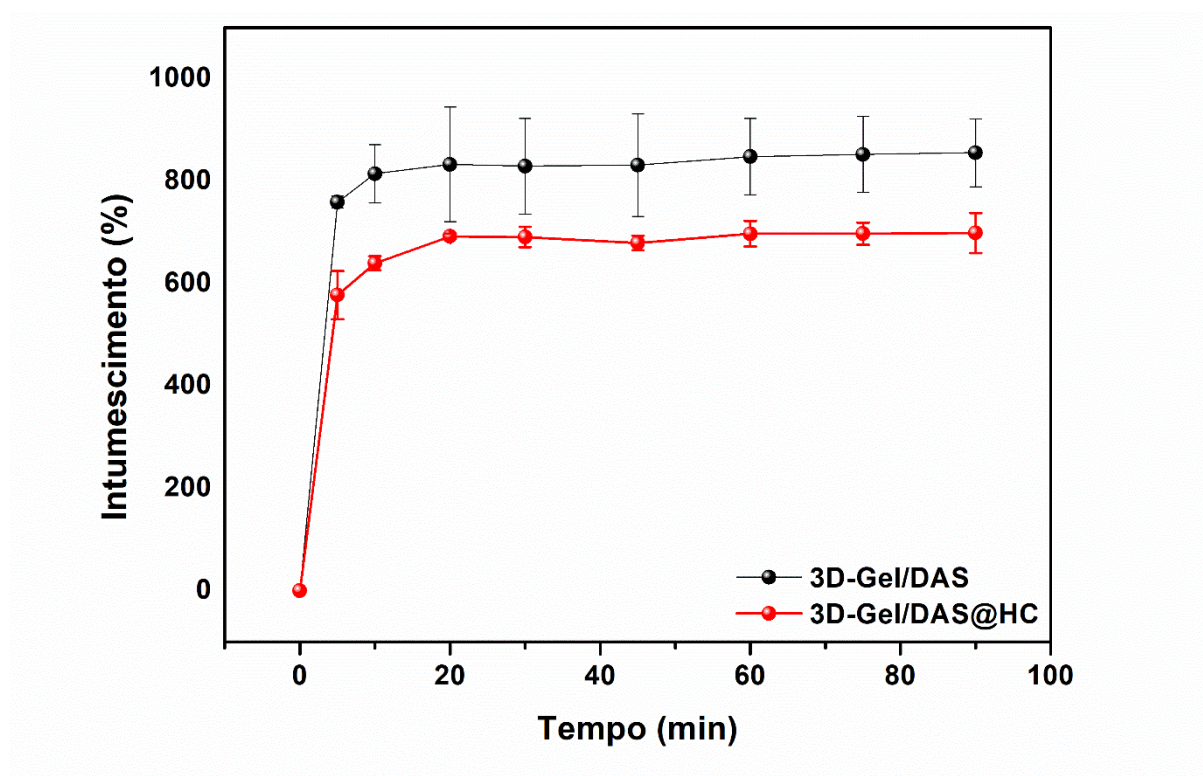


Figura 26. Curvas de intumescimento dos 3D-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS@HC em PBS (pH 7,4) a 37°C.

O alto grau de intumescimento apresentado pelos os hidrogéis fabricados por 3DP e liofilizados está diretamente relacionado com o caráter dinâmico que esse material sofre ao ser fabricado. Ao realizar a formação da tinta a formação de reticulações iônicas e covalentes que ao entrarem em contato com o processo de extrusão, as reticulações mais fracas (iônicas) se afastam ao ponto de não conseguirem retornar ao seu distanciamento original e, com isso, deixando o material com uma maior quantidade de grupos disponíveis para realizar interações com a água. Ainda, o processo de secagem do material por liofilização e o desenho impresso leva à maior área superficial desses materiais 3D e a sua grande quantidade de poros e espaços entre os filamentos o que facilita a difusão e absorção de líquidos (Aslzaad *et al.*, 2022).

De acordo com os dados de intumescimento, foi possível notar também que o hidrogel 3D-Gel/DAS sem o HC apresentou maior grau de intumescimento quando comparado com o hidrogel 3D-Gel/DAS@HC. Isso está relacionado com a interação que a HC realiza com os grupos hidrofílicos livres presente na matriz deste hidrogel, o que pode limitar a capacidade de absorção de água. Biomateriais com alto grau de porosidade e que conseguem absorvem em grande quantidade de fluídos são ideias para serem utilizados em sistemas transdérmicos (Vivcharenko *et al.*, 2021). Visto que ao remover os fluídos exsudativos, formados pela resposta inflamatória, conseguem proporcionar um ambiente adequado para a regeneração do tecido e, ainda fornecer oxigênio e manter a umidade adequada (Hodge *et al.*, 2022).

No geral, ambos os materiais (filmes e hidrogéis) apresentam a capacidade de absorção de líquidos e a uma cinética de absorção relativamente rápida, propriedades interessantes para a aplicação de SLTFs.

3.4. Liberação *in vitro* de HC

A **Figura 27** apresenta os resultados dos ensaios de liberação (*in vitro*) do fármaco HC a partir das amostras F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC em PBS (pH 7,4) a 37 °C. Vale relembrar que esses ensaios foram realizados utilizando uma célula de difusão de Franz, com o intuito de mimetizar um processo de liberação transdérmica (Pulsoni *et al.*, 2022). Ainda, as amostras foram dimensionadas em termos de massa para apresentarem a mesma quantidade inicial de HC (5 mg).

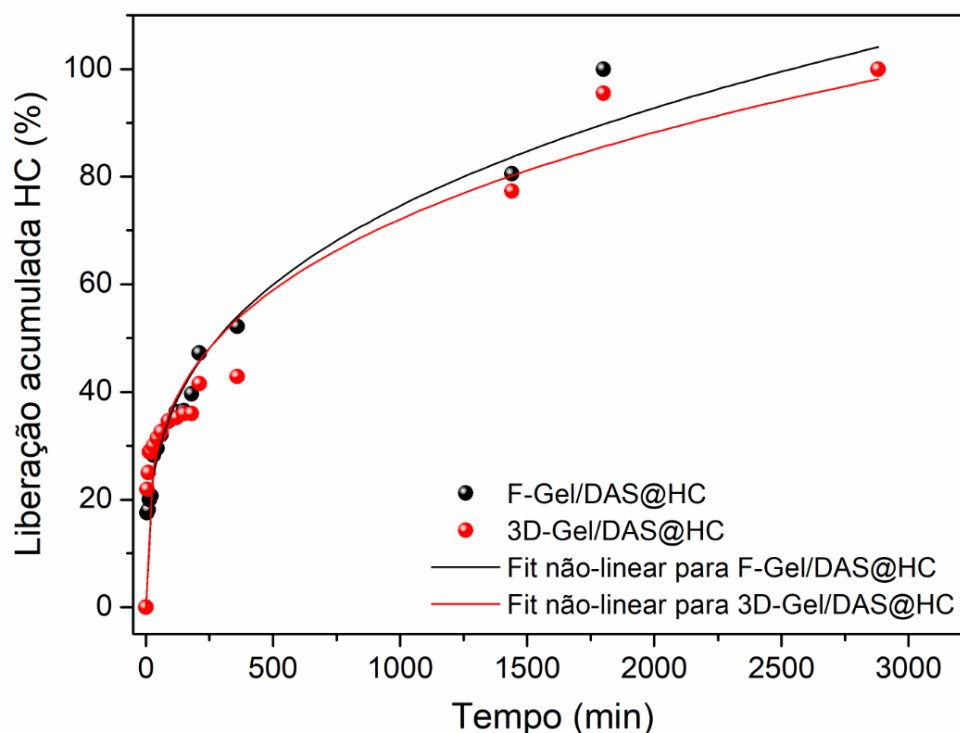


Figura 27. Cinética de liberação da HC carregada nos materiais F-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS em PBS (pH 7,4) a 37 °C. Nota: As curvas contínuas são referentes ao fit não linear dos dados experimentais utilizando o modelo de Korsmeyer-Peppas.

Analisando as curvas de liberação dos materiais (F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC) é possível observar que estas apresentaram um perfil lento de liberação ao longo das 48 h de teste (ou 2880 min). Durante os primeiros 250 min de experimento, ambos os materiais apresentam uma taxa de liberação rápida, principalmente o filme F-Gel/DAS@HC. Para essa amostra, a quantidade de HC liberada no tempo 250 min foi de aproximadamente 50% da massa de fármaco carregada. Essa taxa liberação rápida no início do experimento é provavelmente devido a liberação de moléculas de HC carregadas na porção superficial dos materiais. Para tempos mais longos, o perfil cinético de liberação das duas amostras foi comparável. No entanto, para o filme 100% do HC carregado foi liberado em 30 h (ou 1800 min), enquanto para 3D-Gel/DAS@HC a liberação completa do fármaco só ocorreu após 48 h. Interações mais perceptíveis entre o fármaco e a matriz do hidrogel podem explicar esse resultado.

A fim de obter informações sobre os mecanismos que regem no processo de liberação da HC, dos materiais preparados, os dados experimentais foram examinados usando diferentes modelos matemáticos. No qual, o modelo matemático que forneceu o maior valor R^2 (coeficiente de determinação linear) foi considerado capaz de explicar os dados de liberação e, portanto, capaz de indicar o melhor mecanismo de liberação da HC a partir dos materiais fabricados por *casting* e por 3DP. Após observar os valores de R^2 calculados para cada modelo, foi definido que o modelo não-linear de Korsmeyer-Peppas apresentou maior robustez para explicar os dados experimentais ($R^2 > 0,94$) (Korsmeyer *et al.*, 1983). Utilizando esse modelo matemático é possível obter parâmetros importantes que determinam o mecanismo de liberação do fármaco como, por exemplo, o expoente de liberação (n). Se n for igual a 0,43 o mecanismo que controla a liberação do fármaco se dá por difusão Fickiana – descrita para o transporte de fluídos de uma região de alta concentração para regiões de baixa concentração (Fu and Kao, 2010). Já se n for igual a 1, a cinética de liberação é de ordem-zero, sendo a liberação controlada por mecanismos de transporte do Caso II – a liberação ocorre pelo intumescimento do polímero através do relaxamento da matriz ou a liberação mediante erosão. Se caso os valores de n forem menores que 0,43 ou maior que 1 indicam uma cinética de transporte anômalo, com uma combinação dos dois mecanismos de difusão e de transporte de Caso II (Ciro *et al.*, 2019).

Os valores de n calculadas para ambos os materiais foram próximos a 0,3, o que indica que a liberação de HC a partir do filme e do hidrogel impresso são regidos pela Lei de Fick (Lopina and Kanjickal, 2004). Essa lei descreve como acontece o transporte de fluídos de uma região de alta concentração para regiões de baixa concentração química, sob condições permanentes (Fu and Kao, 2010). A difusão é um processo que depende do tempo, ou seja, o tempo de relaxação do polímero é maior que o tempo específico de difusão do solvente. Logo, esse resultado demonstra que o mecanismo de liberação da HC de uma matriz constituída de Gel/DAS aparentemente independe do modo de fabricação do material, considerando aqueles utilizados nesse estudo. Mesmo a difusão sendo virtualmente facilitada pela estrutura porosa do hidrogel 3D-Gel/DAS@HC e maior capacidade de intumescimento do mesmo, a interação do fármaco mais proeminente com esse material auxilia no controle do processo de liberação. Os resultados obtidos e descritos até aqui,

demonstram que as propriedades físico-químicas e de liberação dos materiais de F-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS são adequadas para que essas atuem como potenciais veículos transportadores para encapsulação e liberação transdérmica de fármacos, como a HC.

3.5. Estudos *in vivo*

A fim de, avaliar a eficiência terapêutica dos materiais fabricados por meio de diferentes técnicas (*casting* e 3DP), foi escolhido um modelo animal de dermatite atópica. Diversos estudo empregam o DNCB para induzi condições cutâneas semelhantes à dermatite atópica (DA) em camundongos. Essa molécula da classe do heptanos é injetada na camada epidérmica dos animais para causar inicialmente uma resposta imune. A exposição repetida leva ao desenvolvimento de um estado semelhante ao da DA em camundongo (Saito *et al.*, 2017). A indução de DNCB causa anafilaxia e o aparecimento de lesões cutâneas semelhantes a DA incluem pele mais espessa, ressecamento, inchaço, edema e eritema (Saito *et al.*, 2017).

Os efeitos da aplicação tópica para os materiais são representados na **Figura 28B**, os dados obtidos ilustram os efeitos dos tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e com a HC na gravidade das lesões cutâneas e no comportamento de coçar em camundongos. Os resultados demonstraram que todos os animais expostos ao DNCB exibiram sinais clínicos semelhantes aos da DA, caracterizados por um aumento no escore clínico de gravidade da pele, quando comparados com o grupo controle. Os tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e com a HC reduziram efetivamente a gravidade das lesões cutâneas induzidas por DNCB. Por outro lado, os tratamentos F-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS não alteraram a gravidade das lesões induzidas pelo DNCB. O tratamento com F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e com a HC mostrou uma diferença estatística no escore clínico de gravidade da pele em comparação com camundongos tratados com F-Gel/DAS ($p > 0,05$) (ANOVA: $F_{(6,42)} = 23,58$, $p < 0,0001$) (**Figura 28B**).

Já os resultados obtidos para o tempo em que os animais levaram para coçar, **Figura 28C**, foi possível observar que os camundongos expostos ao DNCB exibiram um aumento no tempo de coçar em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). O tratamento F-Gel/DAS@HC reduziu efetivamente a gravidade das lesões cutâneas

induzidas por DNCB. No entanto, os tratamentos 3D-Gel/DAS@HC e apenas com a HC não alteraram o comportamento de coçar em comparação com os ratos tratados com DNCB ($p > 0,05$). Uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os tratamentos F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC, sugerindo que a aplicação tópica de F-Gel/DAS@HC foi mais eficaz na redução do comportamento de coçar em camundongos tratados com DNCB do que 3D -Gel/DAS@HC ou HC (ANOVA: $F_{(6,42)} = 10,11$, $p < 0,0001$) (**Figura 28C**).

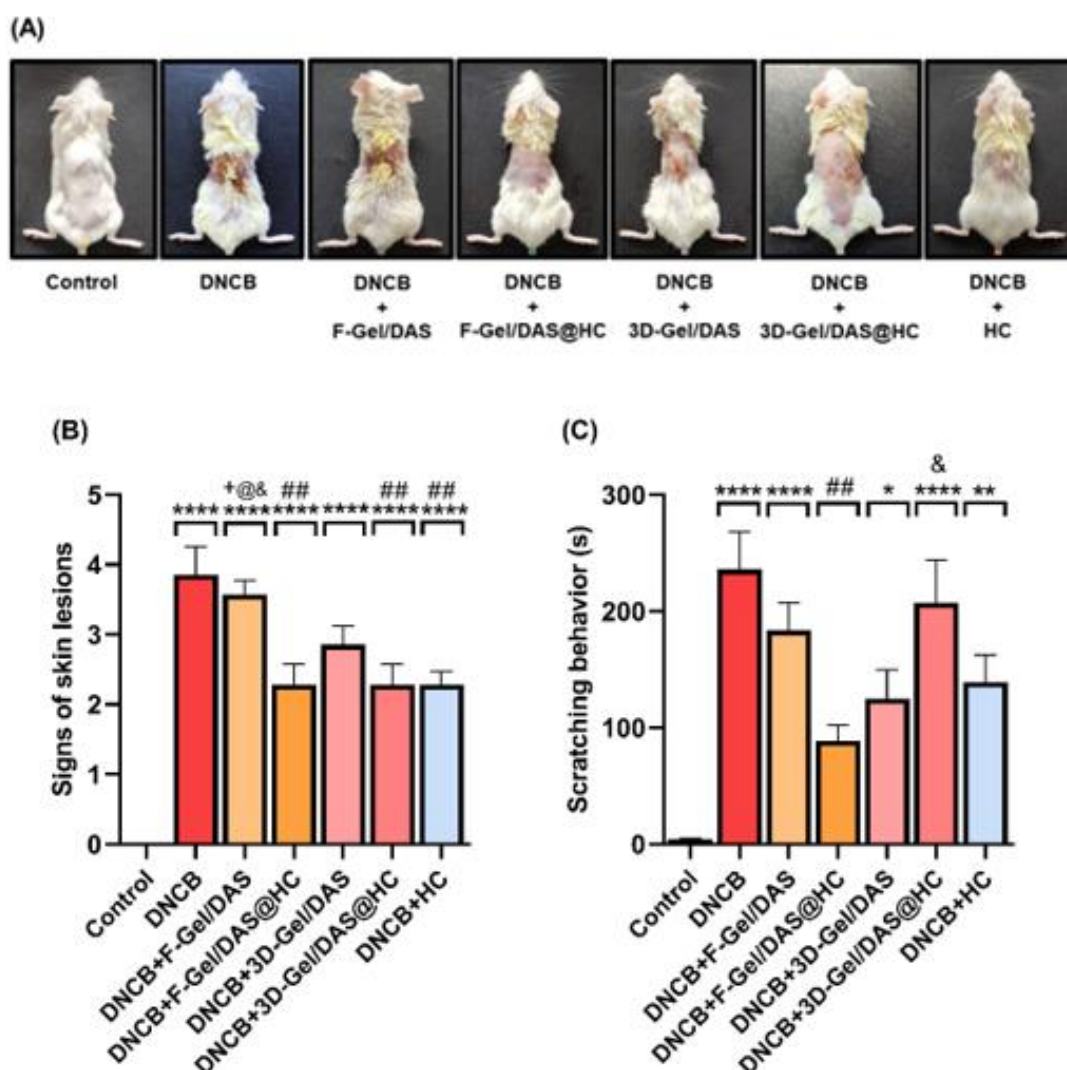


Figura 28. Efeito dos tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e HC nos sinais clínicos semelhantes à DA induzidos por 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos. (A) Imagens das lesões cutâneas dos grupos de ratos tiradas no último dia do experimento (dia 30). (B) Pontuação das lesões cutâneas. (C) Tempo de coçar avaliado no dia 30 do protocolo experimental. Cada coluna representa a média $\pm$ SEM

de 7 ratos por grupo. (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (****) $p < 0,0001$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo controle; (##) $p < 0,01$ denota níveis de significância em comparação com o grupo DNCB; (&) $p < 0,05$ denota níveis de significância em comparação com o grupo F-Gel/DAS@HC; (@) $p < 0,05$ denota níveis de significância em comparação com o grupo 3D-Gel/DAS@HC; (+) $p < 0,05$ denota níveis de significância em comparação com o grupo HC (creme) (ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey).

Efeitos dos parâmetros inflamatórios

Os resultados representados na **Figura 29** demonstram os efeitos exercidos pelas formulações contendo ou não HC nos testes desenvolvidos para a espessura de orelha e na atividade de MPO induzida por DNCB em camundongos. Os resultados evidenciam que o DNCB aumentou substancialmente a espessura das orelhas em comparação com o grupo controle. No entanto, apenas o tratamento com HC foi eficaz na redução da espessura das orelhas induzidas pela DNCB em camundongos. A aplicação tópica de F-Gel/DAS, F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS@HC não reduziu a espessura da orelha induzido por DNCB em camundongos (ANOVA: $F_{(6,42)} = 11,05$, $p < 0,0001$) (**Figura 29A**).

Em relação à atividade da MPO, os resultados revelaram que o DNCB aumentou significativamente a atividade da MPO nas orelhas e na pele dorsal dos camundongos quando comparado com o grupo controle. A análise dos dados estatísticos revelou que os tratamentos F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC reduziram a atividade de MPO da orelha induzida por DNCB em camundongos, de forma semelhante aos tratamentos F-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS (ANOVA: $F_{(6,42)} = 5,554$, $p < 0,001$) (**Figura 29B**). Na pele dorsal, nenhum dos tratamentos tópicos foi eficaz na redução da atividade da MPO (ANOVA: $F_{(6,42)} = 3,506$, $p < 0,01$) (**Figura 29C**).

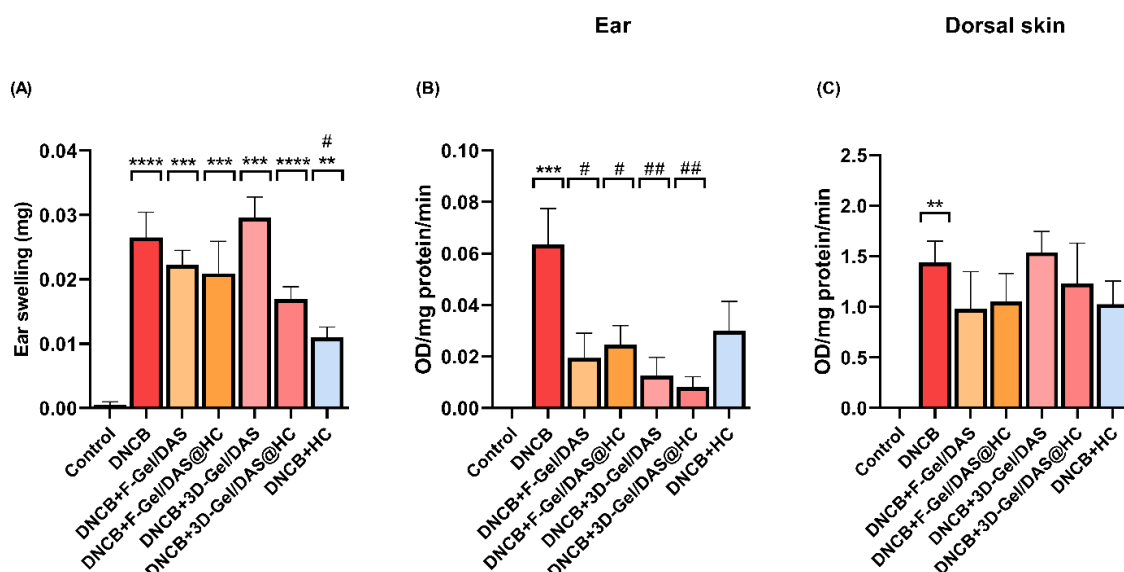


Figura 29. O efeito dos tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e HC no inchaço da orelha (A) e na atividade da mieloperoxidase (MPO) na orelha (B) e na pele dorsal (C) de camundongos expostos ao 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB). Cada coluna representa a média $\pm$ SEM de 7 ratos por grupo. (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo controle; (#) $p < 0,05$ e (##) $p < 0,01$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo DNCB (ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey).

3.6. Efeito da peroxidação lipídica e nos níveis de NPSH

Os efeitos dos tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e com a HC nos níveis de TBARS e NPSH na orelha e na pele dorsal dos camundongos são apresentados nas **Figuras 30A-4D**. A indução de DNCB levou a um aumento nos níveis de TBARS na orelha (ANOVA: $F_{(6,42)} = 4,654$, $p < 0,01$) e pele dorsal (ANOVA: $F_{(6,42)} = 13,80$, $p < 0,0001$) de camundongos comparados com o grupo controle. Os resultados também indicaram que o tratamento repetido com F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e HC reduziu os níveis de TBARS em animais expostos ao DNCB em ambos os tecidos. Por outro lado, os tratamentos tópicos com F-Gel/DAS e 3D-Gel/DAS não alteraram os níveis de TBARS na orelha e na pele dorsal de camundongos quando comparados ao grupo DNCB. Nenhuma diferença foi observada entre as aplicações tópicas de F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e HC. No entanto, os tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e HC foram

estatisticamente mais eficazes na redução dos níveis de TBARS na pele dorsal de camundongos expostos ao DNCB do que o F-Gel/DAS e 3D-Gel /DAS (**Figuras 30A e 30B**).

Nossos resultados, em relação aos níveis de NPSH, demonstram que o tratamento repetido com F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC e/ou HC não alterou os níveis de NPSH na orelha de camundongos em comparação com DNCB, F-Gel/DAS e grupos 3D-Gel/DAS (ANOVA: $F_{(6,42)} = 2,620$, $p < 0,05$). Porém, na pele dorsal de camundongos, a aplicação tópica de 3D-Gel/DAS@HC aumentou os níveis de NPSH em comparação ao grupo DNCB (ANOVA: $F_{(6,42)} = 6,024$, $p < 0,001$). Além disso, os níveis de NPSH na pele dorsal diferiram estatisticamente entre os grupos 3D-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS e HC. Além disso, os animais expostos ao DNCB exibiram diminuição nos níveis de NPSH tanto na orelha quanto na pele dorsal em comparação ao grupo controle (**Figuras 30C e 30D**).

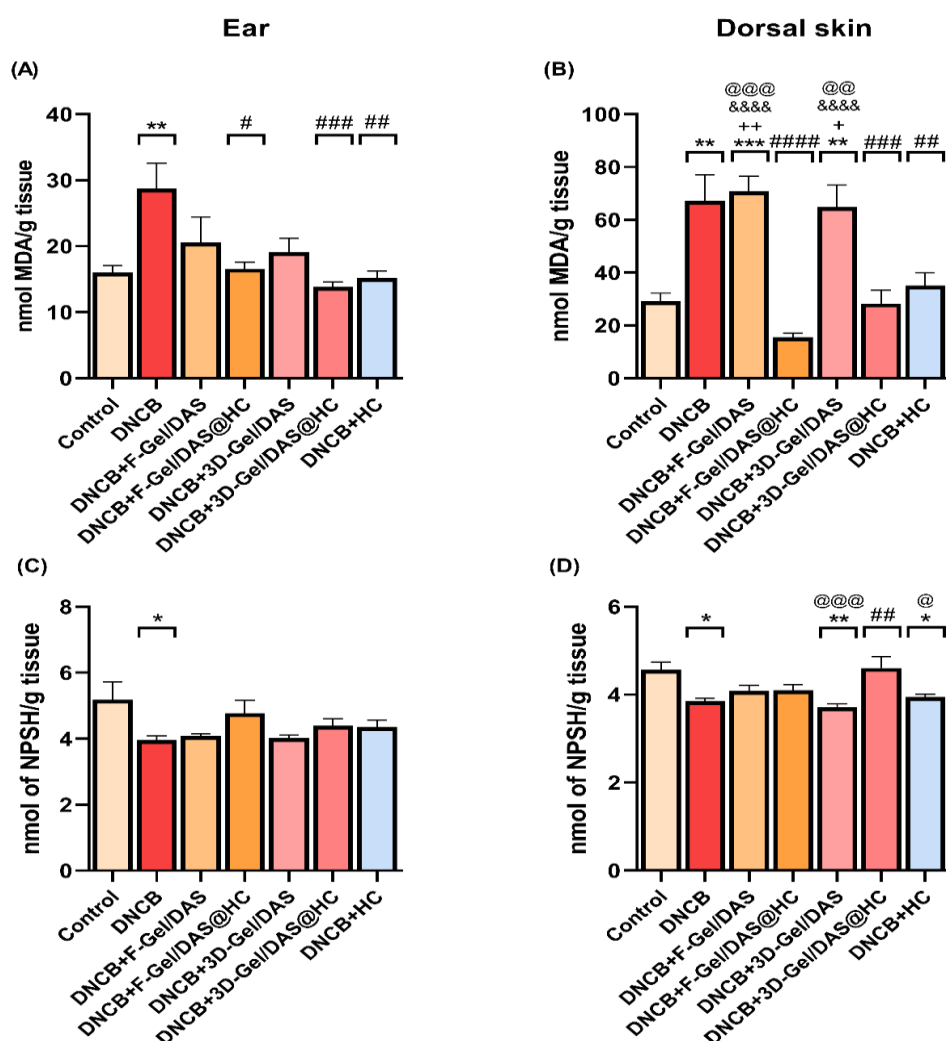


Figura 30. O efeito dos tratamentos F-Gel/DAS@HC, 3D-Gel/DAS@HC ou HC nos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na orelha (A) e na pele dorsal (B), conforme bem como nos níveis de tiol não proteico (NPSH) na orelha (C) e na pele dorsal (D) de camundongos expostos ao 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB). Cada coluna representa a média $\pm$ SEM de 7 ratos por grupo. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo controle; (##) $p < 0,01$ denota níveis de significância em comparação com o grupo DNCB; (@) $p < 0,05$ e (@@@) $p < 0,001$ denotam níveis de significância em comparação com o grupo 3D-Gel/DAS@HC (ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey).

4. Conclusão

A partir do estudo apresentado neste capítulo foi possível demonstrar a eficiência do protocolo experimental escolhido para a síntese do DAS, no qual, permitiu obter um derivado do St com teor de grupos aldeído de 77%. A associação do derivado com Gel possibilitou o preparo de diferentes materiais fabricados por técnicas, incluindo materiais *casting* e hidrogéis impressos. Ambos os materiais provaram ser relativamente homogêneos, com estruturas estáveis e com bom manuseio. Usando o método de *casting*, uma série de filmes foram preparados sem e com o fármaco HC. Já usando o método de 3DP foi possível obter hidrogéis impressos com quatro camadas, no qual, também foram preparados materiais com e sem a presença da HC. Ensaio de caracterização iniciais revelaram que os materiais preparados por *casting* e hidrogéis impressos com tiveram características distintas, incluindo a porosidade, densidade de reticulação dinâmica diferentes e intumescimento. Apesar disso, os materiais preparados com o fármaco HC, foram usados para realizar as análises de caracterização e os testes *in vitro* e *in vivo*.

As análises de caracterização (FTIR, TGA/DTG) confirmaram a interação entre os polímeros, a qual ocorre por reticulação covalente e não covalente, com a formação de grupos imina formado pela reação de base de Schiff e ligações de hidrogênio entre os grupos amina e hidroxila dos polímeros. Estas análises também confirmaram a presença da HC nas matrizes poliméricas. Estudos *in vitro*, demonstraram que ambos os materiais realizaram a liberação do fármaco durante 48 h. Já os testes *in vivo*, usando um modelo de dermatite induzida por DNCB em camundongos mostraram que os materiais preparados com Gel/DAS carregados com a HC, aplicados topicamente exibiram desempenho comparável ao fármaco livre (controle positivo), que foi administrado de forma tópica. Conforme avaliado os materiais carregados com a HC reduziram efetivamente a gravidade das lesões cutâneas e os níveis de TBARS induzidas por DNCB. No entanto, não foram eficientes para reduzir a espessura da orelha dos animais. Vale ressaltar, porém que outros testes comportamentais estão em andamento, com o intuito de avaliar comorbidades psiquiátricas, tais como ansiedade e depressão afim de ampliar o escopo das análises realizadas. No geral, os dados obtidos até o momento da confecção desta Tese demonstram que os

materiais preparados com o DAS sintetizado (F-Gel/DAS@HC e 3D-Gel/DAS@HC) podem ser utilizados como SLFT para o fármaco HC.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO GERAL

1. Conclusão Geral

A constante busca de novos biomateriais, que sejam empregados na área medicinal, estimula a produção de novos derivados do amido. Os derivados por atribuírem novas propriedades físico-químicas e biológicas aos materiais, tornam-se atrativos para serem empregados como biomateriais, no processo de cura de diferentes patologias. Nesse sentido, os estudos demonstrados até aqui, reforçam a importância da constante busca por novos derivados de polissacarídeos, empregados na medicina como biomateriais. No Capítulo III, a derivatização do amido, por meio da reação de eterificação, foi possível haver a formação do CSt com propriedades superior ao do amido, como baixa viscosidade e alta solubilidade. Esse derivado foi utilizado como base para a formação de filmes poliméricos de CSt e PVA, que foram utilizados como veículos de carregamento e entrega local do fármaco MTX, usado em doenças como a AR. Testes *in vitro*, demonstraram que o MTX carregado no filme consegue atingir a camada transdérmica, sugerindo que os filmes preparados são potenciais dispositivos para sistemas de liberação transdérmica de medicamentos. Ainda, testes *in vivo* revelaram a eficiência dos filmes carregados MTX no tratamento e atenuação de sintomas de AR. Os resultados demonstraram que os filmes obtiveram a mesma eficiência de cura da AR, quando comparados com o grupo controle, que foi tratado com o MTX por via oral. Já no Capítulo IV, a derivatização do amido, por meio da reação de oxidação, foi possível haver a formação do DAS com propriedades superiores ao do amido, com baixa viscosidade e alta solubilidade em temperaturas elevadas. Ainda, esse derivado foi utilizado como base para a formação de materiais por *casting* e hidrogéis impressos usando DAS e Gel, que foram utilizados como veículos de transporte e entrega do fármaco HC, usado em doenças como a DA. Testes *in vitro*, demonstram que a HC carregada nos materiais é liberado de forma gradativa durante 48 h. Já os testes *in vivo* revelaram a eficiência do carregamento da HC nos materiais atenuando alguns sintomas da DA.

Em geral, os estudos descritos nessa Tese reforçam a importância da formulação de novos derivados do amido, voltados para a formação de novos

biomateriais, com o intuito de serem utilizados na área médica e farmacêutica. Os mesmos podem ser utilizados no preparo de materiais a partir de diferentes metodologias, o que demonstra sua versatilidade em termos de processabilidade. Apesar da extensa caracterização e dos testes *in vitro* e *in vivo* apresentados, estudos futuros são necessários para completar a caracterização físico-química e biológica desses derivados a fim de viabilizar o preparo de biomateriais a partir dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- Adepu, S., Ramakrishna, S., 2021. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* 26, 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>
- Ahmady, A., Abu Samah, N.H., 2021. A review: Gelatine as a bioadhesive material for medical and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 608, 121037. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121037>
- Alshangiti, D.M., El-damhougy, T.K., Zaher, A., Madani, M., Mohamady ghobashy, M., 2023. Revolutionizing biomedicine: advancements, applications, and prospects of nanocomposite macromolecular carbohydrate-based hydrogel biomaterials: a review. *RSC Adv.* 13, 35251–35291. <https://doi.org/10.1039/D3RA07391B>
- Alvarez-Figueroa, M., 2001. Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 212, 101–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00599-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00599-8)
- Amaraweera, S.M., Gunathilake, C., Gunawardene, O.H.P., Fernando, N.M.L., Wanninayaka, D.B., Dassanayake, R.S., Rajapaksha, S.M., Manamperi, A., Fernando, C.A.N., Kulatunga, A.K., Manipura, A., 2021. Development of Starch-Based Materials Using Current Modification Techniques and Their Applications: A Review. *Molecules* 26, 6880. <https://doi.org/10.3390/molecules26226880>
- Anthony, R.J., Sims, R.C., 2013. Optimization of cationic amino starch synthesis using biogenic amines. *Carbohydr. Polym.* 98, 1409–1415. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.043>
- Apriyanto, A., Compart, J., Fettke, J., 2022. A review of starch, a unique biopolymer – Structure, metabolism and in planta modifications. *Plant Sci.* 318, 111223. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111223>
- Aslzad, S., Savadi, P., Abdolahinia, E.D., Omid, Y., Fathi, M., Barar, J., 2022. Chitosan/dialdehyde starch hybrid in situ forming hydrogel for ocular delivery of betamethasone. *Mater. Today Commun.* 33, 104873. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104873>
- Asri, R.I.M., Harun, W.S.W., Samykano, M., Lah, N.A.C., Ghani, S.A.C., Tarlochan, F., Raza, M.R., 2017. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review. *Mater. Sci. Eng. C* 77, 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.102>
- Azizoğlu, E., Özer, Ö., 2020. Fabrication of Montelukast sodium loaded filaments and 3D printing transdermal patches onto packaging material. *Int. J. Pharm.* 587, 119588. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119588>
- Bagde, S., Rohera, B.D., 2024. Modification of the swelling behavior of a hydrophilic polymer as an approach to maintaining a constant gel layer thickness. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 92, 105294. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105294>
- Bajer, D., Burkowska-But, A., 2022. Innovative and environmentally safe composites based on starch modified with dialdehyde starch, caffeine, or ascorbic acid for

- applications in the food packaging industry. *Food Chem.* 374, 131639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131639>
- Barclay, T.G., Day, C.M., Petrovsky, N., Garg, S., 2019. Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery. *Carbohydr. Polym.* 221, 94–112. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.067>
- Barreto, P.L.M., Pires, A.T.N., Soldi, V., 2003. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polym. Degrad. Stab.* 79, 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00267-7)
- Berkkan, A., Kondolot Solak, E., Asman, G., 2021. Starch-Based Membranes for Controlled Release of 5-Fluorouracil In Vitro. *ChemistrySelect* 6, 5678–5684. <https://doi.org/10.1002/slct.202100917>
- Bernard, M., Jubeli, E., Pungente, M.D., Yagoubi, N., 2018. Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices – regulations, in vitro screening and risk-management. *Biomater. Sci.* 6, 2025–2053. <https://doi.org/10.1039/C8BM00518D>
- BG, P.K., Mehrotra, S., Marques, S.M., Kumar, L., Verma, R., 2023. 3D printing in personalized medicines: A focus on applications of the technology. *Mater. Today Commun.* 35, 105875. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.105875>
- Bogusz, K., Zuchora, M., Sencadas, V., Tehei, M., Lerch, M., Thorpe, N., Rosenfeld, A., Dou, S.X., Liu, H.K., Konstantinov, K., 2019. Synthesis of methotrexate-loaded tantalum pentoxide–poly(acrylic acid) nanoparticles for controlled drug release applications. *J. Colloid Interface Sci.* 538, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.11.097>
- Borbolla-Jiménez, F. V., Peña-Corona, S.I., Farah, S.J., Jiménez-Valdés, M.T., Pineda-Pérez, E., Romero-Montero, A., Del Prado-Audelo, M.L., Bernal-Chávez, S.A., Magaña, J.J., Leyva-Gómez, G., 2023. Films for Wound Healing Fabricated Using a Solvent Casting Technique. *Pharmaceutics* 15, 1914. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071914>
- Cao, W., Yan, J., Liu, C., Zhang, J., Wang, H., Gao, X., Yan, H., Niu, B., Li, W., 2020. Preparation and characterization of catechol-grafted chitosan/gelatin/modified chitosan-AgNP blend films. *Carbohydr. Polym.* 247, 116643. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116643>
- Celebioglu, A., Uyar, T., 2020. Hydrocortisone/cyclodextrin complex electrospun nanofibers for a fast-dissolving oral drug delivery system. *RSC Med. Chem.* 11, 245–258. <https://doi.org/10.1039/C9MD00390H>
- Chan, C.-C., Liou, C.-J., Xu, P.-Y., Shen, J.-J., Kuo, M.-L., Len, W.-B., Chang, L.-E., Huang, W.-C., 2013. Effect of dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse. *J. Dermatol. Sci.* 72, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.06.015>
- Chatterjee, S., Mahmood, S., Hilles, A.R., Thomas, S., Roy, S., Provaznik, V., Romero, E.L., Ghosal, K., 2023. Cationic starch: A functionalized polysaccharide based polymer for advancement of drug delivery and health care system - A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 248, 125757. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125757>

- Chaudhari, V.S., Malakar, T.K., Murty, U.S., Banerjee, S., 2021. Extruded filaments derived 3D printed medicated skin patch to mitigate destructive pulmonary tuberculosis: design to delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 18, 301–313. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1845648>
- Chemelli, A., Gomernik, F., Thaler, F., Huber, A., Hirn, U., Bauer, W., Spirk, S., 2020. Cationic starches in paper-based applications—A review on analytical methods. *Carbohydr. Polym.* 235, 115964. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115964>
- Chen, F.-M., Liu, X., 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.* 53, 86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>
- Chen, X., Shen, M., Yu, Q., Chen, Y., Xie, J., 2024. Recent advance in chemistry modified methods of natural polysaccharides and their applications. *Trends Food Sci. Technol.* 144, 104317. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104317>
- Cheng, Z., Lin, H., Wang, Z., Yang, X., Zhang, M., Liu, X., Wang, B., Wu, Z., Chen, D., 2020. Preparation and characterization of dissolving hyaluronic acid composite microneedles loaded micelles for delivery of curcumin. *Drug Deliv. Transl. Res.* 10, 1520–1530. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00735-2>
- Chillingworth, N.L., Donaldson, L.F., 2003. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. *J. Neurosci. Methods* 128, 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(03\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(03)00147-X)
- Chuah, L.-H., Loo, H.-L., Goh, C.F., Fu, J.-Y., Ng, S.-F., 2023. Chitosan-based drug delivery systems for skin atopic dermatitis: recent advancements and patent trends. *Drug Deliv. Transl. Res.* 13, 1436–1455. <https://doi.org/10.1007/s13346-023-01307-w>
- Ciro, Y., Rojas, J., Yarce, C.J., Salamanca, C.H., 2019. Production and Characterization of Glutathione-Chitosan Conjugate Films as Systems for Localized Release of Methotrexate. *Polymers (Basel)*. 11, 2032. <https://doi.org/10.3390/polym11122032>
- Colussi, R., Pinto, V.Z., El Halal, S.L.M., Vanier, N.L., Villanova, F.A., Marques e Silva, R., da Rosa Zavareze, E., Dias, A.R.G., 2014. Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. *Carbohydr. Polym.* 103, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.070>
- Compart, J., Li, X., Fettke, J., 2021. Starch-A complex and undeciphered biopolymer. *J. Plant Physiol.* 258–259, 153389. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153389>
- Compart, J., Singh, A., Fettke, J., Apriyanto, A., 2023. Customizing Starch Properties: A Review of Starch Modifications and Their Applications. *Polymers (Basel)*. 15, 3491. <https://doi.org/10.3390/polym15163491>
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., Tang, M.C., 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocoll.* 23, 1527–1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Costa-Júnior, E.S., Barbosa-Stancioli, E.F., Mansur, A.A.P., Vasconcelos, W.L., Mansur, H.S., 2009. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl

- alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 76, 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.015>
- Cui, T., Sun, Y., Wu, Y., Wang, J., Ding, Y., Cheng, J., Guo, M., 2022. Mechanical, microstructural, and rheological characterization of gelatin-dialdehyde starch hydrogels constructed by dual dynamic crosslinking. *LWT* 161, 113374. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113374>
- Dash, R., Foston, M., Ragauskas, A.J., 2013. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydr. Polym.* 91, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.080>
- Davoudi, Z., Rabiee, M., Houshmand, B., Eslahi, N., Khoshroo, K., Rasoulianboroujeni, M., Tahriri, M., Tayebi, L., 2018. Development of chitosan/gelatin/keratin composite containing hydrocortisone sodium succinate as a buccal mucoadhesive patch to treat desquamative gingivitis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 40–55. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1371738>
- Deng, L., Kang, X., Liu, Y., Feng, F., Zhang, H., 2018. Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting. *Food Hydrocoll.* 74, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.023>
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D.S., 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Int. J. Polym. Sci.* 2011, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2011/290602>
- Dhanka, M., Shetty, C., Srivastava, R., 2018. Methotrexate loaded gellan gum microparticles for drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 110, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.026>
- Dong, D., Hao, T., Wang, C., Zhang, Y., Qin, Z., Yang, B., Fang, W., Ye, L., Yao, F., Li, J., 2018. Zwitterionic starch-based hydrogel for the expansion and “stemness” maintenance of brown adipose derived stem cells. *Biomaterials* 157, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.011>
- Economidou, S.N., Lamprou, D.A., Douroumis, D., 2018. 3D printing applications for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.* 544, 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.031>
- Efthimiadou, E.K., Metaxa, A.-F., Kordas, G., 2015. Modified Polysaccharides for Drug Delivery, in: *Polysaccharides*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1805–1835. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_23
- El-Naggar, M.E., El-Rafie, M.H., El-sheikh, M.A., El-Feky, G.S., Hebeish, A., 2015. Synthesis, characterization, release kinetics and toxicity profile of drug-loaded starch nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 718–729. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.005>
- El-Zaher, N.A., Osiris, W.G., 2005. Thermal and structural properties of poly(vinyl alcohol) doped with hydroxypropyl cellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 96, 1914–1923. <https://doi.org/10.1002/app.21628>
- Ezike, T.C., Okpala, U.S., Onoja, U.L., Nwike, C.P., Ezeako, E.C., Okpara, O.J., Okoroafor, C.C., Eze, S.C., Kalu, O.L., Odoh, E.C., Nwadike, U.G., Ogbodo, J.O., Umeh, B.U., Ossai, E.C., Nwanguma, B.C., 2023. Advances in drug delivery

- systems, challenges and future directions. *Heliyon* 9, e17488. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17488>
- Falcão, L. de S., Coelho, D.B., Veggi, P.C., Campelo, P.H., Albuquerque, P.M., de Moraes, M.A., 2022. Starch as a Matrix for Incorporation and Release of Bioactive Compounds: Fundamentals and Applications. *Polymers (Basel)*. 14, 2361. <https://doi.org/10.3390/polym14122361>
- Falsafi, S.R., Topuz, F., Rostamabadi, H., 2023. Dialdehyde carbohydrates – Advanced functional materials for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 321, 121276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121276>
- Fang, H., Zhu, D., Yang, Q., Chen, Y., Zhang, C., Gao, J., Gao, Y., 2022. Emerging zero-dimensional to four-dimensional biomaterials for bone regeneration. *J. Nanobiotechnology* 20, 26. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01228-1>
- Fenton, O.S., Olafson, K.N., Pillai, P.S., Mitchell, M.J., Langer, R., 2018. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Adv. Mater.* 30. <https://doi.org/10.1002/adma.201705328>
- Fernández-Villa, D., Ramírez-Jiménez, R.A., Aranaz, I., Acosta, N., Vázquez-Lasa, B., Rojo, L., 2022. Development of Methotrexate Complexes Endowed with New Biological Properties Envisioned for Musculoskeletal Regeneration in Rheumatoid Arthritis Environments. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 10054. <https://doi.org/10.3390/ijms231710054>
- FIEDOROWICZ, M., PARA, A., 2006. Structural and molecular properties of dialdehyde starch. *Carbohydr. Polym.* 63, 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.054>
- Foot, M., Mulholland, M., 2005. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.026>
- Friedman, B., Cronstein, B., 2019. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Jt. Bone Spine* 86, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.07.004>
- Fu, Y., Kao, W.J., 2010. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 429–444. <https://doi.org/10.1517/17425241003602259>
- Gao, Y., Hou, M., Yang, R., Zhang, L., Xu, Z., Kang, Y., Xue, P., 2019. Transdermal delivery of therapeutics through dissolvable gelatin/sucrose films coated on PEGDA microneedle arrays with improved skin permeability. *J. Mater. Chem. B* 7, 7515–7524. <https://doi.org/10.1039/C9TB01994D>
- Garg, N.K., Tyagi, R.K., Singh, B., Sharma, G., Nirbhavane, P., Kushwah, V., Jain, S., Katare, O.P., 2016. Nanostructured lipid carrier mediates effective delivery of methotrexate to induce apoptosis of rheumatoid arthritis via NF- κ B and FOXO1. *Int. J. Pharm.* 499, 301–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.061>
- Gillispie, G., Prim, P., Copus, J., Fisher, J., Mikos, A.G., Yoo, J.J., Atala, A., Lee, S.J., 2020. Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability.

- Biofabrication 12, 022003. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6f0d>
- Golachowski, A., Drożdż, W., Golachowska, M., Kapelko-Żeberska, M., Raszewski, B., 2020. Production and Properties of Starch Citrates—Current Research. *Foods* 9, 1311. <https://doi.org/10.3390/foods9091311>
- Guastaldi, A.C., Aparecida, A.H., 2010. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim. Nova* 33, 1352–1358. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600025>
- Gularte, M.S., Anghinoni, J.M., Abenante, L., Voss, G.T., de Oliveira, R.L., Vaucher, R.A., Luchese, C., Wilhelm, E.A., Lenardão, E.J., Fajardo, A.R., 2019. Synthesis of chitosan derivatives with organoselenium and organosulfur compounds: Characterization, antimicrobial properties and application as biomaterials. *Carbohydr. Polym.* 219, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.040>
- Gularte, M.S., Quadrado, R.F.N., Pedra, N.S., Soares, M.S.P., Bona, N.P., Spanevello, R.M., Fajardo, A.R., 2020. Preparation, characterization and antitumor activity of a cationic starch-derivative membrane embedded with a β -cyclodextrin/curcumin inclusion complex. *Int. J. Biol. Macromol.* 148, 140–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.104>
- Hawthorne, D., Pannala, A., Sandeman, S., Lloyd, A., 2022. Sustained and targeted delivery of hydrophilic drug compounds: A review of existing and novel technologies from bench to bedside. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 78, 103936. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103936>
- Heinze, T., Haack, V., Rensing, S., 2004. Starch Derivatives of High Degree of Functionalization. 7. Preparation of Cationic 2-Hydroxypropyltrimethylammonium Chloride Starches. *Starch - Stärke* 56, 288–296. <https://doi.org/10.1002/star.200300243>
- Hemrajani, C., Negi, P., Parashar, A., Gupta, G., Jha, N.K., Singh, S.K., Chellappan, D.K., Dua, K., 2022. Overcoming drug delivery barriers and challenges in topical therapy of atopic dermatitis: A nanotechnological perspective. *Biomed. Pharmacother.* 147, 112633. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112633>
- Hench, L.L., Polak, J.M., 2002. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* (80-.). 295, 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.1067404>
- Hodge, J.G., Zamierowski, D.S., Robinson, J.L., Mellott, A.J., 2022. Evaluating polymeric biomaterials to improve next generation wound dressing design. *Biomater. Res.* 26. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00291-5>
- Ishchenko, O., Plavan, V., Valeika, V., Koliada, M., Liashok, I., Budash, Y., Bessarabov, V., 2022. Modified Starch in Composition with Polyvinyl Alcohol as a Basis for Development of the Polymeric Materials for Pharmaceutical Use. *Starch - Stärke* 74. <https://doi.org/10.1002/star.202200062>
- Jardim, K.V., Joanitti, G.A., Azevedo, R.B., Parize, A.L., 2015. Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* 56, 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.036>

- Jelkmann, M., Lechner, C., Menzel, C., Krebs, V., Bernkop-Schnürch, A., 2019. Cationic starch derivatives as mucoadhesive and soluble excipients in drug delivery. *Int. J. Pharm.* 570, 118664. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118664>
- Kämmerling, L., Fisher, L.E., Antmen, E., Simsek, G.M., Rostam, H.M., Vrana, N.E., Ghaemmaghami, A.M., 2021. Mitigating the foreign body response through 'immune-instructive' biomaterials. *J. Immunol. Regen. Med.* 12, 100040. <https://doi.org/10.1016/j.regen.2021.100040>
- Kanikireddy, V., Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Karthikeyan, C., Sadiku, R., 2020. Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 164, 963–975. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.160>
- Kargutkar, S., Brijesh, S., 2016. Anti-rheumatic activity of Ananas comosus fruit peel extract in a complete Freund's adjuvant rat model. *Pharm. Biol.* 54, 2616–2622. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1173066>
- Killinger, W.E., Murray, D., Hatfield, G.R., Hassler, T., 1995. Determination of the Degree of Cationicity in Cationic Starches by Solid-State ¹³C NMR Spectroscopy. *Starch - Stärke* 47, 311–314. <https://doi.org/10.1002/star.19950470806>
- Kim, H.-S., Yun, Y.-H., Shim, W.-G., Yoon, S.-D., 2021. Preparation and evaluation of functional allopurinol imprinted starch based biomaterials for transdermal drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 175, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.004>
- Kim, W.-J., Koo, J.-H., Cho, H.-J., Lee, J.-U., Kim, J.Y., Lee, H.-G., Lee, S., Kim, J.H., Oh, M.S., Suh, M., Shin, E.-C., Ko, J.Y., Sohn, M.H., Choi, J.-M., 2018. Protein tyrosine phosphatase conjugated with a novel transdermal delivery peptide, astrotactin 1-derived peptide recombinant protein tyrosine phosphatase (AP-rPTP), alleviates both atopic dermatitis-like and psoriasis-like dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.007>
- Kolbe, L., Kligman, A.M., Schreiner, V., Stoudemayer, T., 2001. Corticosteroid-induced atrophy and barrier impairment measured by non-invasive methods in human skin. *Ski. Res. Technol.* 7, 73–77. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0846.2001.70203.x>
- Kong, U., Mohammad Rawi, N.F., Tay, G.S., 2023. The Potential Applications of Reinforced Bioplastics in Various Industries: A Review. *Polymers (Basel)*. 15, 2399. <https://doi.org/10.3390/polym15102399>
- Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A., 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15, 25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
- Kumar, A., Dhaliwal, N., Dhaliwal, J., Dharavath, R.N., Chopra, K., 2020. Astaxanthin attenuates oxidative stress and inflammatory responses in complete Freund-adjuvant-induced arthritis in rats. *Pharmacol. Reports* 72, 104–114. <https://doi.org/10.1007/s43440-019-00022-z>
- Largo, R., Roman-Blas, J.A., Moreno-Rubio, J., Sánchez-Pernaute, O., Martínez-Calatrava, M.J., Castañeda, S., Herrero-Beaumont, G., 2010. Chondroitin sulfate

- improves synovitis in rabbits with chronic antigen-induced arthritis. *Osteoarthr. Cartil.* 18, S17–S23. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.01.017>
- Lau, E., Giddings, S., Mohammed, S., Dubois, P., Johnson, S., Stanley, R., Halley, P., Steadman, K., 2013. Encapsulation of Hydrocortisone and Mesalazine in Zein Microparticles. *Pharmaceutics* 5, 277–293. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5020277>
- Lee, C.-S., Hwang, H.S., 2023. Starch-Based Hydrogels as a Drug Delivery System in Biomedical Applications. *Gels* 9, 951. <https://doi.org/10.3390/gels9120951>
- Lee, S.-H., Shin, S.-R., Lee, D.-S., 2019. Self-healing of cross-linked PU via dual-dynamic covalent bonds of a Schiff base from cystine and vanillin. *Mater. Des.* 172, 107774. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.107774>
- Lefnaoui, S., Moulai-Mostefa, N., 2015. Synthesis and evaluation of the structural and physicochemical properties of carboxymethyl pregelatinized starch as a pharmaceutical excipient. *Saudi Pharm. J.* 23, 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.01.021>
- Lemos, P.V.F., Marcelino, H.R., Cardoso, L.G., Souza, C.O. de, Druzian, J.I., 2021. Starch chemical modifications applied to drug delivery systems: From fundamentals to FDA-approved raw materials. *Int. J. Biol. Macromol.* 184, 218–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.077>
- Lewicka, K., Siemion, P., Kurcok, P., 2015. Chemical Modifications of Starch: Microwave Effect. *Int. J. Polym. Sci.* 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/867697>
- Li, J., Zhou, M., Cheng, F., Lin, Y., Shi, L., Zhu, P.-X., 2020. Preparation of oxidized corn starch with high degree of oxidation by fenton-like oxidation assisted with ball milling. *Mater. Today Commun.* 22, 100793. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.100793>
- Lifshiz Zimon, R., Lerman, G., Elharrar, E., Meningher, T., Barzilai, A., Masalha, M., Chintakunta, R., Hollander, E., Goldbart, R., Traitel, T., Harats, M., Sidi, Y., Avni, D., Kost, J., 2018. Ultrasound targeting of Q-starch/miR-197 complexes for topical treatment of psoriasis. *J. Control. Release* 284, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.040>
- Ling, M.-H., Chen, M.-C., 2013. Dissolving polymer microneedle patches for rapid and efficient transdermal delivery of insulin to diabetic rats. *Acta Biomater.* 9, 8952–8961. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.029>
- Liu, C., Han, Y., Teng, C., Ma, H., Tao, B., Yang, F., 2023. Residue dynamics of floryprauxifen-benzyl and its effects on bacterial community structure in paddy soil of Northeast China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 249, 114390. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114390>
- Liu, T., Ren, Q., Wang, S., Gao, J., Shen, C., Zhang, S., Wang, Y., Guan, F., 2023. Chemical Modification of Polysaccharides: A Review of Synthetic Approaches, Biological Activity and the Structure–Activity Relationship. *Molecules* 28, 6073. <https://doi.org/10.3390/molecules28166073>
- Lopes, P., Joaquineto, A.S.M., Ribeiro, A., Moura, N.M.M., Gomes, A.T.P., Guerreiro,

- S.G., Faustino, M.A.F., Almeida, A., Ferreira, P., Coimbra, M.A., Neves, M.G.P.M.S., Gonçalves, I., 2023. Starch-based films doped with porphyrinoid photosensitizers for active skin wound healing. *Carbohydr. Polym.* 313, 120894. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120894>
- Lopina, S.T., Kanjickal, D.G., 2004. Modeling of Drug Release from Polymeric Delivery Systems? A Review; *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 21, 345–386. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v21.i5.10>
- Luo, M., Zhang, X., Wu, J., Zhao, J., 2021. Modifications of polysaccharide-based biomaterials under structure-property relationship for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 266, 118097. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118097>
- Macdonald, A.D., Woolfe, G., Bergel, F., Morrison, A.L., Rinderknecht, H., 1946. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 1, 4–14.
- Macedo, L.B., Nogueira-Librelotto, D.R., Mathes, D., de Vargas, J.M., da Rosa, R.M., Rodrigues, O.E.D., Vinardell, M.P., Mitjans, M., Rolim, C.M.B., 2021. Overcoming MDR by Associating Doxorubicin and pH-Sensitive PLGA Nanoparticles Containing a Novel Organoselenium Compound—An In Vitro Study. *Pharmaceutics* 14, 80. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010080>
- Mahtab, A., Rabbani, S.A., Neupane, Y.R., Pandey, S., Ahmad, A., Khan, M.A., Gupta, N., Madaan, A., Jaggi, M., Sandal, N., Rawat, H., Aqil, M., Talegaonkar, S., 2020. Facile functionalization of Teriflunomide-loaded nanoliposomes with Chondroitin sulphate for the treatment of Rheumatoid arthritis. *Carbohydr. Polym.* 250, 116926. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116926>
- Malik, M.K., Bhatt, P., Kumar, T., Singh, J., Kumar, V., Faruk, A., Fuloria, S., Fuloria, N.K., Subrimanyan, V., Kumar, S., 2023. Significance of Chemically Derivatized Starch as Drug Carrier in Developing Novel Drug Delivery Devices. *Nat. Prod. J.* 13. <https://doi.org/10.2174/2210315512666220819112334>
- Maurizii, G., Moroni, S., Khorshid, S., Aluigi, A., Tiboni, M., Casettari, L., 2023. 3D-printed EVA-based patches manufactured by direct powder extrusion for personalized transdermal therapies. *Int. J. Pharm.* 635, 122720. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122720>
- Mehtani, D., Seth, A., Sharma, P., Maheshwari, N., Kapoor, D., Shrivastava, S.K., Tekade, R.K., 2019. Biomaterials for Sustained and Controlled Delivery of Small Drug Molecules, in: *Biomaterials and Bionanotechnology*. Elsevier, pp. 89–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00004-4>
- Mongia, N.K., Anseth, K.S., Peppas, N.A., 1996. Mucoadhesive poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freezing/thawing processes: Applications in the development of wound healing systems. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7, 1055–1064. <https://doi.org/10.1163/156856296X00543>
- Montoya-Yepes, D.F., Jiménez-Rodríguez, A.A., Aldana-Porras, A.E., Velásquez-Holguin, L.F., Méndez-Arteaga, J.J., Murillo-Arango, W., 2024. Starches in the encapsulation of plant active ingredients: state of the art and research trends. *Polym. Bull.* 81, 135–163. <https://doi.org/10.1007/s00289-023-04724-6>
- Moreno, O., Cárdenas, J., Atarés, L., Chiralt, A., 2017. Influence of starch oxidation on

- the functionality of starch-gelatin based active films. *Carbohydr. Polym.* 178, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.128>
- Mulhbacher, J., Ispas-Szabo, P., Lenaerts, V., Mateescu, M.A., 2001. Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. *J. Control. Release* 76, 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00425-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00425-4)
- Naghieh, S., Chen, X., 2021. Printability—A key issue in extrusion-based bioprinting. *J. Pharm. Anal.* 11, 564–579. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.02.001>
- Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32, 762–798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
- Naseri, E., Ahmadi, A., 2022. A review on wound dressings: Antimicrobial agents, biomaterials, fabrication techniques, and stimuli-responsive drug release. *Eur. Polym. J.* 173, 111293. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111293>
- Nornberg, A.B., Martins, C.C., Cervi, V.F., Sari, M.H.M., Cruz, L., Luchese, C., Wilhelm, E.A., Fajardo, A.R., 2022. Transdermal release of methotrexate by cationic starch/poly(vinyl alcohol)-based films as an approach for rheumatoid arthritis treatment. *Int. J. Pharm.* 611, 121285. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121285>
- O'Brien, F.J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* 14, 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Ødegaard, K.S., Torgersen, J., Elverum, C.W., 2020. Structural and Biomedical Properties of Common Additively Manufactured Biomaterials: A Concise Review. *Metals (Basel)*. 10, 1677. <https://doi.org/10.3390/met10121677>
- Ogunsona, E., Ojogbo, E., Mekonnen, T., 2018. Advanced material applications of starch and its derivatives. *Eur. Polym. J.* 108, 570–581. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.09.039>
- Ojogbo, E., Ogunsona, E.O., Mekonnen, T.H., 2020. Chemical and physical modifications of starch for renewable polymeric materials. *Mater. Today Sustain.* 7–8, 100028. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2019.100028>
- Oleksy, M., Dynarowicz, K., Aebisher, D., 2023. Advances in Biodegradable Polymers and Biomaterials for Medical Applications—A Review. *Molecules* 28, 6213. <https://doi.org/10.3390/molecules28176213>
- Oliveira, S.M., Mijares, D.Q., Turner, G., Amaral, I.F., Barbosa, M.A., Teixeira, C.C., 2009. Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies. *Tissue Eng. Part A* 15, 635–643. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0052>
- Omorogbe, O., Ajayi, A.M., Ben-Azu, B., Oghwere, E.E., Adebisin, A., Aderibigbe, A.O., Okubena, O., Umukoro, S., 2018. Jobelyn® attenuates inflammatory responses and neurobehavioural deficits associated with complete Freund-adjuvant-induced arthritis in mice. *Biomed. Pharmacother.* 98, 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.098>
- Panasenko, O.M., 1997. The mechanism of the hypochlorite-induced lipid peroxidation. *BioFactors* 6, 181–190. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060212>

- Parhi, R., 2023. Recent advances in 3D printed microneedles and their skin delivery application in the treatment of various diseases. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 84, 104395. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104395>
- Park, K., 2014. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *J. Control. Release* 190, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.054>
- Patrick, K.S., 2002. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Edition Edited by J. G. Hardman, L. E. Limbird, and A. G. Gilman. McGraw Hill, New York. 2001. xxvii + 2148 pp. 21 × 26 cm. ISBN 0-07-1354469-7. \$125.00. *J. Med. Chem.* 45, 1392–1393. <https://doi.org/10.1021/jm020026w>
- Paxton, N., Smolan, W., Böck, T., Melchels, F., Groll, J., Jungst, T., 2017. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication* 9, 044107. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8>
- Petta, D., Grijpma, D.W., Alini, M., Eglin, D., D'Este, M., 2018. Three-Dimensional Printing of a Tyramine Hyaluronan Derivative with Double Gelation Mechanism for Independent Tuning of Shear Thinning and Postprinting Curing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4, 3088–3098. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00416>
- Pires, A.L.R., Bierhalz, A.C.K., Moraes, Â.M., 2015. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. *Quim. Nova.* <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>
- Prasad, R., Koul, V., 2012. Transdermal Delivery of Methotrexate: past, Present and Future Prospects. *Ther. Deliv.* 3, 315–325. <https://doi.org/10.4155/tde.12.3>
- Qamruzzaman, M., Ahmed, F., Mondal, M.I.H., 2022. An Overview on Starch-Based Sustainable Hydrogels: Potential Applications and Aspects. *J. Polym. Environ.* 30, 19–50. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02180-9>
- Qindeel, M., Khan, D., Ahmed, N., Khan, S., Asim, ur.Rehman, 2020. Surfactant-Free, Self-Assembled Nanomicelles-Based Transdermal Hydrogel for Safe and Targeted Delivery of Methotrexate against Rheumatoid Arthritis. *ACS Nano* 14, 4662–4681. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00364>
- Qu, W., Qader, I.B., Abbott, A.P., 2022. Controlled release of pharmaceutical agents using eutectic modified gelatin. *Drug Deliv. Transl. Res.* 12, 1187–1194. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00998-3>
- Queiroz, V.M., Kling, I.C.S., Eltom, A.E., Archanjo, B.S., Prado, M., Simão, R.A., 2020. Corn starch films as a long-term drug delivery system for chlorhexidine gluconate. *Mater. Sci. Eng. C* 112, 110852. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110852>
- Quiñonez-Flores, C.M., González-Chávez, S.A., Del Río Nájera, D., Pacheco-Tena, C., 2016. Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review. *Biomed Res. Int.* 2016, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2016/6097417>
- Rahmati, M., Blaker, J.J., Lyngstadaas, S.P., Mano, J.F., Haugen, H.J., 2020. Designing multigradient biomaterials for skin regeneration. *Mater. Today Adv.* 5, 100051. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100051>

- Raine, C., Giles, I., 2022. What is the impact of sex hormones on the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Front. Med.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.909879>
- Ram Prasad, S., Jayakrishnan, A., Sampath Kumar, T.S., 2019. Hydroxyapatite-poly(vinyl alcohol) core-shell nanoparticles for dual delivery of methotrexate and gemcitabine for bone cancer treatment. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51, 629–638. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.041>
- Razali, M.A.A., Sanusi, N., Ismail, H., Othman, N., Ariffin, A., 2012. Application of response surface methodology (RSM) for optimization of cassava starch grafted polyDADMAC synthesis for cationic properties. *Starch - Stärke* 64, 935–943. <https://doi.org/10.1002/star.201200007>
- Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Miyamaru, L., Cruz, Á.S., 2003. Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials. *Artif. Organs* 27, 424–427. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.2003.07249.x>
- Rostamizadeh, K., Manafi, M., Nosrati, H., Kheiri Manjili, H., Danafar, H., 2018. Methotrexate-conjugated mPEG–PCL copolymers: a novel approach for dual triggered drug delivery. *New J. Chem.* 42, 5937–5945. <https://doi.org/10.1039/C7NJ04864E>
- Sabbagh, F., Kim, B.S., 2022. Recent advances in polymeric transdermal drug delivery systems. *J. Control. Release* 341, 132–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.11.025>
- Saboktakin, M.R., Akhyari, S., Nasirov, F.A., 2014. Synthesis and characterization of modified starch/polybutadiene as novel transdermal drug delivery system. *Int. J. Biol. Macromol.* 69, 442–446. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.062>
- Saghazadeh, S., Rinoldi, C., Schot, M., Kashaf, S.S., Sharifi, F., Jalilian, E., Nuutila, K., Giatsidis, G., Mostafalu, P., Derakhshandeh, H., Yue, K., Swieszkowski, W., Memic, A., Tamayol, A., Khademhosseini, A., 2018. Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 127, 138–166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008>
- Saito, K., Takenouchi, O., Nukada, Y., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., 2017. An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicol. Vit.* 40, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.005>
- Santander-Ortega, M.J., Stauner, T., Loretz, B., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-González, D., Wenz, G., Schaefer, U.F., Lehr, C.M., 2010. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. *J. Control. Release* 141, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.08.012>
- Santos, L.F., Correia, I.J., Silva, A.S., Mano, J.F., 2018. Biomaterials for drug delivery patches. *Eur. J. Pharm. Sci.* 118, 49–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.020>
- Sarder, R., Piner, E., Rios, D.C., Chacon, L., Artner, M.A., Barrios, N., Argyropoulos, D., 2022. Copolymers of starch, a sustainable template for biomedical applications: A review. *Carbohydr. Polym.* 278, 118973. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118973>

- Schwab, A., Levato, R., D'Este, M., Piluso, S., Eglin, D., Malda, J., 2020. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chem. Rev.* 120, 11028–11055. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00084>
- Şen, F., Uzunsoy, İ., Baştürk, E., Kahraman, M.V., 2017. Antimicrobial agent-free hybrid cationic starch/sodium alginate polyelectrolyte films for food packaging materials. *Carbohydr. Polym.* 170, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.079>
- Shukla, S., Mamale, K.B., Arya, R.K.K., Kaundal, R.K., Shukla, R., 2023. Therapeutic potential of microneedles based delivery systems for the management of atopic dermatitis. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 84, 104493. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104493>
- Siddique, M.I., Katas, H., Jamil, A., Mohd Amin, M.C.I., Ng, S.-F., Zulfakar, M.H., Nadeem, S.M., 2019. Potential treatment of atopic dermatitis: tolerability and safety of cream containing nanoparticles loaded with hydrocortisone and hydroxytyrosol in human subjects. *Drug Deliv. Transl. Res.* 9, 469–481. <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0439-7>
- Siddiqui, B., ur Rehman, A., Gul, R., Chaudhery, I., Shah, K.U., Ahmed, N., 2024. Folate decorated chitosan-chondroitin sulfate nanoparticles loaded hydrogel for targeting macrophages against rheumatoid arthritis. *Carbohydr. Polym.* 327, 121683. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121683>
- SIMONI, R.C., LEMES, G.F., FIALHO, S., GONÇALVES, O.H., GOZZO, A.M., CHIARADIA, V., SAYER, C., SHIRAI, M.A., LEIMANN, F. V., 2017. Effect of drying method on mechanical, thermal and water absorption properties of enzymatically crosslinked gelatin hydrogels. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 745–755. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160241>
- Sivasankarapillai, V.S., Das, S.S., Sabir, F., Sundaramahalingam, M.A., Colmenares, J.C., Prasannakumar, S., Rajan, M., Rahdar, A., Kyzas, G.Z., 2021. Progress in natural polymer engineered biomaterials for transdermal drug delivery systems. *Mater. Today Chem.* 19, 100382. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100382>
- Smith, J.A., Li, S., Mele, E., Goulas, A., Engstrøm, D., Silberschmidt, V. V., 2021. Printability and mechanical performance of biomedical PDMS-PEEK composites developed for material extrusion. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 115, 104291. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104291>
- Song, R., Murphy, M., Li, C., Ting, K., Soo, C., Zheng, Z., 2018. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Des. Devel. Ther.* Volume 12, 3117–3145. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S165440>
- Sood, A., Gupta, A., Agrawal, G., 2021. Recent advances in polysaccharides based biomaterials for drug delivery and tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 2, 100067. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100067>
- Stamp, L.K., Taylor, W.J., Jones, P.B., Dockerty, J.L., Drake, J., Frampton, C., Dalbeth, N., 2012. Starting dose is a risk factor for allopurinol hypersensitivity syndrome: A proposed safe starting dose of allopurinol. *Arthritis Rheum.* 64, 2529–2536. <https://doi.org/10.1002/art.34488>
- Strzepa, A., Pritchard, K.A., Dittel, B.N., 2017. Myeloperoxidase: A new player in

- autoimmunity. *Cell. Immunol.* 317, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.002>
- Sujka, M., Wiącek, A.E., 2024. Physicochemical Characteristics of Porous Starch Obtained by Combined Physical and Enzymatic Methods, Part 1: Structure, Adsorption, and Functional Properties. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 1662.
<https://doi.org/10.3390/ijms25031662>
- Sukhija, S., Singh, S., Riar, C.S., 2016. Effect of oxidation, cross-linking and dual modification on physicochemical, crystallinity, morphological, pasting and thermal characteristics of elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*) starch. *Food Hydrocoll.* 55, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.003>
- Sun, F., Shan, P., Liu, B., Li, Y., Wang, K., Zhuang, Y., Ning, D., Li, H., 2024. Gelatin-based multifunctional composite films integrated with dialdehyde carboxymethyl cellulose and coffee leaf extract for active food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* 263, 130302. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130302>
- Tabata, Y., 2009. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J. R. Soc. Interface* 6. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0448.focus>
- Tada, M., Inui, K., Okano, T., Mamoto, K., Koike, T., Nakamura, H., 2019. Safety of Intra-articular Methotrexate Injection With and Without Electroporation for Inflammatory Small Joints in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* 12, 117954411988630. <https://doi.org/10.1177/1179544119886303>
- Tak, H.-Y., Yun, Y.-H., Lee, C.-M., Yoon, S.-D., 2019. Sulindac imprinted mungbean starch/PVA biomaterial films as a transdermal drug delivery patch. *Carbohydr. Polym.* 208, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.076>
- Tan, W., Li, Q., Wang, H., Liu, Y., Zhang, J., Dong, F., Guo, Z., 2016. Synthesis, characterization, and antibacterial property of novel starch derivatives with 1,2,3-triazole. *Carbohydr. Polym.* 142, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.007>
- Tang, Y., Lan, X., Liang, C., Zhong, Z., Xie, R., Zhou, Y., Miao, X., Wang, H., Wang, W., 2019. Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing. *Carbohydr. Polym.* 219, 113–120.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.004>
- Tekko, I.A., Chen, G., Domínguez-Robles, J., Thakur, R.R.S., Hamdan, I.M.N., Vora, L., Larrañeta, E., McElroy, J.C., McCarthy, H.O., Rooney, M., Donnelly, R.F., 2020. Development and characterisation of novel poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl pyrrolidone)-based hydrogel-forming microneedle arrays for enhanced and sustained transdermal delivery of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 586, 119580.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119580>
- Thang, N.H., Chien, T.B., Cuong, D.X., 2023. Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview. *Gels* 9, 523. <https://doi.org/10.3390/gels9070523>
- Trucillo, P., 2024. Biomaterials for Drug Delivery and Human Applications. *Materials (Basel)*. 17, 456. <https://doi.org/10.3390/ma17020456>
- Ulery, B.D., Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2011. Biomedical applications of biodegradable

- polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 49, 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
- Utrilla-Coello, R.G., Hernández-Jaimes, C., Carrillo-Navas, H., González, F., Rodríguez, E., Bello-Pérez, L.A., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J., 2014. Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. *Carbohydr. Polym.* 103, 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.046>
- Vaiani, L., Boccaccio, A., Uva, A.E., Palumbo, G., Piccininni, A., Guglielmi, P., Cantore, S., Santacroce, L., Charitos, I.A., Ballini, A., 2023. Ceramic Materials for Biomedical Applications: An Overview on Properties and Fabrication Processes. *J. Funct. Biomater.* 14, 146. <https://doi.org/10.3390/jfb14030146>
- Vanier, N.L., El Halal, S.L.M., Dias, A.R.G., da Rosa Zavareze, E., 2017. Molecular structure, functionality and applications of oxidized starches: A review. *Food Chem.* 221, 1546–1559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.138>
- Vasconcelos Oliveira, A.P., de Abreu Feitosa, V., de Oliveira, J.M., Coelho, A.L., de Araújo P. Vieira, L., de Assis Rocha da Silva, F., de Assis Avelino Figueredo Sobrinho, F., Duarte, E.B., de Souza, B.W., de Sá Moreira de Souza Filho, M., 2017. Characteristics of Chondroitin Sulfate Extracted of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Processing. *Procedia Eng.* 200, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.028>
- Vítková, L., Kazantseva, N., Musilová, L., Smolka, P., Valášková, K., Kocourková, K., Humeník, M., Minařík, A., Humpolíček, P., Mráček, A., Smolková, I., 2023. Magneto-responsive hyaluronan hydrogel for hyperthermia and bioprinting: Magnetic, rheological properties and biocompatibility. *APL Bioeng.* 7. <https://doi.org/10.1063/5.0147181>
- Vivcharenko, V., Wojcik, M., Palka, K., Przekora, A., 2021. Highly Porous and Superabsorbent Biomaterial Made of Marine-Derived Polysaccharides and Ascorbic Acid as an Optimal Dressing for Exuding Wound Management. *Materials (Basel)*. 14, 1211. <https://doi.org/10.3390/ma14051211>
- Voss, G.T., Gularte, M.S., de Oliveira, R.L., Luchese, C., Fajardo, A.R., Wilhelm, E.A., 2020. Biopolymeric films as delivery vehicles for controlled release of hydrocortisone: Promising devices to treat chronic skin diseases. *Mater. Sci. Eng. C* 114, 111074. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111074>
- Waiprib, R., Boonme, P., Taweepreda, W., Kalkornsurapranee, E., Suksaeree, J., Pichayakorn, W., 2017. Deproteinized natural rubber latex/gelatinized starch blended films as drug delivery carrier. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* 148, 1223–1228. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2005-x>
- Wang, J., Zhao, W., Chen, H., Qin, A., Zhu, P., 2017. Anti-tumor Study of Chondroitin Sulfate-Methotrexate Nanogels. *Nanoscale Res. Lett.* 12, 572. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2324-1>
- Wang, N., Shan, Z., Jia, X., Wang, Y., Song, S., Xiao, D., Wang, C., Guo, Q., 2023. Galf-containing polysaccharides from medicinal molds: Sources, structures and bioactive properties. *Trends Food Sci. Technol.* 131, 244–263. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.11.026>

- Wang, W., Zhou, H., Liu, L., 2018. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur. J. Med. Chem.* 158, 502–516. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.027>
- Wang, Y., Xie, W., 2010. Synthesis of cationic starch with a high degree of substitution in an ionic liquid. *Carbohydr. Polym.* 80, 1172–1177. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.042>
- Wang, Z., Xie, J., Shen, M., Nie, S., Xie, M., 2018. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities. *Trends Food Sci. Technol.* 74, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.010>
- Watcharakitti, J., Win, E.E., Nimnuan, J., Smith, S.M., 2022. Modified Starch-Based Adhesives: A Review. *Polymers (Basel)*. 14, 2023. <https://doi.org/10.3390/polym14102023>
- Weidinger, S., Novak, N., 2016. Atopic dermatitis. *Lancet* 387, 1109–1122. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00149-X)
- Willfahrt, A., Steiner, E., Hötzel, J., Crispin, X., 2019. Printable acid-modified corn starch as non-toxic, disposable hydrogel-polymer electrolyte in supercapacitors. *Appl. Phys. A* 125, 474. <https://doi.org/10.1007/s00339-019-2767-6>
- Williams, D.F., 2014. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials* 35, 10009–10014. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.035>
- Xia, J., Liu, Z., Chen, Y., Cao, Y., Wang, Z., 2020. Effect of lignin on the performance of biodegradable cellulose aerogels made from wheat straw pulp-LiCl/DMSO solution. *Cellulose* 27, 879–894. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02826-x>
- Yang, X., Liu, G., Peng, L., Guo, J., Tao, L., Yuan, J., Chang, C., Wei, Y., Zhang, L., 2017. Highly Efficient Self-Healable and Dual Responsive Cellulose-Based Hydrogels for Controlled Release and 3D Cell Culture. *Adv. Funct. Mater.* 27. <https://doi.org/10.1002/adfm.201703174>
- Yewale, C., Tandel, H., Patel, A., Misra, A., 2021. Polymers in Transdermal Drug Delivery, in: *Applications of Polymers in Drug Delivery*. Elsevier, pp. 131–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819659-5.00005-7>
- Yong, H., Bai, R., Bi, F., Liu, J., Qin, Y., Liu, J., 2020. Synthesis, characterization, antioxidant and antimicrobial activities of starch aldehyde-quercetin conjugate. *Int. J. Biol. Macromol.* 156, 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.035>
- Yong, H., Liu, J., 2024. Recent advances on the preparation conditions, structural characteristics, physicochemical properties, functional properties and potential applications of dialdehyde starch: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 259, 129261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129261>
- Yong, H., Xu, F., Yun, D., Hu, H., Liu, J., 2022. Antioxidant packaging films developed by in-situ cross-linking chitosan with dialdehyde starch-catechin conjugates. *Int. J. Biol. Macromol.* 222, 3203–3214. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.093>
- Yu, Y., Shen, M., Song, Q., Xie, J., 2018. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydr.*

- Polym. 183, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.009>
- Zhang, B., Zhang, M., Tian, J., Zhang, X., Zhang, D., Li, J., Yang, L., 2024. Advances in the regulation of radiation-induced apoptosis by polysaccharides: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 263, 130173. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130173>
- Zhang, L., Liu, J., Zheng, X., Zhang, A., Zhang, X., Tang, K., 2019. Pullulan dialdehyde crosslinked gelatin hydrogels with high strength for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 216, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.004>
- Zhang, N., Chen, H., Ma, L., Zhang, Y., 2013. Physical modifications of polysaccharide from *Inonotus obliquus* and the antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 54, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.030>
- Zhang, S., Zhang, Y., Wang, X., Wang, Y., 2009. High Carbonyl Content Oxidized Starch Prepared by Hydrogen Peroxide and Its Thermoplastic Application. *Starch - Stärke* 61, 646–655. <https://doi.org/10.1002/star.200900130>
- Zhao, Y., Tian, R., Cui, M., Zhang, Y., Jiang, L., Tian, B., Sui, X., 2023. Insight into the formation mechanism of soy protein isolate films improved by dialdehyde starch with different degrees of aldehyde substitution. *Food Hydrocoll.* 145, 109071. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109071>
- Ziegler-Borowska, M., Wegrzynowska-Drzymalska, K., Chelminiak-Dudkiewicz, D., Kowalonek, J., Kaczmarek, H., 2018. Photochemical Reactions in Dialdehyde Starch. *Molecules* 23, 3358. <https://doi.org/10.3390/molecules23123358>
- Zuo, Y., Liu, W., Xiao, J., Zhao, X., Zhu, Y., Wu, Y., 2017. Preparation and characterization of dialdehyde starch by one-step acid hydrolysis and oxidation. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 1257–1264. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.188>
- Adepu, S., Ramakrishna, S., 2021. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* 26, 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>
- Ahmady, A., Abu Samah, N.H., 2021. A review: Gelatine as a bioadhesive material for medical and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 608, 121037. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121037>
- Alshangiti, D.M., El-damhougy, T.K., Zaher, A., Madani, M., Mohamady ghobashy, M., 2023. Revolutionizing biomedicine: advancements, applications, and prospects of nanocomposite macromolecular carbohydrate-based hydrogel biomaterials: a review. *RSC Adv.* 13, 35251–35291. <https://doi.org/10.1039/D3RA07391B>
- Alvarez-Figueroa, M., 2001. Passive and iontophoretic transdermal penetration of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 212, 101–107. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00599-8](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00599-8)
- Amaraweera, S.M., Gunathilake, C., Gunawardene, O.H.P., Fernando, N.M.L., Wanninayaka, D.B., Dassanayake, R.S., Rajapaksha, S.M., Manamperi, A., Fernando, C.A.N., Kulatunga, A.K., Manipura, A., 2021. Development of Starch-Based Materials Using Current Modification Techniques and Their Applications: A

- Review. *Molecules* 26, 6880. <https://doi.org/10.3390/molecules26226880>
- Anthony, R.J., Sims, R.C., 2013. Optimization of cationic amino starch synthesis using biogenic amines. *Carbohydr. Polym.* 98, 1409–1415. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.043>
- Apriyanto, A., Compart, J., Fettke, J., 2022. A review of starch, a unique biopolymer – Structure, metabolism and in planta modifications. *Plant Sci.* 318, 111223. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111223>
- Aslzad, S., Savadi, P., Abdolahinia, E.D., Omid, Y., Fathi, M., Barar, J., 2022. Chitosan/dialdehyde starch hybrid in situ forming hydrogel for ocular delivery of betamethasone. *Mater. Today Commun.* 33, 104873. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104873>
- Asri, R.I.M., Harun, W.S.W., Samykano, M., Lah, N.A.C., Ghani, S.A.C., Tarlochan, F., Raza, M.R., 2017. Corrosion and surface modification on biocompatible metals: A review. *Mater. Sci. Eng. C* 77, 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.102>
- Azizoğlu, E., Özer, Ö., 2020. Fabrication of Montelukast sodium loaded filaments and 3D printing transdermal patches onto packaging material. *Int. J. Pharm.* 587, 119588. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119588>
- B. Sánchez, A., C. Calpena, A., Mallandrich, M., Clares, B., 2019. Validation of an Ex Vivo Permeation Method for the Intestinal Permeability of Different BCS Drugs and Its Correlation with Caco-2 In Vitro Experiments. *Pharmaceutics* 11, 638. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11120638>
- Bagde, S., Rohera, B.D., 2024. Modification of the swelling behavior of a hydrophilic polymer as an approach to maintaining a constant gel layer thickness. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 92, 105294. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105294>
- Bajer, D., Burkowska-But, A., 2022. Innovative and environmentally safe composites based on starch modified with dialdehyde starch, caffeine, or ascorbic acid for applications in the food packaging industry. *Food Chem.* 374, 131639. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131639>
- Barclay, T.G., Day, C.M., Petrovsky, N., Garg, S., 2019. Review of polysaccharide particle-based functional drug delivery. *Carbohydr. Polym.* 221, 94–112. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.067>
- Barreto, P.L.M., Pires, A.T.N., Soldi, V., 2003. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. *Polym. Degrad. Stab.* 79, 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(02\)00267-7](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(02)00267-7)
- Baumgartner, A., Planinšek, O., 2021. Application of commercially available mesoporous silica for drug dissolution enhancement in oral drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 167, 106015. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106015>
- Bello, A., Perkins, E., Jay, R., Efthimiou, P., 2017. Recommendations for optimizing methotrexate treatment for patients with rheumatoid arthritis. *Open Access Rheumatol. Res. Rev.* Volume 9, 67–79. <https://doi.org/10.2147/OARRR.S131668>

- Berkkan, A., Kondolot Solak, E., Asman, G., 2021. Starch-Based Membranes for Controlled Release of 5-Fluorouracil In Vitro. *ChemistrySelect* 6, 5678–5684. <https://doi.org/10.1002/slct.202100917>
- Bernard, M., Jubeli, E., Pungente, M.D., Yagoubi, N., 2018. Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices – regulations, in vitro screening and risk-management. *Biomater. Sci.* 6, 2025–2053. <https://doi.org/10.1039/C8BM00518D>
- BG, P.K., Mehrotra, S., Marques, S.M., Kumar, L., Verma, R., 2023. 3D printing in personalized medicines: A focus on applications of the technology. *Mater. Today Commun.* 35, 105875. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.105875>
- Bogusz, K., Zuchora, M., Sencadas, V., Tehei, M., Lerch, M., Thorpe, N., Rosenfeld, A., Dou, S.X., Liu, H.K., Konstantinov, K., 2019. Synthesis of methotrexate-loaded tantalum pentoxide–poly(acrylic acid) nanoparticles for controlled drug release applications. *J. Colloid Interface Sci.* 538, 286–296. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.11.097>
- Borbolla-Jiménez, F. V., Peña-Corona, S.I., Farah, S.J., Jiménez-Valdés, M.T., Pineda-Pérez, E., Romero-Montero, A., Del Prado-Audelo, M.L., Bernal-Chávez, S.A., Magaña, J.J., Leyva-Gómez, G., 2023. Films for Wound Healing Fabricated Using a Solvent Casting Technique. *Pharmaceutics* 15, 1914. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071914>
- Bradford, M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Cao, W., Yan, J., Liu, C., Zhang, J., Wang, H., Gao, X., Yan, H., Niu, B., Li, W., 2020. Preparation and characterization of catechol-grafted chitosan/gelatin/modified chitosan-AgNP blend films. *Carbohydr. Polym.* 247, 116643. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116643>
- Celebioglu, A., Uyar, T., 2020. Hydrocortisone/cyclodextrin complex electrospun nanofibers for a fast-dissolving oral drug delivery system. *RSC Med. Chem.* 11, 245–258. <https://doi.org/10.1039/C9MD00390H>
- Chan, C.-C., Liou, C.-J., Xu, P.-Y., Shen, J.-J., Kuo, M.-L., Len, W.-B., Chang, L.-E., Huang, W.-C., 2013. Effect of dehydroepiandrosterone on atopic dermatitis-like skin lesions induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in mouse. *J. Dermatol. Sci.* 72, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.06.015>
- Chatterjee, S., Mahmood, S., Hilles, A.R., Thomas, S., Roy, S., Provaznik, V., Romero, E.L., Ghosal, K., 2023. Cationic starch: A functionalized polysaccharide based polymer for advancement of drug delivery and health care system - A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 248, 125757. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125757>
- Chaudhari, V.S., Malakar, T.K., Murty, U.S., Banerjee, S., 2021. Extruded filaments derived 3D printed medicated skin patch to mitigate destructive pulmonary tuberculosis: design to delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 18, 301–313. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1845648>
- Chemelli, A., Gomernik, F., Thaler, F., Huber, A., Hirn, U., Bauer, W., Spirk, S., 2020.

- Cationic starches in paper-based applications—A review on analytical methods. *Carbohydr. Polym.* 235, 115964. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.115964>
- Chen, F.-M., Liu, X., 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.* 53, 86–168. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004>
- Chen, X., Shen, M., Yu, Q., Chen, Y., Xie, J., 2024. Recent advance in chemistry modified methods of natural polysaccharides and their applications. *Trends Food Sci. Technol.* 144, 104317. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104317>
- Cheng, Z., Lin, H., Wang, Z., Yang, X., Zhang, M., Liu, X., Wang, B., Wu, Z., Chen, D., 2020. Preparation and characterization of dissolving hyaluronic acid composite microneedles loaded micelles for delivery of curcumin. *Drug Deliv. Transl. Res.* 10, 1520–1530. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00735-2>
- Chillingworth, N.L., Donaldson, L.F., 2003. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. *J. Neurosci. Methods* 128, 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(03\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(03)00147-X)
- Chuah, L.-H., Loo, H.-L., Goh, C.F., Fu, J.-Y., Ng, S.-F., 2023. Chitosan-based drug delivery systems for skin atopic dermatitis: recent advancements and patent trends. *Drug Deliv. Transl. Res.* 13, 1436–1455. <https://doi.org/10.1007/s13346-023-01307-w>
- Ciro, Y., Rojas, J., Yarcce, C.J., Salamanca, C.H., 2019. Production and Characterization of Glutathione-Chitosan Conjugate Films as Systems for Localized Release of Methotrexate. *Polymers (Basel)*. 11, 2032. <https://doi.org/10.3390/polym11122032>
- Colussi, R., Pinto, V.Z., El Halal, S.L.M., Vanier, N.L., Villanova, F.A., Marques e Silva, R., da Rosa Zavareze, E., Dias, A.R.G., 2014. Structural, morphological, and physicochemical properties of acetylated high-, medium-, and low-amylose rice starches. *Carbohydr. Polym.* 103, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.070>
- Compart, J., Li, X., Fettke, J., 2021. Starch-A complex and undeciphered biopolymer. *J. Plant Physiol.* 258–259, 153389. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153389>
- Compart, J., Singh, A., Fettke, J., Apriyanto, A., 2023. Customizing Starch Properties: A Review of Starch Modifications and Their Applications. *Polymers (Basel)*. 15, 3491. <https://doi.org/10.3390/polym15163491>
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., Tang, M.C., 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocoll.* 23, 1527–1534. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.016>
- Costa-Júnior, E.S., Barbosa-Stancioli, E.F., Mansur, A.A.P., Vasconcelos, W.L., Mansur, H.S., 2009. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 76, 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.015>
- Cui, T., Sun, Y., Wu, Y., Wang, J., Ding, Y., Cheng, J., Guo, M., 2022. Mechanical, microstructural, and rheological characterization of gelatin-dialdehyde starch hydrogels constructed by dual dynamic crosslinking. *LWT* 161, 113374.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113374>

- Dash, R., Foston, M., Ragauskas, A.J., 2013. Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydr. Polym.* 91, 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.080>
- Davoudi, Z., Rabiee, M., Houshmand, B., Eslahi, N., Khoshroo, K., Rasoulianboroujeni, M., Tahriri, M., Tayebi, L., 2018. Development of chitosan/gelatin/keratin composite containing hydrocortisone sodium succinate as a buccal mucoadhesive patch to treat desquamative gingivitis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 44, 40–55. <https://doi.org/10.1080/03639045.2017.1371738>
- Deng, L., Kang, X., Liu, Y., Feng, F., Zhang, H., 2018. Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting. *Food Hydrocoll.* 74, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.023>
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., Kumar, D.S., 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *Int. J. Polym. Sci.* 2011, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2011/290602>
- Dhanka, M., Shetty, C., Srivastava, R., 2018. Methotrexate loaded gellan gum microparticles for drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 110, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.026>
- Dong, D., Hao, T., Wang, C., Zhang, Y., Qin, Z., Yang, B., Fang, W., Ye, L., Yao, F., Li, J., 2018. Zwitterionic starch-based hydrogel for the expansion and “stemness” maintenance of brown adipose derived stem cells. *Biomaterials* 157, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.12.011>
- Economidou, S.N., Lamprou, D.A., Douroumis, D., 2018. 3D printing applications for transdermal drug delivery. *Int. J. Pharm.* 544, 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.031>
- Efthimiadou, E.K., Metaxa, A.-F., Kordas, G., 2015. Modified Polysaccharides for Drug Delivery, in: *Polysaccharides*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1805–1835. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_23
- El-Naggar, M.E., El-Rafie, M.H., El-sheikh, M.A., El-Feky, G.S., Hebeish, A., 2015. Synthesis, characterization, release kinetics and toxicity profile of drug-loaded starch nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 81, 718–729. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.09.005>
- El-Zaher, N.A., Osiris, W.G., 2005. Thermal and structural properties of poly(vinyl alcohol) doped with hydroxypropyl cellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 96, 1914–1923. <https://doi.org/10.1002/app.21628>
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Ezike, T.C., Okpala, U.S., Onoja, U.L., Nwike, C.P., Ezeako, E.C., Okpara, O.J., Okoroafor, C.C., Eze, S.C., Kalu, O.L., Odoh, E.C., Nwadike, U.G., Ogbodo, J.O., Umeh, B.U., Ossai, E.C., Nwanguma, B.C., 2023. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon* 9, e17488. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17488>

- Falcão, L. de S., Coelho, D.B., Veggi, P.C., Campelo, P.H., Albuquerque, P.M., de Moraes, M.A., 2022. Starch as a Matrix for Incorporation and Release of Bioactive Compounds: Fundamentals and Applications. *Polymers (Basel)*. 14, 2361. <https://doi.org/10.3390/polym14122361>
- Falsafi, S.R., Topuz, F., Rostamabadi, H., 2023. Dialdehyde carbohydrates – Advanced functional materials for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 321, 121276. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121276>
- Fang, H., Zhu, D., Yang, Q., Chen, Y., Zhang, C., Gao, J., Gao, Y., 2022. Emerging zero-dimensional to four-dimensional biomaterials for bone regeneration. *J. Nanobiotechnology* 20, 26. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01228-1>
- Farzan, M., Roth, R., Schoelkopf, J., Huwyler, J., Puchkov, M., 2023. The processes behind drug loading and release in porous drug delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 189, 133–151. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.05.019>
- Fenton, O.S., Olafson, K.N., Pillai, P.S., Mitchell, M.J., Langer, R., 2018. Advances in Biomaterials for Drug Delivery. *Adv. Mater.* 30. <https://doi.org/10.1002/adma.201705328>
- Fernández-Villa, D., Ramírez-Jiménez, R.A., Aranaz, I., Acosta, N., Vázquez-Lasa, B., Rojo, L., 2022. Development of Methotrexate Complexes Endowed with New Biological Properties Envisioned for Musculoskeletal Regeneration in Rheumatoid Arthritis Environments. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 10054. <https://doi.org/10.3390/ijms231710054>
- FIEDOROWICZ, M., PARA, A., 2006. Structural and molecular properties of dialdehyde starch. *Carbohydr. Polym.* 63, 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.054>
- Foot, M., Mulholland, M., 2005. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 397–407. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.01.026>
- Friedman, B., Cronstein, B., 2019. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Jt. Bone Spine* 86, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.07.004>
- Fu, Y., Kao, W.J., 2010. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 7, 429–444. <https://doi.org/10.1517/17425241003602259>
- Gao, Y., Hou, M., Yang, R., Zhang, L., Xu, Z., Kang, Y., Xue, P., 2019. Transdermal delivery of therapeutics through dissolvable gelatin/sucrose films coated on PEGDA microneedle arrays with improved skin permeability. *J. Mater. Chem. B* 7, 7515–7524. <https://doi.org/10.1039/C9TB01994D>
- Garg, N.K., Tyagi, R.K., Singh, B., Sharma, G., Nirbhavane, P., Kushwah, V., Jain, S., Katare, O.P., 2016. Nanostructured lipid carrier mediates effective delivery of methotrexate to induce apoptosis of rheumatoid arthritis via NF- κ B and FOXO1. *Int. J. Pharm.* 499, 301–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.061>
- Gillispie, G., Prim, P., Copus, J., Fisher, J., Mikos, A.G., Yoo, J.J., Atala, A., Lee, S.J.,

2020. Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication* 12, 022003. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab6f0d>
- Golachowski, A., Drożdż, W., Golachowska, M., Kapelko-Żeberska, M., Raszewski, B., 2020. Production and Properties of Starch Citrates—Current Research. *Foods* 9, 1311. <https://doi.org/10.3390/foods9091311>
- Guastaferro, M., Baldino, L., Reverchon, E., Cardea, S., 2021. Production of Porous Agarose-Based Structures: Freeze-Drying vs. Supercritical CO₂ Drying. *Gels* 7, 198. <https://doi.org/10.3390/gels7040198>
- Guastaldi, A.C., Aparecida, A.H., 2010. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim. Nova* 33, 1352–1358. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600025>
- Gularte, M.S., Anghinoni, J.M., Abenante, L., Voss, G.T., de Oliveira, R.L., Vaucher, R.A., Luchese, C., Wilhelm, E.A., Lenardão, E.J., Fajardo, A.R., 2019. Synthesis of chitosan derivatives with organoselenium and organosulfur compounds: Characterization, antimicrobial properties and application as biomaterials. *Carbohydr. Polym.* 219, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.040>
- Gularte, M.S., Quadrado, R.F.N., Pedra, N.S., Soares, M.S.P., Bona, N.P., Spanevello, R.M., Fajardo, A.R., 2020. Preparation, characterization and antitumor activity of a cationic starch-derivative membrane embedded with a β -cyclodextrin/curcumin inclusion complex. *Int. J. Biol. Macromol.* 148, 140–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.104>
- Hawthorne, D., Pannala, A., Sandeman, S., Lloyd, A., 2022. Sustained and targeted delivery of hydrophilic drug compounds: A review of existing and novel technologies from bench to bedside. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 78, 103936. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103936>
- Heinze, T., Haack, V., Rensing, S., 2004. Starch Derivatives of High Degree of Functionalization. 7. Preparation of Cationic 2-Hydroxypropyltrimethylammonium Chloride Starches. *Starch - Stärke* 56, 288–296. <https://doi.org/10.1002/star.200300243>
- Hemrajani, C., Negi, P., Parashar, A., Gupta, G., Jha, N.K., Singh, S.K., Chellappan, D.K., Dua, K., 2022. Overcoming drug delivery barriers and challenges in topical therapy of atopic dermatitis: A nanotechnological perspective. *Biomed. Pharmacother.* 147, 112633. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112633>
- Hench, L.L., Polak, J.M., 2002. Third-Generation Biomedical Materials. *Science* (80-.). 295, 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.1067404>
- Hodge, J.G., Zamierowski, D.S., Robinson, J.L., Mellott, A.J., 2022. Evaluating polymeric biomaterials to improve next generation wound dressing design. *Biomater. Res.* 26. <https://doi.org/10.1186/s40824-022-00291-5>
- Ishchenko, O., Plavan, V., Valeika, V., Koliada, M., Liashok, I., Budash, Y., Bessarabov, V., 2022. Modified Starch in Composition with Polyvinyl Alcohol as a Basis for Development of the Polymeric Materials for Pharmaceutical Use. *Starch - Stärke* 74. <https://doi.org/10.1002/star.202200062>

- Jardim, K.V., Joanitti, G.A., Azevedo, R.B., Parize, A.L., 2015. Physico-chemical characterization and cytotoxicity evaluation of curcumin loaded in chitosan/chondroitin sulfate nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* 56, 294–304. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.036>
- Jelkmann, M., Lechner, C., Menzel, C., Krebs, V., Bernkop-Schnürch, A., 2019. Cationic starch derivatives as mucoadhesive and soluble excipients in drug delivery. *Int. J. Pharm.* 570, 118664. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118664>
- Kämmerling, L., Fisher, L.E., Antmen, E., Simsek, G.M., Rostam, H.M., Vrana, N.E., Ghaemmaghami, A.M., 2021. Mitigating the foreign body response through 'immune-instructive' biomaterials. *J. Immunol. Regen. Med.* 12, 100040. <https://doi.org/10.1016/j.regen.2021.100040>
- Kanikireddy, V., Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Karthikeyan, C., Sadiku, R., 2020. Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 164, 963–975. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.160>
- Kargutkar, S., Brijesh, S., 2016. Anti-rheumatic activity of Ananas comosus fruit peel extract in a complete Freund's adjuvant rat model. *Pharm. Biol.* 54, 2616–2622. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1173066>
- Killinger, W.E., Murray, D., Hatfield, G.R., Hassler, T., 1995. Determination of the Degree of Cationicity in Cationic Starches by Solid-State ¹³C NMR Spectroscopy. *Starch - Stärke* 47, 311–314. <https://doi.org/10.1002/star.19950470806>
- Kim, H.-S., Yun, Y.-H., Shim, W.-G., Yoon, S.-D., 2021. Preparation and evaluation of functional allopurinol imprinted starch based biomaterials for transdermal drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 175, 217–228. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.004>
- Kim, H.-S., Yun, Y.-H., Shim, W.-G., Yoon, S.-D., 2020. Preparation of atenolol imprinted polysaccharide based biomaterials for a transdermal drug delivery system. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 59, 101893. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101893>
- Kim, W.-J., Koo, J.-H., Cho, H.-J., Lee, J.-U., Kim, J.Y., Lee, H.-G., Lee, S., Kim, J.H., Oh, M.S., Suh, M., Shin, E.-C., Ko, J.Y., Sohn, M.H., Choi, J.-M., 2018. Protein tyrosine phosphatase conjugated with a novel transdermal delivery peptide, astrotactin 1-derived peptide recombinant protein tyrosine phosphatase (AP-rPTP), alleviates both atopic dermatitis-like and psoriasis-like dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 141, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.007>
- Kolbe, L., Kligman, A.M., Schreiner, V., Stoudemayer, T., 2001. Corticosteroid-induced atrophy and barrier impairment measured by non-invasive methods in human skin. *Ski. Res. Technol.* 7, 73–77. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0846.2001.70203.x>
- Kong, U., Mohammad Rawi, N.F., Tay, G.S., 2023. The Potential Applications of Reinforced Bioplastics in Various Industries: A Review. *Polymers (Basel)*. 15, 2399. <https://doi.org/10.3390/polym15102399>
- Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A., 1983. Mechanisms

- of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15, 25–35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9)
- Kumar, A., Dhaliwal, N., Dhaliwal, J., Dharavath, R.N., Chopra, K., 2020. Astaxanthin attenuates oxidative stress and inflammatory responses in complete Freund-adjuvant-induced arthritis in rats. *Pharmacol. Reports* 72, 104–114. <https://doi.org/10.1007/s43440-019-00022-z>
- Largo, R., Roman-Blas, J.A., Moreno-Rubio, J., Sánchez-Pernaute, O., Martínez-Calatrava, M.J., Castañeda, S., Herrero-Beaumont, G., 2010. Chondroitin sulfate improves synovitis in rabbits with chronic antigen-induced arthritis. *Osteoarthritis Cartil.* 18, S17–S23. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.01.017>
- Lau, E., Giddings, S., Mohammed, S., Dubois, P., Johnson, S., Stanley, R., Halley, P., Steadman, K., 2013. Encapsulation of Hydrocortisone and Mesalazine in Zein Microparticles. *Pharmaceutics* 5, 277–293. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics5020277>
- Lee, C.-S., Hwang, H.S., 2023. Starch-Based Hydrogels as a Drug Delivery System in Biomedical Applications. *Gels* 9, 951. <https://doi.org/10.3390/gels9120951>
- Lee, S.-H., Shin, S.-R., Lee, D.-S., 2019. Self-healing of cross-linked PU via dual-dynamic covalent bonds of a Schiff base from cystine and vanillin. *Mater. Des.* 172, 107774. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.107774>
- Lee, S.-Y., Yeon-HumYun, Ahn, G., Yoon, S.-D., 2023. Preparation of niacinamide imprinted starch-based biomaterials for treating of hyperpigmentation. *Int. J. Biol. Macromol.* 232, 123382. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123382>
- Lefnaoui, S., Moulai-Mostefa, N., 2015. Synthesis and evaluation of the structural and physicochemical properties of carboxymethyl pregelatinized starch as a pharmaceutical excipient. *Saudi Pharm. J.* 23, 698–711. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.01.021>
- Lemos, P.V.F., Marcelino, H.R., Cardoso, L.G., Souza, C.O. de, Druzian, J.I., 2021. Starch chemical modifications applied to drug delivery systems: From fundamentals to FDA-approved raw materials. *Int. J. Biol. Macromol.* 184, 218–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.077>
- Lewicka, K., Siemion, P., Kurcok, P., 2015. Chemical Modifications of Starch: Microwave Effect. *Int. J. Polym. Sci.* 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/867697>
- Li, J., Zhou, M., Cheng, F., Lin, Y., Shi, L., Zhu, P.-X., 2020. Preparation of oxidized corn starch with high degree of oxidation by fenton-like oxidation assisted with ball milling. *Mater. Today Commun.* 22, 100793. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2019.100793>
- Lifshiz Zimon, R., Lerman, G., Elharrar, E., Meningher, T., Barzilai, A., Masalha, M., Chintakunta, R., Hollander, E., Goldbart, R., Traitel, T., Harats, M., Sidi, Y., Avni, D., Kost, J., 2018. Ultrasound targeting of Q-starch/miR-197 complexes for topical treatment of psoriasis. *J. Control. Release* 284, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.040>
- Ling, M.-H., Chen, M.-C., 2013. Dissolving polymer microneedle patches for rapid and

- efficient transdermal delivery of insulin to diabetic rats. *Acta Biomater.* 9, 8952–8961. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.029>
- Liu, R., Liang, M., Xu, J., Wang, J., Long, L., Ni, Y., 2022. Dialdehyde starch reinforced polyacrylate-polyethylene glycol resin for impregnated decorative paper with improved toughness and ultra-low formaldehyde emission. *Ind. Crops Prod.* 176, 114390. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114390>
- Liu, T., Ren, Q., Wang, S., Gao, J., Shen, C., Zhang, S., Wang, Y., Guan, F., 2023. Chemical Modification of Polysaccharides: A Review of Synthetic Approaches, Biological Activity and the Structure–Activity Relationship. *Molecules* 28, 6073. <https://doi.org/10.3390/molecules28166073>
- Lopes, P., Joaquineto, A.S.M., Ribeiro, A., Moura, N.M.M., Gomes, A.T.P., Guerreiro, S.G., Faustino, M.A.F., Almeida, A., Ferreira, P., Coimbra, M.A., Neves, M.G.P.M.S., Gonçalves, I., 2023. Starch-based films doped with porphyrinoid photosensitizers for active skin wound healing. *Carbohydr. Polym.* 313, 120894. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120894>
- Lopina, S.T., Kanjickal, D.G., 2004. Modeling of Drug Release from Polymeric Delivery Systems? A Review; *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 21, 345–386. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v21.i5.10>
- Luo, M., Zhang, X., Wu, J., Zhao, J., 2021. Modifications of polysaccharide-based biomaterials under structure-property relationship for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 266, 118097. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118097>
- MACDONALD, G.W. and A.D., 1944. No Title. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 80, 300–307.
- Macedo, L.B., Nogueira-Librelotto, D.R., Mathes, D., de Vargas, J.M., da Rosa, R.M., Rodrigues, O.E.D., Vinardell, M.P., Mitjans, M., Rolim, C.M.B., 2021. Overcoming MDR by Associating Doxorubicin and pH-Sensitive PLGA Nanoparticles Containing a Novel Organoselenium Compound—An In Vitro Study. *Pharmaceutics* 14, 80. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010080>
- Mahtab, A., Rabbani, S.A., Neupane, Y.R., Pandey, S., Ahmad, A., Khan, M.A., Gupta, N., Madaan, A., Jaggi, M., Sandal, N., Rawat, H., Aqil, M., Talegaonkar, S., 2020. Facile functionalization of Teriflunomide-loaded nanoliposomes with Chondroitin sulphate for the treatment of Rheumatoid arthritis. *Carbohydr. Polym.* 250, 116926. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116926>
- Malik, M.K., Bhatt, P., Kumar, T., Singh, J., Kumar, V., Faruk, A., Fuloria, S., Fuloria, N.K., Subrimanyan, V., Kumar, S., 2023. Significance of Chemically Derivatized Starch as Drug Carrier in Developing Novel Drug Delivery Devices. *Nat. Prod. J.* 13. <https://doi.org/10.2174/2210315512666220819112334>
- Maroufi, L.Y., Shahabi, N., Ghanbarzadeh, M., dokht, Ghorbani, M., 2022. Development of Antimicrobial Active Food Packaging Film Based on Gelatin/Dialdehyde Quince Seed Gum Incorporated with Apple Peel Polyphenols. *Food Bioprocess Technol.* 15, 693–705. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02774-8>
- Maurizii, G., Moroni, S., Khorshid, S., Aluigi, A., Tiboni, M., Casettari, L., 2023. 3D-printed EVA-based patches manufactured by direct powder extrusion for personalized transdermal therapies. *Int. J. Pharm.* 635, 122720.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122720>

- Mehtani, D., Seth, A., Sharma, P., Maheshwari, N., Kapoor, D., Shrivastava, S.K., Tekade, R.K., 2019. Biomaterials for Sustained and Controlled Delivery of Small Drug Molecules, in: Biomaterials and Bionanotechnology. Elsevier, pp. 89–152. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814427-5.00004-4>
- Mongia, N.K., Anseth, K.S., Peppas, N.A., 1996. Mucoadhesive poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freezing/thawing processes: Applications in the development of wound healing systems. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7, 1055–1064. <https://doi.org/10.1163/156856296X00543>
- Montoya-Yepes, D.F., Jiménez-Rodríguez, A.A., Aldana-Porras, A.E., Velásquez-Holguin, L.F., Méndez-Arteaga, J.J., Murillo-Arango, W., 2024. Starches in the encapsulation of plant active ingredients: state of the art and research trends. *Polym. Bull.* 81, 135–163. <https://doi.org/10.1007/s00289-023-04724-6>
- Moreno, O., Cárdenas, J., Atarés, L., Chiralt, A., 2017. Influence of starch oxidation on the functionality of starch-gelatin based active films. *Carbohydr. Polym.* 178, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.128>
- Mulhbachter, J., Ispas-Szabo, P., Lenaerts, V., Mateescu, M.A., 2001. Cross-linked high amylose starch derivatives as matrices for controlled release of high drug loadings. *J. Control. Release* 76, 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00425-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00425-4)
- Naghieh, S., Chen, X., 2021. Printability—A key issue in extrusion-based bioprinting. *J. Pharm. Anal.* 11, 564–579. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.02.001>
- Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32, 762–798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
- Naseri, E., Ahmadi, A., 2022. A review on wound dressings: Antimicrobial agents, biomaterials, fabrication techniques, and stimuli-responsive drug release. *Eur. Polym. J.* 173, 111293. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111293>
- Nornberg, A.B., Martins, C.C., Cervi, V.F., Sari, M.H.M., Cruz, L., Luchese, C., Wilhelm, E.A., Fajardo, A.R., 2022. Transdermal release of methotrexate by cationic starch/poly(vinyl alcohol)-based films as an approach for rheumatoid arthritis treatment. *Int. J. Pharm.* 611, 121285. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121285>
- O'Brien, F.J., 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* 14, 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Ødegaard, K.S., Torgersen, J., Elverum, C.W., 2020. Structural and Biomedical Properties of Common Additively Manufactured Biomaterials: A Concise Review. *Metals (Basel)*. 10, 1677. <https://doi.org/10.3390/met10121677>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Ojogbo, E., Ogunsona, E.O., Mekonnen, T.H., 2020. Chemical and physical modifications of starch for renewable polymeric materials. *Mater. Today Sustain.*

- 7–8, 100028. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2019.100028>
- Oleksy, M., Dynarowicz, K., Aebisher, D., 2023. Advances in Biodegradable Polymers and Biomaterials for Medical Applications—A Review. *Molecules* 28, 6213. <https://doi.org/10.3390/molecules28176213>
- Oliveira, S.M., Mijares, D.Q., Turner, G., Amaral, I.F., Barbosa, M.A., Teixeira, C.C., 2009. Engineering Endochondral Bone: In Vivo Studies. *Tissue Eng. Part A* 15, 635–643. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0052>
- Omorogbe, O., Ajayi, A.M., Ben-Azu, B., Oghwere, E.E., Adebessin, A., Aderibigbe, A.O., Okubena, O., Umukoro, S., 2018. Jobelyn® attenuates inflammatory responses and neurobehavioural deficits associated with complete Freund-adjuvant-induced arthritis in mice. *Biomed. Pharmacother.* 98, 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.098>
- Panasenko, O.M., 1997. The mechanism of the hypochlorite-induced lipid peroxidation. *BioFactors* 6, 181–190. <https://doi.org/10.1002/biof.5520060212>
- Pandey, S.P., Shukla, T., Dhote, V.K., K. Mishra, D., Maheshwari, R., Tekade, R.K., 2019. Use of Polymers in Controlled Release of Active Agents, in: *Basic Fundamentals of Drug Delivery*. Elsevier, pp. 113–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00004-2>
- Parhi, R., 2023. Recent advances in 3D printed microneedles and their skin delivery application in the treatment of various diseases. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 84, 104395. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104395>
- Park, G., Kim, H.G., Lim, S., Lee, W., Sim, Y., Oh, M.S., 2014. Coriander Alleviates 2,4-Dinitrochlorobenzene-Induced Contact Dermatitis-Like Skin Lesions in Mice. *J. Med. Food* 17, 862–868. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2910>
- Park, K., 2014. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *J. Control. Release* 190, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.054>
- Patrick, K.S., 2002. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Edition Edited by J. G. Hardman, L. E. Limbird, and A. G. Gilman. McGraw Hill, New York. 2001. xxvii + 2148 pp. 21 × 26 cm. ISBN 0-07-1354469-7. \$125.00. *J. Med. Chem.* 45, 1392–1393. <https://doi.org/10.1021/jm020026w>
- Paxton, N., Smolan, W., Böck, T., Melchels, F., Groll, J., Jungst, T., 2017. Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication* 9, 044107. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8>
- Petta, D., Grijpma, D.W., Alini, M., Eglin, D., D'Este, M., 2018. Three-Dimensional Printing of a Tyramine Hyaluronan Derivative with Double Gelation Mechanism for Independent Tuning of Shear Thinning and Postprinting Curing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4, 3088–3098. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00416>
- Pires, A.L.R., Bierhalz, A.C.K., Moraes, Â.M., 2015. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. *Quim. Nova.* <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>

- Prasad, R., Koul, V., 2012. Transdermal delivery of methotrexate: past, present and future prospects. *Ther. Deliv.* 3, 315–325. <https://doi.org/10.4155/tde.12.3>
- Pulsoni, I., Lubda, M., Aiello, M., Fedi, A., Marzagalli, M., von Hagen, J., Scaglione, S., 2022. Comparison Between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for In Vitro Penetration Assay Using Different Skin Models. *SLAS Technol.* 27, 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.slast.2021.12.006>
- Qamruzzaman, M., Ahmed, F., Mondal, M.I.H., 2022. An Overview on Starch-Based Sustainable Hydrogels: Potential Applications and Aspects. *J. Polym. Environ.* 30, 19–50. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02180-9>
- Qindeel, M., Khan, D., Ahmed, N., Khan, S., Asim, ur. Rehman, 2020. Surfactant-Free, Self-Assembled Nanomicelles-Based Transdermal Hydrogel for Safe and Targeted Delivery of Methotrexate against Rheumatoid Arthritis. *ACS Nano* 14, 4662–4681. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c00364>
- Qu, W., Qader, I.B., Abbott, A.P., 2022. Controlled release of pharmaceutical agents using eutectic modified gelatin. *Drug Deliv. Transl. Res.* 12, 1187–1194. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00998-3>
- Queiroz, V.M., Kling, I.C.S., Eltom, A.E., Archanjo, B.S., Prado, M., Simão, R.A., 2020. Corn starch films as a long-term drug delivery system for chlorhexidine gluconate. *Mater. Sci. Eng. C* 112, 110852. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110852>
- Rahmati, M., Blaker, J.J., Lyngstadaas, S.P., Mano, J.F., Haugen, H.J., 2020. Designing multigradient biomaterials for skin regeneration. *Mater. Today Adv.* 5, 100051. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100051>
- Raine, C., Giles, I., 2022. What is the impact of sex hormones on the pathogenesis of rheumatoid arthritis? *Front. Med.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.909879>
- Ram Prasad, S., Jayakrishnan, A., Sampath Kumar, T.S., 2019. Hydroxyapatite-poly(vinyl alcohol) core-shell nanoparticles for dual delivery of methotrexate and gemcitabine for bone cancer treatment. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 51, 629–638. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.041>
- Razali, M.A.A., Sanusi, N., Ismail, H., Othman, N., Ariffin, A., 2012. Application of response surface methodology (RSM) for optimization of cassava starch grafted polyDADMAC synthesis for cationic properties. *Starch - Stärke* 64, 935–943. <https://doi.org/10.1002/star.201200007>
- Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Miyamaru, L., Cruz, Á.S., 2003. Biocompatibility Study of Polymeric Biomaterials. *Artif. Organs* 27, 424–427. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.2003.07249.x>
- Rostamizadeh, K., Manafi, M., Nosrati, H., Kheiri Manjili, H., Danafar, H., 2018. Methotrexate-conjugated mPEG–PCL copolymers: a novel approach for dual triggered drug delivery. *New J. Chem.* 42, 5937–5945. <https://doi.org/10.1039/C7NJ04864E>
- Sabbagh, F., Kim, B.S., 2022. Recent advances in polymeric transdermal drug delivery systems. *J. Control. Release* 341, 132–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.11.025>

- Saboktakin, M.R., Akhyari, S., Nasirov, F.A., 2014. Synthesis and characterization of modified starch/polybutadiene as novel transdermal drug delivery system. *Int. J. Biol. Macromol.* 69, 442–446. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.062>
- Saghazadeh, S., Rinoldi, C., Schot, M., Kashaf, S.S., Sharifi, F., Jalilian, E., Nuutila, K., Giatsidis, G., Mostafalu, P., Derakhshandeh, H., Yue, K., Swieszkowski, W., Memic, A., Tamayol, A., Khademhosseini, A., 2018. Drug delivery systems and materials for wound healing applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 127, 138–166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008>
- Saito, K., Takenouchi, O., Nukada, Y., Miyazawa, M., Sakaguchi, H., 2017. An in vitro skin sensitization assay termed EpiSensA for broad sets of chemicals including lipophilic chemicals and pre/pro-haptens. *Toxicol. Vitro.* 40, 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.12.005>
- Santander-Ortega, M.J., Stauner, T., Loretz, B., Ortega-Vinuesa, J.L., Bastos-González, D., Wenz, G., Schaefer, U.F., Lehr, C.M., 2010. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. *J. Control. Release* 141, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.08.012>
- Santos, L.F., Correia, I.J., Silva, A.S., Mano, J.F., 2018. Biomaterials for drug delivery patches. *Eur. J. Pharm. Sci.* 118, 49–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.03.020>
- Sarder, R., Piner, E., Rios, D.C., Chacon, L., Artner, M.A., Barrios, N., Argyropoulos, D., 2022. Copolymers of starch, a sustainable template for biomedical applications: A review. *Carbohydr. Polym.* 278, 118973. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118973>
- Schwab, A., Levato, R., D'Este, M., Piluso, S., Eglin, D., Malda, J., 2020. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chem. Rev.* 120, 11028–11055. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00084>
- Şen, F., Uzunsoy, İ., Baştürk, E., Kahraman, M.V., 2017. Antimicrobial agent-free hybrid cationic starch/sodium alginate polyelectrolyte films for food packaging materials. *Carbohydr. Polym.* 170, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.079>
- Shaikh, R., Raj Singh, T., Garland, M., Woolfson, Ad., Donnelly, R., 2011. Mucoadhesive drug delivery systems. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 3, 89. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76478>
- Shukla, S., Mamale, K.B., Arya, R.K.K., Kaundal, R.K., Shukla, R., 2023. Therapeutic potential of microneedles based delivery systems for the management of atopic dermatitis. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 84, 104493. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104493>
- Siddique, M.I., Katas, H., Jamil, A., Mohd Amin, M.C.I., Ng, S.-F., Zulfakar, M.H., Nadeem, S.M., 2019. Potential treatment of atopic dermatitis: tolerability and safety of cream containing nanoparticles loaded with hydrocortisone and hydroxytyrosol in human subjects. *Drug Deliv. Transl. Res.* 9, 469–481. <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0439-7>
- Siddiqui, B., ur Rehman, A., Gul, R., Chaudhery, I., Shah, K.U., Ahmed, N., 2024. Folate decorated chitosan-chondroitin sulfate nanoparticles loaded hydrogel for

- targeting macrophages against rheumatoid arthritis. *Carbohydr. Polym.* 327, 121683. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121683>
- SIMONI, R.C., LEMES, G.F., FIALHO, S., GONÇALVES, O.H., GOZZO, A.M., CHIARADIA, V., SAYER, C., SHIRAI, M.A., LEIMANN, F. V., 2017. Effect of drying method on mechanical, thermal and water absorption properties of enzymatically crosslinked gelatin hydrogels. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 745–755. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160241>
- Sivasankarapillai, V.S., Das, S.S., Sabir, F., Sundaramahalingam, M.A., Colmenares, J.C., Prasannakumar, S., Rajan, M., Rahdar, A., Kyzas, G.Z., 2021. Progress in natural polymer engineered biomaterials for transdermal drug delivery systems. *Mater. Today Chem.* 19, 100382. <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2020.100382>
- Smith, J.A., Li, S., Mele, E., Goulas, A., Engstrøm, D., Silberschmidt, V. V., 2021. Printability and mechanical performance of biomedical PDMS-PEEK composites developed for material extrusion. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 115, 104291. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104291>
- Song, R., Murphy, M., Li, C., Ting, K., Soo, C., Zheng, Z., 2018. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Des. Devel. Ther.* Volume 12, 3117–3145. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S165440>
- Sood, A., Gupta, A., Agrawal, G., 2021. Recent advances in polysaccharides based biomaterials for drug delivery and tissue engineering applications. *Carbohydr. Polym. Technol. Appl.* 2, 100067. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2021.100067>
- Strzepa, A., Pritchard, K.A., Dittel, B.N., 2017. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. *Cell. Immunol.* 317, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.05.002>
- Sukhija, S., Singh, S., Riar, C.S., 2016. Effect of oxidation, cross-linking and dual modification on physicochemical, crystallinity, morphological, pasting and thermal characteristics of elephant foot yam (*Amorphophallus paeoniifolius*) starch. *Food Hydrocoll.* 55, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.003>
- Sun, F., Shan, P., Liu, B., Li, Y., Wang, K., Zhuang, Y., Ning, D., Li, H., 2024. Gelatin-based multifunctional composite films integrated with dialdehyde carboxymethyl cellulose and coffee leaf extract for active food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.* 263, 130302. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130302>
- Tabata, Y., 2009. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J. R. Soc. Interface* 6. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0448.focus>
- Tada, M., Inui, K., Okano, T., Mamoto, K., Koike, T., Nakamura, H., 2019. Safety of Intra-articular Methotrexate Injection With and Without Electroporation for Inflammatory Small Joints in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* 12, 117954411988630. <https://doi.org/10.1177/1179544119886303>
- Tak, H.-Y., Yun, Y.-H., Lee, C.-M., Yoon, S.-D., 2019. Sulindac imprinted mungbean starch/PVA biomaterial films as a transdermal drug delivery patch. *Carbohydr. Polym.* 208, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.12.076>
- Tan, W., Li, Q., Wang, H., Liu, Y., Zhang, J., Dong, F., Guo, Z., 2016. Synthesis,

- characterization, and antibacterial property of novel starch derivatives with 1,2,3-triazole. *Carbohydr. Polym.* 142, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.01.007>
- Tang, Y., Lan, X., Liang, C., Zhong, Z., Xie, R., Zhou, Y., Miao, X., Wang, H., Wang, W., 2019. Honey loaded alginate/PVA nanofibrous membrane as potential bioactive wound dressing. *Carbohydr. Polym.* 219, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.004>
- Tekko, I.A., Chen, G., Domínguez-Robles, J., Thakur, R.R.S., Hamdan, I.M.N., Vora, L., Larrañeta, E., McElney, J.C., McCarthy, H.O., Rooney, M., Donnelly, R.F., 2020a. Development and characterisation of novel poly (vinyl alcohol)/poly (vinyl pyrrolidone)-based hydrogel-forming microneedle arrays for enhanced and sustained transdermal delivery of methotrexate. *Int. J. Pharm.* 586, 119580. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119580>
- Tekko, I.A., Permana, A.D., Vora, L., Hatahet, T., McCarthy, H.O., Donnelly, R.F., 2020b. Localised and sustained intradermal delivery of methotrexate using nanocrystal-loaded microneedle arrays: Potential for enhanced treatment of psoriasis. *Eur. J. Pharm. Sci.* 152, 105469. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105469>
- Thang, N.H., Chien, T.B., Cuong, D.X., 2023. Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview. *Gels* 9, 523. <https://doi.org/10.3390/gels9070523>
- Trucillo, P., 2024. Biomaterials for Drug Delivery and Human Applications. *Materials (Basel)*. 17, 456. <https://doi.org/10.3390/ma17020456>
- Ulery, B.D., Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2011. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 49, 832–864. <https://doi.org/10.1002/polb.22259>
- Utrilla-Coello, R.G., Hernández-Jaimes, C., Carrillo-Navas, H., González, F., Rodríguez, E., Bello-Pérez, L.A., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, J., 2014. Acid hydrolysis of native corn starch: Morphology, crystallinity, rheological and thermal properties. *Carbohydr. Polym.* 103, 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.046>
- Vaiani, L., Boccaccio, A., Uva, A.E., Palumbo, G., Piccininni, A., Guglielmi, P., Cantore, S., Santacroce, L., Charitos, I.A., Ballini, A., 2023. Ceramic Materials for Biomedical Applications: An Overview on Properties and Fabrication Processes. *J. Funct. Biomater.* 14, 146. <https://doi.org/10.3390/jfb14030146>
- Vanier, N.L., El Halal, S.L.M., Dias, A.R.G., da Rosa Zavareze, E., 2017. Molecular structure, functionality and applications of oxidized starches: A review. *Food Chem.* 221, 1546–1559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.138>
- Vasconcelos Oliveira, A.P., de Abreu Feitosa, V., de Oliveira, J.M., Coelho, A.L., de Araújo P. Vieira, L., de Assis Rocha da Silva, F., de Assis Avelino Figueredo Sobrinho, F., Duarte, E.B., de Souza, B.W., de sá Moreira de Souza Filho, M., 2017. Characteristics of Chondroitin Sulfate Extracted of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Processing. *Procedia Eng.* 200, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.028>
- Vítková, L., Kazantseva, N., Musilová, L., Smolka, P., Valášková, K., Kocourková, K.,

- Humeník, M., Minařík, A., Humpolíček, P., Mráček, A., Smolková, I., 2023. Magneto-responsive hyaluronan hydrogel for hyperthermia and bioprinting: Magnetic, rheological properties and biocompatibility. *APL Bioeng.* 7. <https://doi.org/10.1063/5.0147181>
- Vivcharenko, V., Wojcik, M., Palka, K., Przekora, A., 2021. Highly Porous and Superabsorbent Biomaterial Made of Marine-Derived Polysaccharides and Ascorbic Acid as an Optimal Dressing for Exuding Wound Management. *Materials (Basel).* 14, 1211. <https://doi.org/10.3390/ma14051211>
- Voss, G.T., Gularte, M.S., de Oliveira, R.L., Luchese, C., Fajardo, A.R., Wilhelm, E.A., 2020. Biopolymeric films as delivery vehicles for controlled release of hydrocortisone: Promising devices to treat chronic skin diseases. *Mater. Sci. Eng. C* 114, 111074. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111074>
- Waiprib, R., Boonme, P., Taweepreda, W., Kalkornsurapranee, E., Suksaeree, J., Pichayakorn, W., 2017. Deproteinized natural rubber latex/gelatinized starch blended films as drug delivery carrier. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* 148, 1223–1228. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2005-x>
- Wang, J., Zhao, W., Chen, H., Qin, A., Zhu, P., 2017. Anti-tumor Study of Chondroitin Sulfate-Methotrexate Nanogels. *Nanoscale Res. Lett.* 12, 572. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2324-1>
- Wang, N., Shan, Z., Jia, X., Wang, Y., Song, S., Xiao, D., Wang, C., Guo, Q., 2023. Galf-containing polysaccharides from medicinal molds: Sources, structures and bioactive properties. *Trends Food Sci. Technol.* 131, 244–263. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.11.026>
- Wang, W., Zhou, H., Liu, L., 2018. Side effects of methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A systematic review. *Eur. J. Med. Chem.* 158, 502–516. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.027>
- Wang, Y., Xie, W., 2010. Synthesis of cationic starch with a high degree of substitution in an ionic liquid. *Carbohydr. Polym.* 80, 1172–1177. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.042>
- Wang, Z., Xie, J., Shen, M., Nie, S., Xie, M., 2018. Sulfated modification of polysaccharides: Synthesis, characterization and bioactivities. *Trends Food Sci. Technol.* 74, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.010>
- Wannous, A., Milaneh, S., Said, M., Atassi, Y., 2022. New approach for starch dialdehyde preparation using microwave irradiation for removal of heavy metal ions from water. *SN Appl. Sci.* 4, 133. <https://doi.org/10.1007/s42452-022-05024-w>
- Watcharakitti, J., Win, E.E., Nimnuan, J., Smith, S.M., 2022. Modified Starch-Based Adhesives: A Review. *Polymers (Basel).* 14, 2023. <https://doi.org/10.3390/polym14102023>
- Weidinger, S., Novak, N., 2016. Atopic dermatitis. *Lancet* 387, 1109–1122. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00149-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00149-X)
- Weiser, J.R., Saltzman, W.M., 2014. Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models. *J. Control. Release* 190, 664–673.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.048>

- Willfahrt, A., Steiner, E., Hötzel, J., Crispin, X., 2019. Printable acid-modified corn starch as non-toxic, disposable hydrogel-polymer electrolyte in supercapacitors. *Appl. Phys. A* 125, 474. <https://doi.org/10.1007/s00339-019-2767-6>
- Williams, D.F., 2014. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials* 35, 10009–10014. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.035>
- Xia, X., May, B.H., Zhang, A.L., Guo, X., Lu, C., Xue, C.C., Huang, Q., 2020. Chinese Herbal Medicines for Rheumatoid Arthritis: Text-Mining the Classical Literature for Potentially Effective Natural Products. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2020, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2020/7531967>
- Xu, C., Wu, Y., Zhao, L., Zhou, W., Li, Y., Yi, X., Wang, Y., Zhang, Q., Hu, H., Wang, Z., 2023. Transdermal hormone delivery: Strategies, application and modality selection. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 86, 104730. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104730>
- Xue, Y., Xiao, H., Zhang, Y., 2015. Antimicrobial Polymeric Materials with Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 3626–3655. <https://doi.org/10.3390/ijms16023626>
- Yang, X., Chen, Y., Yao, S., Qian, J., Guo, H., Cai, X., 2019. Preparation of immobilized lipase on magnetic nanoparticles dialdehyde starch. *Carbohydr. Polym.* 218, 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.012>
- Yang, X., Liu, G., Peng, L., Guo, J., Tao, L., Yuan, J., Chang, C., Wei, Y., Zhang, L., 2017. Highly Efficient Self-Healable and Dual Responsive Cellulose-Based Hydrogels for Controlled Release and 3D Cell Culture. *Adv. Funct. Mater.* 27. <https://doi.org/10.1002/adfm.201703174>
- Yewale, C., Tandel, H., Patel, A., Misra, A., 2021. Polymers in Transdermal Drug Delivery, in: *Applications of Polymers in Drug Delivery*. Elsevier, pp. 131–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819659-5.00005-7>
- Yong, H., Bai, R., Bi, F., Liu, J., Qin, Y., Liu, J., 2020. Synthesis, characterization, antioxidant and antimicrobial activities of starch aldehyde-quercetin conjugate. *Int. J. Biol. Macromol.* 156, 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.035>
- Yong, H., Liu, J., 2024. Recent advances on the preparation conditions, structural characteristics, physicochemical properties, functional properties and potential applications of dialdehyde starch: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 259, 129261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129261>
- Yong, H., Xu, F., Yun, D., Hu, H., Liu, J., 2022. Antioxidant packaging films developed by in-situ cross-linking chitosan with dialdehyde starch-catechin conjugates. *Int. J. Biol. Macromol.* 222, 3203–3214. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.093>
- Yu, H., Huang, Y., Ying, H., Xiao, C., 2007. Preparation and characterization of a quaternary ammonium derivative of konjac glucomannan. *Carbohydr. Polym.* 69, 29–40. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.024>
- Yu, J., Chang, P.R., Ma, X., 2010. The preparation and properties of dialdehyde starch

- and thermoplastic dialdehyde starch. *Carbohydr. Polym.* 79, 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.005>
- Yu, Y., Shen, M., Song, Q., Xie, J., 2018. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydr. Polym.* 183, 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.009>
- Zeb, A., Qureshi, O.S., Yu, C.-H., Akram, M., Kim, H.-S., Kim, M.-S., Kang, J.-H., Majid, A., Chang, S.-Y., Bae, O.-N., Kim, J.-K., 2017. Enhanced anti-rheumatic activity of methotrexate-entrapped ultradeformable liposomal gel in adjuvant-induced arthritis rat model. *Int. J. Pharm.* 525, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.032>
- Zhang, B., Zhang, M., Tian, J., Zhang, X., Zhang, D., Li, J., Yang, L., 2024. Advances in the regulation of radiation-induced apoptosis by polysaccharides: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 263, 130173. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130173>
- Zhang, L., Liu, J., Zheng, X., Zhang, A., Zhang, X., Tang, K., 2019. Pullulan dialdehyde crosslinked gelatin hydrogels with high strength for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* 216, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.004>
- Zhang, N., Chen, H., Ma, L., Zhang, Y., 2013. Physical modifications of polysaccharide from *Inonotus obliquus* and the antioxidant properties. *Int. J. Biol. Macromol.* 54, 209–215. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.030>
- Zhang, S., Zhang, Y., Wang, X., Wang, Y., 2009. High Carbonyl Content Oxidized Starch Prepared by Hydrogen Peroxide and Its Thermoplastic Application. *Starch - Stärke* 61, 646–655. <https://doi.org/10.1002/star.200900130>
- Zhang, Y., Ye, L., Cui, M., Yang, B., Li, J., Sun, H., Yao, F., 2015. Physically crosslinked poly(vinyl alcohol)–carrageenan composite hydrogels: pore structure stability and cell adhesive ability. *RSC Adv.* 5, 78180–78191. <https://doi.org/10.1039/C5RA11331H>
- Zhao, Y., Tian, R., Cui, M., Zhang, Y., Jiang, L., Tian, B., Sui, X., 2023. Insight into the formation mechanism of soy protein isolate films improved by dialdehyde starch with different degrees of aldehyde substitution. *Food Hydrocoll.* 145, 109071. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109071>
- Zhou, B., Xia, X., Wang, P., Chen, S., Yu, C., Huang, R., Zhang, R., Wang, Y., Lu, L., Yuan, F., Tian, Y., Fan, Y., Zhang, X., Shu, Y., Zhang, S., Bai, D., Wu, L., Xu, H., Yang, L., 2018. Induction and Amelioration of Methotrexate-Induced Gastrointestinal Toxicity are Related to Immune Response and Gut Microbiota. *EBioMedicine* 33, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.06.029>
- Ziegler-Borowska, M., Wegrzynowska-Drzymalska, K., Chelminiak-Dudkiewicz, D., Kowalonek, J., Kaczmarek, H., 2018. Photochemical Reactions in Dialdehyde Starch. *Molecules* 23, 3358. <https://doi.org/10.3390/molecules23123358>
- Zuo, Y., Liu, W., Xiao, J., Zhao, X., Zhu, Y., Wu, Y., 2017. Preparation and characterization of dialdehyde starch by one-step acid hydrolysis and oxidation. *Int. J. Biol. Macromol.* 103, 1257–1264. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.188>

