

Programa de Pós-graduação
Multicêntrico em Química de Minas Gerais
Universidade Federal de Itabubá – *Campus Itabira*



Matheus Valentin Maia

**Nanopartículas híbridas termossensíveis baseadas em proteína-polímero como um
potencial sistema carreador de agentes terapêuticos contra o câncer**

Itabira
2025

Matheus Valentin Maia

Nanopartículas híbridas termossensíveis baseadas em proteína-polímero como um potencial sistema carreador de agentes terapêuticos contra o câncer

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Linha de Pesquisa: Química Medicinal

Orientador: Dr. Daniel Cristian Ferreira Soares

Itabira

2025

*Dedico este trabalho ao meu pai (in memoriam),
à minha avó (in memoriam)
e a todos aqueles que acreditam na ciência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir realizar este trabalho, sendo sempre meu amparo e refúgio em todos os momentos. Mais uma vez, Ele transformou os muitos “impossíveis” em realidade.

À minha mãe e à minha irmã, pelo apoio incondicional e por terem sonhado este momento junto comigo desde o início, mantendo sempre a união e a resiliência diante dos desafios impostos pela vida. Ao meu pai (*in memoriam*), dedico este trabalho a você, que sempre foi meu maior incentivador e exemplo de dedicação ao trabalho e aos estudos. Você sonhou, ainda na inauguração da UNIFEI – Campus Itabira, que esta universidade faria parte do meu cotidiano e da minha trajetória acadêmica. Esse sonho se tornou realidade.

À minha namorada Angélica, por todo o companheirismo, apoio, compreensão e amor durante essa caminhada. Você foi e é meu ponto de equilíbrio, sempre acreditou no meu potencial desde que nos conhecemos. Sou eternamente grato por sua compreensão diante das minhas ausências ao longo do doutorado e dos estágios no exterior. Esta conquista não seria possível sem você. À sua família, que me acolheu com carinho, reconheceu meus esforços e sempre apoiou essa jornada — meu sincero agradecimento.

Às famílias Valentin e Maia, por todo o apoio, incentivo e por sempre acreditarem na importância da educação. A presença e o suporte de vocês foram fundamentais ao longo dessa trajetória.

Ao Colégio Tiradentes da Polícia Militar de Minas Gerais – Unidade Itabira, pelo apoio e incentivo durante o doutorado, bem como pelo reconhecimento da importância da formação continuada de seus docentes. Aos meus colegas de trabalho, agradeço pela torcida, apoio e palavras de encorajamento ao longo dessa jornada.

A todos os meus alunos ao longo desses anos, por me ouvirem, por apoiarem e por sonharem este momento junto comigo.

Ao meu orientador, Professor Dr. Daniel Cristian Ferreira Soares, pela confiança no meu trabalho e por ter acreditado no meu potencial. Agradeço pela paciência, especialmente nos momentos em que a pesquisa enfrentou estagnações, e pela parceria em buscarmos juntos alternativas para o desenvolvimento deste trabalho. Sou grato por todo o aprendizado compartilhado, pelo exemplo como professor e pesquisador, por ter conduzido este projeto com sensibilidade e por me permitir liberdade para trilhar meu próprio caminho na pesquisa.

À Professora Dra. Marli Luiza Tealdi (*in memoriam*), por suas valiosas contribuições no início deste projeto. Sua ausência é sentida por todos nós do grupo de pesquisa, assim como por todos que tiveram o privilégio de conviver com uma grande pesquisadora.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia 2210, a todos os técnicos, servidores e colaboradores da UNIFEI Itabira e Itajubá.

Ao coordenador do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais – Núcleo UNIFEI, Prof. Marcos Roberto de Abreu Alves, por todo apoio e direcionamento nos aspectos administrativos e burocráticos do doutorado, bem como pelo incentivo aos estágios internacionais e à conclusão desta etapa.

I thank Professor Dr. Ashok Kakkar, from McGill University (Montreal, Canada), for having accepted me into his research group as a graduate researcher during my doctoral internship abroad. I am truly grateful for the trust, for all the guidance and knowledge shared throughout my stay, and for always being open to new challenges and believing in my work. This support has undoubtedly contributed significantly to my growth as a researcher and as a person. I also thank all the labmates from the Kakkar Group (OM230) who made my journey more enjoyable and enriching: Anjali Saini, Samaneh Yousefi Adlsadabad, Fei Rui Long, Laura McKay, Hui Wen Yong, and Ludivine Trizac-Mattern. Thank you for your help with experiments, for your valuable insights, and for the constructive criticism that helped improve both my work and my perspective. My sincere thanks as well to all the technicians and staff members of the Department of Chemistry at McGill University.

I thank Professor Dr. Ketul Popat, from Colorado State University, for welcoming me as a visiting researcher under the CAPES-Fulbright program. I am grateful for the warm reception and for the opportunity to visit the facilities and collaborate in his laboratory.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar deste momento tão importante e por terem, sem dúvida, contribuído para a minha formação, sendo também fonte de inspiração como professores e pesquisadores.

À Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), pelo apoio institucional e pelas bolsas concedidas, tanto para o doutorado como para o estágio de curta duração no exterior (McGill University – Canadá).

À CAPES, pelo apoio concedido por meio das bolsas do Doutorado Nacional e do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE – McGill University – Canadá), assim como à Comissão CAPES-Fulbright, pela valiosa oportunidade de visita Colorado State University (EUA).

A todos que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho — seja de forma intelectual, acadêmica, emocional ou espiritual — meu mais sincero agradecimento.

A todos que acreditam na ciência e em um mundo melhor!

“Itabira é apenas uma fotografia na parede.

Mas como dói.”

— Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Nos últimos anos, materiais híbridos envolvendo proteínas e polímeros têm despertado grande interesse na área biomédica, especialmente no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. A conjugação entre essas duas classes de materiais permite reunir biocompatibilidade, estabilidade e funcionalidade em um único sistema. Entre as proteínas de origem natural, a fibroína de seda (SF) destaca-se como um biocomposto promissor, enquanto o poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL) oferece resposta termossensível adequada a aplicações terapêuticas. Neste cenário, o sistema híbrido SF–PNVCL surge como uma estratégia inovadora para o desenvolvimento de nanocarreadores capazes de responder a estímulos específicos, como o aumento de temperatura, otimizando a liberação de agentes terapêuticos. Neste trabalho, foram desenvolvidos sistemas híbridos inéditos baseados na fibroína de seda (SF) e o (PNVCL), com o objetivo de desenvolver nanopartículas capazes de promover a liberação controlada de agentes terapêuticos, utilizando a curcumina como agente terapêutico modelo. A síntese do sistema híbrido foi realizada pela metodologia *grafting-from*, utilizando a técnica de polimerização radicalar por adição-fragmentação reversível (RAFT), a partir da funcionalização da fibroína com agentes de transferência de cadeia (CTA₁ e CTA₂). Uma segunda rota de síntese foi planejada por meio da ativação dos CTA₂ com pentafluorofenol (PFP). Os sistemas desenvolvidos foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), difração de raios X de pó (PXRD). As nanopartículas dos sistemas híbridos foram caracterizadas pelo espalhamento dinâmico de luz (DLS), medição do potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados revelaram que os sistemas obtidos apresentaram morfologia nanoparticulada (~200 nm), estabilidade coloidal e comportamento termorresponsivo com transição de fase próxima a 40 °C. Além disso, os sistemas demonstraram eficiência de encapsulamento da curcumina (~40%) e liberação intensificada a temperaturas elevadas. A análise da cinética de liberação indicou melhor ajuste aos modelos matemáticos de Weibull e Gompertz ($R^2 > 0,99$), sugerindo um processo controlado e termorresponsivo. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*, avaliados por citometria de fluxo, revelaram baixa toxicidade em células normais (MRC-5) e alta seletividade frente à linhagem tumoral 4T1, com até 49,5% de inibição celular. Diante dos resultados obtidos, é possível considerar que os sistemas híbridos SF–PNVCL representam uma plataforma promissora para o desenvolvimento de carreadores inteligentes de agentes terapêuticos, com potencial aplicação em terapias direcionadas.

Palavras-chave: Materiais híbridos; Fibroína; Termossensibilidade; Sistema Carreador; PNVCL; nanopartículas.

ABSTRACT

In recent years, hybrid materials combining proteins and polymers have attracted significant interest in the biomedical field, particularly in the development of controlled drug delivery systems. The conjugation of these two classes of materials enables the integration of biocompatibility, stability, and functionality into a single system. Among natural proteins, silk fibroin (SF) stands out as a promising biocompatible material, while poly(*N*-vinylcaprolactam) (PNVCL) offers a thermoresponsive behavior suitable for therapeutic applications. In this context, the SF–PNVCL hybrid system emerges as an innovative strategy for the development of nanocarriers capable of responding to specific stimuli, such as temperature increases, thereby optimizing the release of therapeutic agents. In this work, novel thermoresponsive hybrid systems based on silk fibroin (SF) and PNVCL were developed, aiming to produce nanoparticles capable of promoting controlled release of therapeutic agents, using curcumin as a model drug. The hybrid systems were synthesized using a *grafting-from* strategy via reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization, through the functionalization of fibroin with chain transfer agents (CTA₁ and CTA₂). A second synthetic route was established by activating CTA₂ with pentafluorophenol (PFP). The systems were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA), and powder X-ray diffraction (PXRD). The nanoparticles were further evaluated by dynamic light scattering (DLS), zeta potential measurements, and transmission electron microscopy (TEM). The results revealed that the hybrid systems exhibited nanoparticulate morphology (~200 nm), good colloidal stability, and a thermoresponsive phase transition near 40 °C. Additionally, the nanoparticles demonstrated curcumin encapsulation efficiency of approximately 40%, with enhanced release at elevated temperatures. The release kinetics showed a better fit to the Weibull and Gompertz models ($R^2 > 0.99$), indicating a controlled and thermoresponsive release process. *In vitro* cytotoxicity assays, evaluated by flow cytometry, revealed low toxicity in normal cells (MRC-5) and high selectivity toward the 4T1 cancer cell line, with up to 49.5% cell inhibition. Based on these findings, SF–PNVCL hybrid systems represent a promising platform for the development of smart carriers for targeted therapeutic applications.

Keywords: Hybrid materials; Fibroin; Thermosensitivity; Carrier system; PNVCL; nanoparticles.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
7-AAD	7-Amino-actinomicina D
ATRP	Polimerização Radicalar Controlada por Transferência de Átomo
CE	Capacidade de Encapsulação
CTA	Agente de Transferência de Cadeia
DCM	Diclorometano
DDS	<i>Drug delivery systems</i>
DIC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DP	Desvio padrão
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DTG	Derivada da Termogravimetria
EE	Eficiência de encapsulação
ESI-MS	Espectrometria de Massa por Ionização por Electrospray
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
LCST	Lower Critical Solution Temperature (Temperatura Crítica Inferior de Solução)
LL	(Lower Left): células viáveis (PI ⁻ / 7-AAD ⁻),
LR	(Lower Right): apoptose inicial (PI ⁻ / 7-AAD ⁺).
MALDI-TOF	Espectrometria de Massa de Dessorção/Ionização por Laser Assistida por Matriz - Tempo de Voo
MCTA	Macro Agente De Transferência Cadeia
MET	Microscopia eletrônica de varredura
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
NVCL	N-Vinilcaprolactama
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada Fosfato
PDI	Índice de Dispersão de Polímero
PEG	Polietilenoglicol
PFP	Pentafluorofenol
PI	<i>Propidium Iodide</i> (iodeto de propídio)
PNVCL	Poli(N-vinilcaprolactama)
PXRD	Difração de Raios X de Pó

RAFT	Polimerização por transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SF	Silk Fibroin (Fibroína da Seda)
TGA	Análise Termogravimétrica
UL	(Upper Left): células em necrose tardia ou com lesão avançada (PI ⁺ / 7-AAD ⁻),
UR	(Upper Right): células mortas (PI ⁺ / 7-AAD ⁺)

Sumário

APRESENTAÇÃO GERAL.....	16
INTRODUÇÃO	18
OBJETIVO E JUSTIFICATIVA.....	21
CAPÍTULO 1 – FIBROIN-HYBRID SYSTEMS: CURRENT ADVANCES IN BIOMEDICAL APPLICATIONS	22
1. INTRODUCTION.....	23
2. FIBROIN: ISOLATION AND PURIFICATION	26
3. POLYMER-FIBROIN HYBRID MATERIALS.....	29
4. INORGANIC-FIBROIN HYBRID SYSTEMS	42
5. CONCLUSIONS AND FUTURE OUTLOOK.....	47
CAPÍTULO 2 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBROÍNA A PARTIR DE CASULOS DE BICHO-DA-SEDA	49
1. INTRODUÇÃO.....	49
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FIBROÍNA DA SEDA.....	49
3.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	51
3.3. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	51
3.4. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.....	51
3.5. ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR POR SDS-PAGE E MALDI-TOF.....	52
3.6. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM PÓ	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1. CARACTERIZAÇÃO DA FIBROÍNA SF-COMERCIAL	52
4.1.1. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER ..	52
4.1.2. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS).....	56
4.1.3. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.....	57

4.1.4.	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM PÓ (PXRD)	58
4.1.5.	SOLUBILIDADE DA FIBROÍNA.....	60
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FIBROÍNA EXTRAÍDAS DOS CASULOS DO BICHO DA SEDA BOMBYX MORI	61
4.2.1.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER..	61
4.2.2.	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	62
4.2.3.	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA.....	63
4.2.4.	DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM PÓ (PXRD)	64
4.2.5.	SOLUBLIDADE DAS AMOSTRAS DE FIBROÍNA.....	65
4.2.6.	AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR SDS-PAGE E MALDI-TOF	66
5.	CONCLUSÃO.....	67
CAPÍTULO 3 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS HÍBRIDOS SF-PNVCL VIA POLIMERIZAÇÃO RAFT		69
1.	INTROUÇÃO.....	69
2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	70
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.1.	REAGENTE E SOLUÇÕES	71
3.2.	SÍNTESE DO AGENTE DE TRANSFERÊNCIA DE CADEIA (CTA ₂)	71
3.3.	ATIVAÇÃO CTA ₂ COM PENTAFLUOROFENOL (PFP)	72
3.4.	SÍNTESE MACRO AGENTE DE TRANSFÊNCIA RAFT (MCTA) (ROTA A)	73
3.5.	SÍNTESE MACRO AGENTE DE TRANSFERENCIAS RAFT (ROTA B)	74
3.6.	POLIMERIZAÇÃO DO NVCL SOBRE OS MCTAs	75
3.7.	CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E TÉRMICA.....	75
3.8.	ESPECTROMETRIA DE MASSA	75
3.9.	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	76
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE DE TRANSFERÊNCIA COMERCIAL (CTA ₁).....	76
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE DE TRANFERÊNCIA CTA ₂ E CTA ₂ -PFP	77

4.3.	CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL _{A1} VIA ROTA (A).....	82
4.3.1.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DO SISTEMA SF-PNVCL _{A1}	82
4.3.2.	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO SISTEMA SF-PNVCL _{A1}	84
4.3.3.	ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM PÓ DO SISTEMA SF-PNVCL _{A1}	86
4.3.4.	ESTUDO DA TRANSIÇÃO DE FASE DO SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL _{A1}	88
4.4.	CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL _{B2} VIA ROTA (B).....	89
4.4.1.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DO SISTEMA SF-PNVCL _{B2}	89
4.4.2.	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO SISTEMA SF-PNVCL _{B2}	90
4.4.3.	ANÁLISE DA DIFRAÇÃO RAIOS-X EM PÓ DO SISTEMA SF-PNVCL _{B2}	92
4.4.4.	TRANSIÇÃO DE FASE DO SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL _{B2}	94
5.	CONCLUSÃO	94
CAPÍTULO 4 – PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS TERMOSENSÍVEIS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COMO SISTEMA CARREADOR DE AGENTES TERAPÊUTICOS.....		96
1.	INTRODUÇÃO	96
2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	96
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	96
3.1.	REAGENTES E SOLUÇÕES	96
3.2.	PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS.....	97
3.3.	PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS-CURCUMINA.....	97
3.4.	ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA ..	98
3.5.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)	98
3.6.	AVALIAÇÃO DO PERFIL TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS	99
3.7.	ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA.....	99
3.8.	PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA.....	99
3.9.	ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA.....	100
3.10.	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	100

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
4.1. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA CURCUMINA.....	101
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA DE SEDA (SF).....	102
4.2.1. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA	102
4.2.2. COMPORTAMENTO TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS DE SF...	103
4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS SF-PNVCL _{A1}	105
4.3.1. TAMANHO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA E COMPORTAMENTO TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS DO SISTEMA SF-PNVCL _{A1}	105
4.3.2. COMPORTAMENTO TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS DO SISTEMA SF-PNVCL _{A1}	108
4.3.3. ENCAPSULAMENTO DA CURCUMINA E PERFIL DE LIBERAÇÃO.....	110
4.3.4. MODELAGEM MATEMÁTICA APLICADA AO PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA DO SISTEMA SF-PNVCL _{A1}	111
4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS SF-PNVCL _{B2}	115
4.4.1. TAMANHO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS DO SISTEMA SF-PNVCL _{B2}	115
4.4.2. COMPORTAMENTO TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS DO SISTEMA SF-PNVCL _{B2}	118
4.4.3. ENCAPSULAMENTO DA CURCUMINA E PERFIL DE LIBERAÇÃO.....	119
4.4.4. ESTUDO CINÉTICO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA DO SISTEMA SF-PNVCL _{B2}	121
4.5. ESTUDO <i>IN VITRO</i> DA BIOCOMPATIBILIDADE E CITOTOXICIDADE	125
4.5.1. ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS SF-PNVCL _{A1} E SF-PNVCL _{B2} EM CÉLULAS NORMAIS HUMANAS (MRC-5).....	125
4.5.2. ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DOS SISTEMAS HÍBRIDOS SF-PNVCL _{A1} SF-PNVCL _{B2} EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MURINO (4T1)	128
5. CONCLUSÃO.....	134
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	136
REFERÊNCIAS - CAPÍTULO 1.....	137

REFERÊNCIAS GERAIS	146
APÊNDICE A – HOMOPOLIMERIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PNVCL	153
APÊNDICE B - DIFRAÇÃO DE RAIOS X (PXRD) DO MONÔMERO NVCL	154
APÊNDICE C - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (NVCL E PNVCL)	155
APÊNDICE D - PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA LIVRE	156
APÊNDICE E – ANÁLISE DA FIBROÍNA DE SEDA POR SDS-PAGE.....	157
APÊNDICE F – SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL _{A2}	158
APÊNDICE G – SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL _{B1}	164
PRODUÇÃO CIENTÍFICA PRODUZIDA DURANTE O DOUTORAMENTO	171

APRESENTAÇÃO GERAL

A presente tese de doutorado foi desenvolvida no contexto da pesquisa aplicada em sistemas híbridos para liberação controlada de fármacos, com ênfase no uso de polímeros termorresponsivos e biomateriais derivados de proteínas naturais. O trabalho foi realizado em parceria internacional, com atividades experimentais conduzidas no Departamento de Química da McGill University, em Montreal (Canadá), sob a orientação do Professor Dr. Ashok Kakkar, pesquisador na área de química de polímeros e sistemas nanoestruturados com aplicação biomédica.

Esta colaboração internacional permitiu a integração de metodologias de síntese e caracterização avançadas, além de proporcionar acesso a infraestrutura laboratorial de excelência, ampliando significativamente a abrangência científica e a qualidade dos resultados obtidos. Paralelamente, parte das etapas de caracterização e análise foram realizadas nos laboratórios da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), consolidando um fluxo de trabalho multidisciplinar e cooperativo entre instituições de referência.

A tese está estruturada em quatro capítulos principais, que refletem o encadeamento lógico da pesquisa, desde a escolha e caracterização dos materiais de base até a avaliação funcional das formulações obtidas.

O Capítulo 1 apresenta uma revisão da literatura sobre sistemas híbridos à base de fibroína de seda, com ênfase em suas aplicações biomédicas, abordando aspectos estruturais, funcionais e tecnológicos.

No Capítulo 2 está apresentada a caracterização físico-química da fibroína de seda comercial, em seguida, é descrito o processo de extração da fibroína a partir de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), empregando diferentes rotas laboratoriais. Por fim, é realizada uma comparação entre as amostras extraídas e a amostra comercial, com o objetivo de avaliar a viabilidade de substituição da fibroína comercial pelas proteínas extraídas em laboratório.

O Capítulo 3 descreve as estratégias de funcionalização da fibroína de seda com agentes de transferência de cadeia (CTAs), seguidas da polimerização controlada via RAFT para a obtenção dos sistemas híbridos com poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL). São apresentadas duas rotas sintéticas distintas: a Rota A, baseada na utilização de um CTA comercial, e a Rota B, que emprega um CTA sintetizado e posteriormente ativado com PFP.

Dentro do Capítulo 4 está apresentado a preparação de nanopartículas a partir dos sistemas híbridos SF–PNVCL, com ênfase na encapsulação da curcumina como agente terapêutico modelo. São descritos os processos de obtenção das nanopartículas, bem como os estudos de liberação controlada em função da temperatura, explorando a resposta termossensível do sistema. Além disso, o capítulo

inclui ensaios de citotoxicidade realizados em diferentes linhagens celulares, com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade e a eficácia antitumoral das formulações desenvolvidas.

A Química, em sua essência, é a ciência que estuda o “invisível” — aquilo que escapa aos olhos, mas move o mundo. É a ponte entre o átomo e a vida, entre o conhecimento e a cura. No combate ao câncer, essa ciência assume um papel transformador: ao manipular moléculas, projetar sistemas inteligentes e controlar interações intermoleculares, a Química permite que os avanços nessa área não seja apenas uma esperança, mas um processo racional, construído passo a passo.

Nesta tese, a Química aparece não apenas como instrumento técnico, mas como linguagem capaz de criar pontes entre o natural e o sintético, o biológico e o molecular, o sensível e o inteligente. Desenvolver um sistema híbrido capaz de responder a estímulos térmicos e liberar ali, com precisão, um agente terapêutico é um gesto filosófico: é reconhecer que, por trás de cada molécula, há uma intenção humana, uma luta pela vida, uma busca pela precisão em meio ao caos da doença.

Este trabalho é, assim, um testemunho da Química como ciência central, que une saberes, transcende fronteiras disciplinares e se coloca, com humildade, a serviço do próximo e na fronteira do conhecimento. Porque, ao final, o que nos move não é apenas a beleza das estruturas ou a elegância das reações, mas a possibilidade de transformar conhecimento em vida.

INTRODUÇÃO

O câncer continua a ser uma das principais preocupações de saúde pública em todo o mundo, representando uma carga significativa de morbidade e mortalidade[1,2]. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença é responsável por milhões de mortes anualmente, e seu impacto tende a crescer, especialmente em países em desenvolvimento, onde os recursos para diagnóstico e tratamento são limitados[3,4]. Caracterizado pelo crescimento descontrolado e invasivo de células atípicas, sua proliferação pode culminar na invasão de tecidos adjacentes, espalhando outras partes do corpo—a chamada metástase[5,6]. Existem mais de 100 tipos diferentes da doença, cada um com características únicas em termos de origem, comportamento e resposta ao tratamento. No entanto, todos compartilham um mecanismo subjacente comum: alterações genéticas que impulsionam a transformação celular e a perda do controle do ciclo celular [7].

Os tratamentos convencionais para o câncer incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, frequentemente utilizados em combinação para aumentar a eficácia terapêutica [8]. A cirurgia é empregada principalmente para remover o tumor primário e as áreas circundantes afetadas, enquanto a radioterapia utiliza radiação ionizante para destruir as células cancerígenas [8]. Já a quimioterapia faz uso de agentes citotóxicos que impedem a divisão e o crescimento celular [8]. Apesar de sua eficácia, a quimioterapia apresenta limitações significativas, como resistência dos tumores aos fármacos, toxicidade sistêmica e impactos adversos na qualidade de vida dos pacientes. Além disso, sua falta de especificidade e a alta toxicidade das formulações disponíveis restringem o uso desses fármacos em doses elevadas e por períodos prolongados [9–12]. Outro desafio importante é a hidrofobicidade de muitos agentes antitumorais, o que compromete sua solubilização, reduz sua estabilidade na corrente sanguínea, facilita sua degradação e dificulta seu transporte através das barreiras biológicas do organismo ([13]). Diante dessas limitações, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas torna-se essencial para otimizar os resultados clínicos e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com câncer [14,15].

Atualmente, a curcumina — um composto natural encontrado na raiz da *Curcuma longa* (popularmente conhecida como açafrão-da-terra ou cúrcuma) — tem ganhado destaque em pesquisas devido aos seus potenciais benefícios à saúde, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Seu diferencial reside no fato de ser um composto de origem natural, característica que tem despertado crescente interesse no desenvolvimento de terapias mais seguras e eficazes. [16,17].

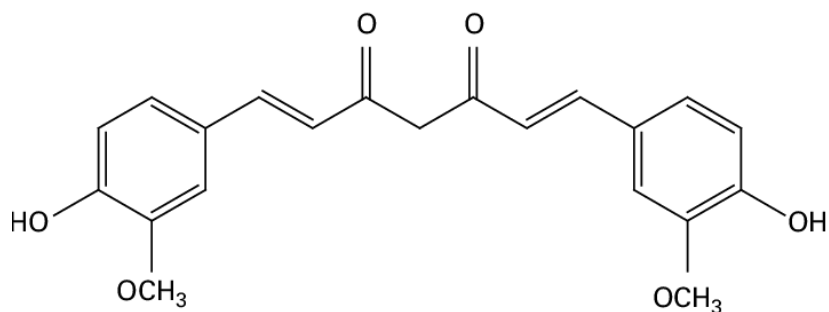


Figura 1. Representação da estrutura molecular da Curcumina.

No contexto do potencial anticâncer da curcumina, pesquisas têm sugerido que ela pode ter efeitos inibitórios sobre o crescimento e proliferação de células cancerígenas em vários tipos de câncer, incluindo câncer de mama, colorretal, próstata, pulmão e entre outros [18,19]. A curcumina pode exercer esses efeitos através de uma variedade de mecanismos, incluindo a indução da morte celular programada (apoptose), a inibição da angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos que alimentam o tumor) e a supressão da inflamação crônica, que pode promover o crescimento tumoral [18–21]. Além disso, a curcumina também tem sido estudada por sua capacidade de aumentar a eficácia de tratamentos convencionais contra o câncer, como a quimioterapia e a radioterapia quando administrada em conjunto [22–24]. A solubilidade limitada da curcumina é um desafio significativo na sua administração em humanos para o tratamento do câncer, uma vez que ela é insolúvel em água e tem uma baixa biodisponibilidade quando administrada por via oral, o que significa que uma grande parte do composto é excretada do corpo sem ser absorvida [25,26]. Este problema de solubilidade pode resultar em uma absorção inadequada da curcumina pelo organismo, o que limita sua eficácia terapêutica contra o câncer ou mesmo quando a curcumina é absorvida, ela é rapidamente metabolizada e eliminada do corpo, o que reduz ainda mais sua concentração no sangue e nos tecidos-alvo [25–28].

Desse modo, apesar do grande potencial da curcumina, sua aplicação e administração ainda representam desafios significativos. Uma abordagem para lidar com esses desafios é o uso de sistemas carreadores de fármacos, uma metodologia que visa melhorar a eficácia e a segurança dos tratamentos [29,30]. De maneira geral, os sistemas carreadores de fármacos, conhecidos como *Drug Delivery Systems* (DDS), emergem como uma das principais alternativas aos tratamentos convencionais, uma vez que esses sistemas apresentam um melhor direcionamento e controle de liberação dos agentes antitumorais, potencializando ainda mais a atividade antitumoral e a diminuição da toxicidade quando comparada aos fármacos na forma livre [31–34]. Entre os sistemas mais estudados estão os do tipo nanoparticulados, lipossomas, micelas, hidrogéis, polímeros e entre outros. Esses sistemas são conhecidos por sua biocompatibilidade, capacidade de proteção do fármaco contra a degradação

enzimática e redução da toxicidade sistêmica, no entanto, eles também podem enfrentar desafios relacionados à estabilidade em circulação e controle preciso da liberação do fármaco [35–38].

Uma classe emergente de DDS que tem despertado interesse é aquela baseada em sistemas híbridos, combinando características de diferentes materiais para otimizar a entrega de fármacos antitumorais [39]. Em particular, os sistemas híbridos baseados em proteína-polímero têm se destacado devido à sua capacidade de combinar a biocompatibilidade e funcionalidade das proteínas com a versatilidade e flexibilidade dos polímeros. Esses sistemas são projetados para aproveitar as propriedades únicas das proteínas, como especificidade de ligação a receptores celulares, estabilidade em circulação e biodegradabilidade, juntamente com as vantagens dos polímeros, como capacidade de encapsulação de fármacos, controle da liberação e modularidade estrutural [40–42]. A combinação dessas características permite a concepção de DDS altamente eficazes e seletivos, capazes de contornar as barreiras biológicas e alcançar uma terapia antitumoral mais eficaz.

Este trabalho teve como objetivo a síntese, caracterização e avaliação do potencial termorresponsivo de sistemas híbridos à base de proteínas e polímeros, voltados para a liberação controlada de agente terapêuticos. O estudo investiga a utilização da proteína fibroína, em conjunto com o polímero poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL), carregado com curcumina como agente terapêutico modelo. O sistema híbrido é obtido por meio de polimerização radicalar controlada. A interação entre esses materiais explora a biocompatibilidade e capacidade de transporte das proteínas com o comportamento termorresponsivo do PNVCL, resultando em um sistema inteligente para a liberação de agentes terapêuticos.

OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

O presente trabalho tem como objetivo a síntese e caracterização de nanopartículas híbridas compostas por fibroína da seda (SF) e pelo polímero *N*-vinilcaprolactama (PNVCL), visando o desenvolvimento de um sistema híbrido inédito com propriedades termossensíveis para a liberação controlada de agentes terapêuticos.

A necessidade de estratégias terapêuticas mais eficazes e seletivas, especialmente para o tratamento de doenças como o câncer, justifica o desenvolvimento desse sistema inovador, tendo em vista as limitações significativas dos métodos convencionais de administração de fármacos.

Nesse contexto, a fibroína da seda destaca-se como um biomaterial amplamente estudado, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e versatilidade estrutural. Por sua vez, o PNVCL é um polímero termorresponsivo, cuja incorporação à matriz de fibroína confere ao sistema a capacidade de responder a estímulos térmicos permitindo uma liberação controlada dos agentes terapêuticos.

CAPÍTULO 1 – FIBROIN-HYBRID SYSTEMS: CURRENT ADVANCES IN BIOMEDICAL APPLICATIONS

Maia, M.V.; Egito, E.S.T. do; Sapin-Minet, A.; Viana, D.B.; Kakkar, A.; Soares, D.C.F. Fibroin-Hybrid Systems: Current Advances in Biomedical Applications. *Molecules* **2025**, *30*, 328, doi:10.3390/molecules30020328.

Neste capítulo, são apresentados os principais avanços relacionados aos sistemas híbridos baseados em fibroína de seda (SF), com ênfase em suas aplicações no campo biomédico. A fibroína, uma proteína natural extraída do casulo do bicho-da-seda *Bombyx mori*, tem se destacado por suas propriedades únicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade. No entanto, suas limitações estruturais e funcionais em ambientes fisiológicos motivaram o desenvolvimento de sistemas híbridos obtidos por modificação química com polímeros sintéticos e compostos inorgânicos. Assim, este capítulo revisa os fundamentos estruturais e funcionais da fibroína, suas estratégias de isolamento e purificação, bem como os métodos de funcionalização por polimerização e formação de materiais híbridos. São abordados tanto os sistemas SF–polímero quanto os sistemas SF–inorgânico, cuja funcionalização tem permitido melhorar a estabilidade, a bioatividade e o desempenho mecânico da proteína, ampliando significativamente suas possibilidades de aplicação. Também são discutidos exemplos recentes da literatura que demonstram o potencial desses sistemas em áreas como liberação controlada de fármacos, engenharia de tecidos, terapia gênica e cicatrização de feridas, destacando os resultados de ensaios pré-clínicos e os desafios que ainda precisam ser superados para a aplicação clínica desses materiais inovadores.

Fibroin-Hybrid Systems: Current Advances in Biomedical Applications

Matheus Valentin Maia ^{1,2}, Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito ³, Anne Sapin-Minet ⁴, Daniel Bragança Viana ¹, Ashok Kakkar ^{2,*} and Daniel Crístian Ferreira Soares ^{1,*}

¹ Laboratório de Bioengenharia, Universidade Federal de Itajubá, Itabira, Minas Gerais 35903-087, Brazil; matheus.maia@mail.mcgill.ca or matheusv11@yahoo.com.br (M.V.M.); danieltumblin@unifei.edu.br (D.B.V.)

² Department of Chemistry, McGill University, 801 Sherbrooke Street West, Montréal, QC H3A 0B8, Canada

³ Laboratório de Sistemas Dispersos LaSiD, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande no Norte, Natal, Rio Grande do Norte 59012-570, Brazil; socratesegito@gmail.com

⁴ Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine, CITHEFOR, F-54000 Nancy, France; anne.sapin@univ-lorraine.fr

* Correspondence: ashok.kakkar@mcgill.ca (A.K.); soares@unifei.edu.br (D.C.F.S.)

Abstract: Fibroin, a protein extracted from silk, offers advantageous properties such as non-immunogenicity, biocompatibility, and ease of surface modification, which have been widely utilized for a variety of biomedical applications. However, in vivo studies have revealed critical challenges, including rapid enzymatic degradation and limited stability. To widen the scope of this natural biomacromolecule, the grafting of polymers onto the protein surface has been advanced as a platform to enhance protein stability and develop smart conjugates. This review article brings into focus applications of fibroin-hybrid systems prepared using chemical modification of the protein with polymers and inorganic compounds. A selection of recent preclinical evaluations of these hybrids is included to highlight the significance of this approach.

Keywords: silk fibroin; hybrid system; surface-grafting polymerization; chemical modification; biomedical applications

1. INTRODUCTION

Silk is a natural, protein-based material produced by arthropods, including arachnids and silkworms, such as the *Bombyx mori* species. Silkworms, not domesticated silk moths, are the producers of silk, which has been used by humans for thousands of years due to its luster,

mechanical strength, and flexibility. These properties arise from their unique chemical and structural interactions across hierarchical length scales [1–3]. Silk threads are composed of two fibroin brins coated with sericin, glycoproteins, and lipids. Silk fibroin (SF) from *Bombyx mori* consists of a 325 kDa heavy chain linked to a 25 kDa light chain through a disulfide bond. While the heavy chain is primarily composed of repetitive amino acids such as alanine, glycine, and serine, the amino acid composition of the light chain is more variable and lacks the same repetitive motifs [1,2]. Biodegradability, biocompatibility, and non-immunogenicity of silk-based materials have attracted considerable interest, especially for biomedical applications [3,4]. Fibroin, a protein extracted from silk, has emerged as a highly promising material in this regard, primarily due to its remarkable physicochemical and biological properties, which include its ability to encapsulate various therapeutic agents, such as proteins, enzymes, genetic materials (e.g., DNA, RNA), and anticancer drugs, making it a versatile platform for drug delivery [5,6].

Fibroin-based nanoparticles and hydrogels allow precise control over particle size and drug release profiles, facilitating controlled and sustained release of therapeutic molecules at the target site [5–7]. Fibroin has shown exceptional potential in tissue engineering, where it can serve as a scaffold for regenerating tissues, including skin, bone, cartilage, and even nerve tissues, due to its high mechanical strength, biocompatibility, and ability to support cell adhesion and proliferation [8–10]. Fibroin has also been explored in wound healing, where its hemostatic properties and ability to facilitate tissue regeneration promote rapid recovery [11,12]. Recent studies have demonstrated the use of fibroin in advanced biomedical applications, such as the development of bioinks for 3D bioprinting, biosensors for diagnostic purposes, and antimicrobial coatings for medical devices [13,14]. These versatile applications underscore the adaptability and importance of fibroin in modern biomedical research and clinical practice.

Despite its numerous advantages, fibroin presents several challenges that can hinder its efficacy in biomedical applications. One of the most significant limitations is its susceptibility to enzymatic degradation by proteases in vivo, which compromises its structural and functional stability in biological environments. This degradation reduces its efficacy as a material for drug delivery systems or structural scaffolds in tissue engineering [10,15–17]. Furthermore, fibroin's instability under physiological conditions often results in inconsistent performance, necessitating the use of stabilizing agents or chemical modifications to enhance its durability and functionality [17–19]. To address the above-mentioned limitations, recent research has focused on advanced chemical modification techniques [15–19]. A key strategy involves the functionalization of fibroin with polymers to enhance its stability and solubility under physiological conditions. Polymer functionalization not only increases fibroin's resistance to enzymatic degradation but also

improves its capacity for controlled drug release, thereby extending its therapeutic efficacy, for example [15,16,20,21]. Additionally, inorganic compounds such as hydroxyapatite and silica have been conjugated into fibroin matrices to form hybrid systems, which could offer new venues for applications [22–24]. Studies on developing fibroin-hybrid nanoparticles are relatively recent, and from the data obtained from Scopus using the search keyword “fibroin nanoparticles”, it is noted that only a few papers were published annually until the year 2007 (Figure 1A). However, significant growth has been observed since 2014, and a 5000-document milestone was reached in 2021 (Figure 1A), and in 2023, a grand total of 6945 articles were published. In Figure 1B, publications reported specifically using the keyword “fibroin hybrid” are shown, which indicates a steady increase in studies over the past two decades. This suggests that the development and application of hybrid systems is becoming a major focus in recent years.

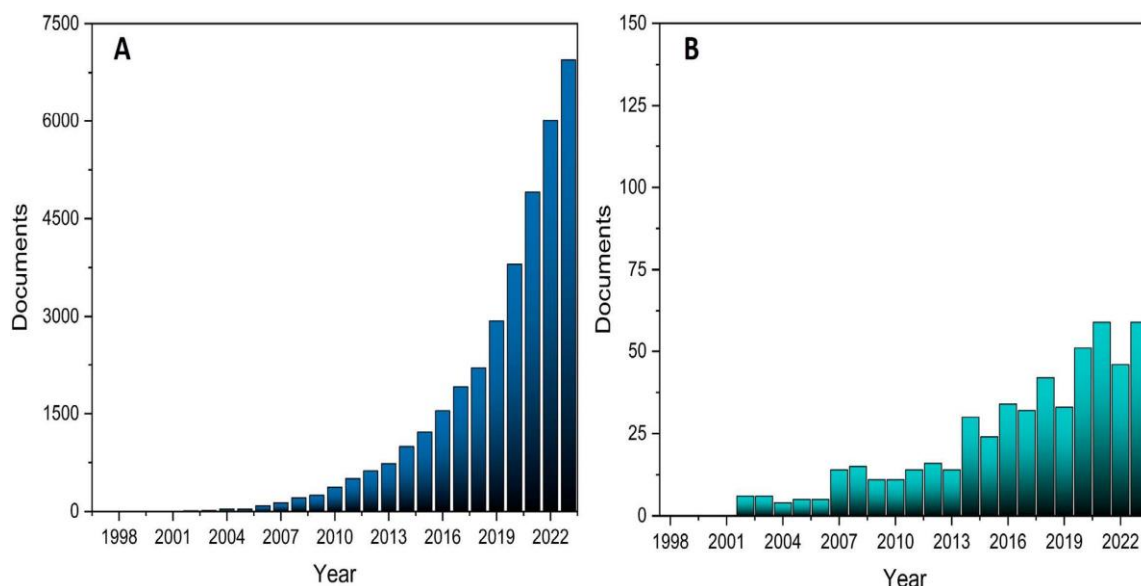


Figure 1. Publications search analysis based on the Scopus[®] database records using the keywords: fibroin nanoparticles (A) and fibroin hybrid (B).

Fibroin has a significant number of amino acids located in its side chains with functional groups such as amine, sulfhydryl, and carboxyl groups, which are sites at which chemical modification can be efficiently conducted, leading to the formation of hybrid derivatives or composites. Furthermore, such modifications can add other relevant characteristics to the protein, highlighting thermal, photo, and redox responsiveness [25–28]. For example, fibroin has been associated with gold and silver metals aiming to produce hybrid materials for antibacterial and sensing devices [29,30]. In addition, the protein has been linked to metal oxides of iron and zinc for tissue engineering applications [31,32]. Biodistribution studies have revealed relevant in vivo

characteristics of the hybrid fibroin nanoparticles, which can accumulate in tumor regions, significantly reducing the growth rhythm of cancer cells, displaying prolonged blood circulation time, reducing hemolysis, and accumulating in non-target tissues such as the heart, spleen, liver, and lungs [33–35].

This review brings into focus the most recent advances in fibroin functionalization, specifically focusing on the grafting of polymers and inorganic compounds onto the protein surface (Figure 2). Regarding studies involving polymers and fibroin, only reports that feature chemical modifications are discussed, excluding those that rely solely on physical mixing techniques such as electrospinning. It also aligns with the IUPAC definition of hybrid materials. Additionally, this review highlights advanced applications of fibroin-based hybrid systems and a selection of recent preclinical studies, which are included to show the importance and potential impact of this approach in advancing biomedical applications.

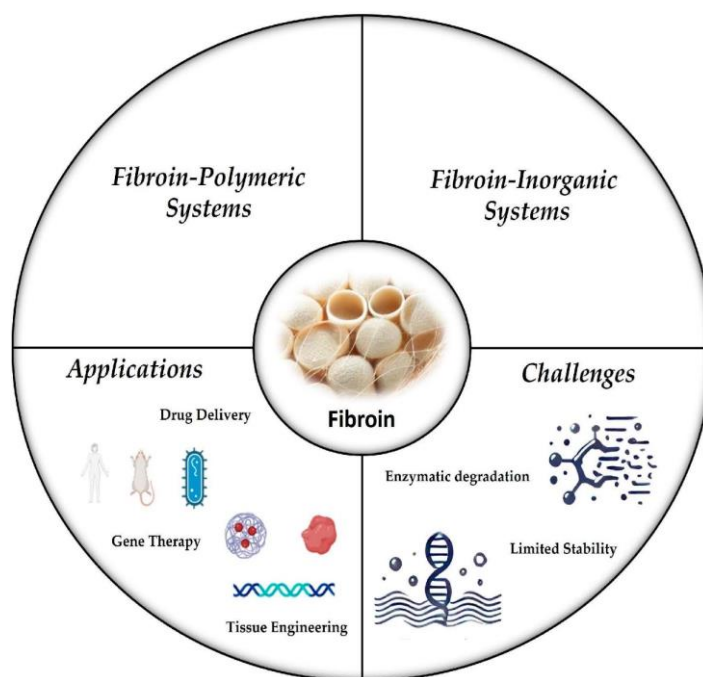


Figure 2. Schematic representation of fibroin-based hybrid systems with emphasis on two main categories: polymer- and inorganic-hybrid systems. Key applications include tissue engineering, drug delivery, and gene therapy, with challenges such as enzymatic degradation and limited stability.

2. FIBROIN: ISOLATION AND PURIFICATION

The importance of obtaining pure protein cannot be overstated when aiming to perform chemical modifications on fibroin. Impurities, such as sericin and other residual components, can interfere with functionalization and compromise the intended properties of the modified material.

High-purity fibroin ensures that its functional groups, such as hydroxyl, carboxyl, and amine, remain accessible and reactive during modification steps. Furthermore, the removal of impurities prevents unwanted side reactions that could negatively affect the mechanical, thermal, and biological properties of the resulting hybrid systems. Purity is also crucial for the reproducibility of chemical reactions, allowing for the precise tailoring of fibroin-based materials for specific applications.

To achieve acceptable levels of purity, fibroin extraction involves a selective and rigorous process (Figure 3, Table 1), typically beginning with degumming (Figure 3, S₁) using an alkaline treatment, which is the most widely used method for degumming fibroin from *Bombyx mori* silk cocoons [36]. The degumming protocol involves cutting silk cocoons into small pieces and boiling them in a 0.02 M aqueous sodium carbonate (Na₂CO₃) solution for about 30 to 35 min under constant agitation. Sodium carbonate selectively solubilizes sericin that coats fibroin threads, while fibroin itself remains insoluble, forming a spongy mass. This mass is then thoroughly washed with deionized water and dried overnight at room temperature [36–38].

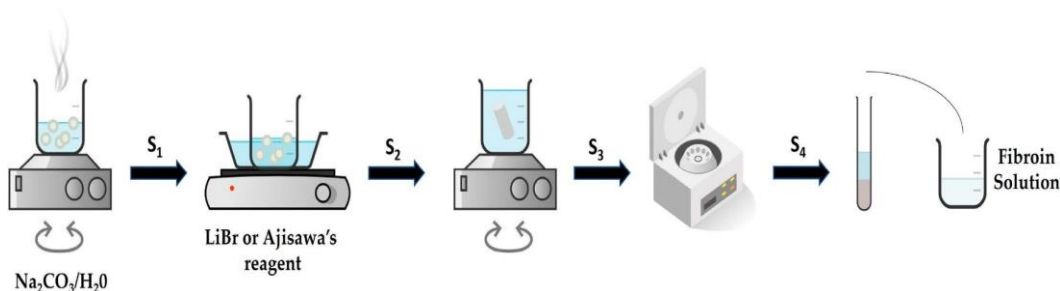


Figure 3. General procedure for fibroin isolation. The raw silk cocoons are boiled in a solution of sodium carbonate to remove sericin (S₁), and the silk fibers are dissolved in a highly concentrated solution, such as lithium bromide or Ajisawa’s reagent, to break down the fibers into a fibroin solution (S₂). The fibroin solution is dialyzed against distilled water to remove the solvent and any other small molecules (S₃), resulting in a purified fibroin solution, and at the end of the process, the solution is centrifuged (S₄) to remove any remaining impurities.

Once fibroin is dried, solubilization (Figure 3, S₂) can be carried out using a variety of methods. Popular approaches include the addition of lithium bromide (LiBr) [39–41] or Ajisawa’s reagent (CaCl₂/EtOH/H₂O) [42–44]. Ajisawa’s reagent is particularly favored due to its cost-effectiveness and efficiency. After solubilization, the fibroin solution undergoes purification through dialysis (Figure 3, S₃) against distilled water for 72 h, which removes low-molecular-weight impurities. Following dialysis, the solution is centrifuged (Figure 3, S₄) to separate any remaining impurities, leaving a purified fibroin in the supernatant. Table 1

summarizes important steps and possible different methods in the isolation and purification of fibroin, together with varied pitfalls in each.

The resulting fibroin solution, free of contaminants, can then be stored under refrigeration for future applications or lyophilized. This pure fibroin solution is critical for successful chemical modifications, such as polymer grafting or the incorporation of inorganic compounds, which can significantly enhance its properties for applications in biomedical engineering and material science.

Table 1 summarizes the steps involved in the purification of fibroin, with details on varied methods employed in each step, including details of chemical reagents that are utilized, the purpose of each, and drawbacks that are associated with these.

Despite the numerous advantages that silk fibroin offers in biomedical applications, including biocompatibility, biodegradability, and mechanical properties, the use of pure fibroin presents several disadvantages that limit its direct use [6,45]. One of the main limitations is the difficulty in controlling its degradation rate. Fibroin degradation can be unpredictable, depending on the biological environment and the conditions of the tissue where it is implanted [45–48]. This variability can result in an uncontrolled release of any incorporated therapeutic agent, compromising treatment efficacy. Another significant disadvantage is the lack of specific functionality in pure fibroin. Although fibroin has favorable mechanical properties, it does not possess functional groups that allow easy chemical modification or binding of bioactive molecules such as growth factors, antibiotics, or other therapeutic proteins, which poses a problem in applications that require specific biochemical interactions with cells or tissues [49,50].

Given these limitations, there is an unmet need to develop hybrid materials that combine silk fibroin with other materials. Protein-polymer hybrid materials have the potential to overcome several disadvantages of using pure fibroin. For example, the incorporation of polymers can improve biodegradation, mechanical stability, and surface functionality of fibroin-based materials [21,51,52]. Modifying fibroin with polymers can introduce additional functional groups that facilitate the binding of bioactive molecules, allowing the synthesis of more advanced medical devices, such as scaffolds for tissue engineering or controlled drug release. This approach allows tailoring materials more precisely for different medical applications, matching them with each application's unique requirements [6,45,50,52–54]. Therefore, the development of protein-polymer hybrid materials not only mitigates the disadvantages of pure fibroin but also significantly expands its potential use in regenerative medicine, drug delivery systems, and other advanced medical devices.

Table 1. Summary of Steps, Methods, and Drawbacks in Fibroin Purification.

Process	Method	Reagent/Condition	Purpose	Drawbacks	Reference
Degumming (S ₁)	Alkaline treatment	Sodium carbonate (0.02–0.05 M), 90–100 °C	Removes sericin to expose fibroin	Harsh conditions can degrade fibroin, reducing its molecular weight and affecting its properties.	[6,36]
	Enzymatic treatment	Protease enzymes (e.g., papain)	Selective sericin removal	Costly and time-consuming; requires precise pH and temperature control.	[55,56]
	Soap-based treatment	Mild soap solution, 90–100 °C	Gentle removal of sericin	Incomplete sericin removal can occur, affecting fibroin purity.	[57,58]
Solubilization (S ₂)	Chemical dissolution	Lithium bromide (9.3 M), 60 °C	Dissolves fibroin into solution	High salt concentration requires extensive dialysis;	[36]
	Ionic liquid dissolution	Ionic liquids (e.g., 1-ethyl-3- methylimidazolium acetate)	Dissolves fibroin with minimal degradation	Expensive reagents; recovery and reuse of ionic liquids are challenging.	[59,60]
	Acidic dissolution	CaCl ₂ -ethanol-water system, 60 °C	Dissolves fibroin for further processing	Corrosive reagents may damage equipment; fibroin structure can be altered.	[42–44]
Purification (S ₃)	Dialysis	Distilled water	Removes salts, chemicals, and impurities	Time-intensive process; incomplete removal can leave residual salts.	[6,36]
Filtration (S ₄)	Centrifugation	High-speed centrifuge	Separates insoluble particles and aggregates	Requires specialized equipment; energy-intensive.	[6,36]

3. POLYMER-FIBROIN HYBRID MATERIALS

Considering scientific resources, in particular SCOPUS and Web of Science, the two largest and most complete databases of abstracts and citations, it is possible to find several publications that present in their title, keywords, or abstract words such as “hybrid systems” or “hybrid nanostructures”. However, it can lead to misunderstanding of what, in fact, the term hybrid system means. According to IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), hybrid materials are composed of an intimate mixture of inorganic and/or organic components, which usually interpenetrate on a scale of less than 1 μm [61], and are the result of atomic-level interactions in multicomponent interfaces that result in materials with synergistic final properties of their components, including the presence of a very large hybrid interface [62]. In this context, composites and blends are not classified as hybrid materials. Blends constitute a mixture of two or more materials, potentially incompatible, without forming a new chemical entity. This involves a mere physical combination of materials, resulting in properties that are typically an average of the individual components. Conversely, composites entail the merging of distinct materials to generate a novel material with improved characteristics. In composites, components are frequently integrated at a macroscopic level, wherein one material serves as a matrix, and the others act as reinforcements.

The most common hybrid materials are organic–inorganic [63–65], but organic-organic hybrid materials have also played an important role in different fields, especially in biomedical applications [66,67]. Furthermore, the conjugation of synthetic polymers with various biomolecules, such as proteins, polysaccharides, and many others, combines the advantages of both natural and synthetic polymers [68]. Since 1977, when Abuchowski et al. [69] and later Kanamaru et al. [70] reported that PEGylated proteins increased circulation times in animal models relative to native proteins, there has been a significant increase in studies related to protein-polymer conjugates for therapeutic applications. Important advances have been made in the synthesis of hybrid nanomaterials that provide promising alternatives to conventional modalities and have increased the possibility of applications in biomedical areas. More specifically, the reversible-deactivation radical polymerization (RDRP) methodologies are currently the most promising routes to prepare conjugates with well-defined polymer molecular weights [6,52]. Grafting methods based on RDRP, such as atom transfer radical polymerization (ATRP) or reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT), show superiority over other methods for the synthesis of new hybrid systems, as they can provide a higher degree of control over the polymerization process, resulting in more precise and complex polymer structures with tailored properties. The latter is often essential for advanced applications in materials science, medicine, and nanotechnology [66,71–73]. In recent years, an increasing number of SF-based hybrid systems have been used for applications including incorporation and controlled release of drugs, tissue engineering and regenerative medicine, disease models, implantable devices, and others [74–76]. Although several promising studies using only fibroin in medical applications are widely found in the literature, there is an increasing trend to optimize and equip these structured nanosystems with specific functions. Synthesizing a hybrid system based on fibroin and organic polymers can be considered a promising approach to obtain nanosystems with unique properties. Combining different characteristics, the systems based on SF and polymers can allow several advantages over non-hybrid materials, such as the optimization of circulation time in the bloodstream, a high encapsulation rate, and specific release kinetics for drug delivery systems. In addition, in the tissue engineering area, these materials can improve mechanical properties and allow fine control of tissue stimulation [66,77–79]. A survey of the SF-polymer hybrid shows significant advancements in biomaterial development, and Table 2 summarizes the key hybrid systems, their physicochemical properties, biomedical applications, and characterization methods while highlighting their potential for innovative therapeutic applications.

Buga et al. [52] explored surface modification of SF fibers by grafting poly(methyl methacrylate) (PMMA) and poly(tributylsilyl methacrylate) (PTBSiMA) using RAFT poly-

merization. The fiber surfaces were functionalized with a silane coupling agent to introduce reactive vinyl groups. These groups facilitated the subsequent polymerization of MMA and TBSiMA, creating polymer chains chemically bound to the fibroin surface. Characterization confirmed successful grafting, with modified fibers showing improved thermal stability and well-defined morphologies. The inclusion of PTBSiMA, with its hydrolyzable silyl ester groups, contributed to erosion resistance and self-renewing surface properties, particularly in aqueous environments. These attributes highlight the potential for antifouling applications, traditionally used in marine contexts, to be extended into biomedical fields. In biomedical applications, antifouling properties are critical for preventing protein adsorption, bacterial adhesion, and biofilm formation on device surfaces. The self-renewing and non-fouling characteristics of the PTBSiMA-modified fibroin fibers could make them suitable for medical devices such as catheters, implants, and biosensors, where maintaining clean and biocompatible surfaces is essential.

Table 2. Summary of silk fibroin-polymer hybrid systems, elaboration of the enhanced properties, potential biomedical applications, employed assays, and physicochemical characterization methods.

Hybrid System	Properties	Potential Applications	Characterization Methods	Biomedical Assays/Next Steps	Reference
Silk fibroin-graft PMMA and PTBSiMA	Improved thermal stability, antifouling properties	Marine coatings, potential biomedical surfaces	FTIR, Thermal Analysis, SEM	Antifouling tests in aqueous environments	[52]
Silk fibroin-g-PDMAEMA	Antibacterial properties, controlled grafting, and durability	Antibacterial textiles and biomedical surfaces	FTIR, XPS, SEM	Antibacterial activity against <i>S. aureus</i> and <i>E. coli</i>	[80]
Silk fibroin-g-PNIPAM	Thermosensitive response, controlled drug release	Smart drug delivery systems	FTIR, DSC, TGA, SEM	Drug release studies with 5-FU	[81]
Silk fibroin-g-PANI	Electroactive properties, low cytotoxicity, good biocompatibility	Biocompatible sensors, electrochemical devices	¹ H-NMR, FTIR, Cyclic Voltammetry, SEM	Cytotoxicity assays with NIH/3T3 cells	[82]
Silk fibroin/Polyvinyl Pyrrolidone (PVP)	High transparency, enhanced mechanical strength, elasticity	Contact lenses, artificial vitreous materials	FTIR, SEM, XRD, Transmittance	Enzymatic Degradation of Hydrogels in vitro	[83]
Silk fibroin-g-DEAEMA	Antibacterial properties, good washing durability	Antibacterial clothing and textiles	FTIR, Raman, Washing Durability	Antibacterial assays, washing durability tests	[84]
Silk fibroin-graft phosphorylated methacrylates	Bioactivity, calcium phosphate nucleation	Bone tissue engineering, flame-retardant applications	FTIR, Raman, XRD, SEM	Bioactivity assays for calcium phosphate deposition	[85]
Polyethyleneimine-modified silk fibroin	Cationization, enhanced DNA packaging, higher transfection efficiency	Gene delivery systems for cancer therapy	FTIR, Gel Electrophoresis, Cytotoxicity Assays	Gene transfection efficiency tests in A549 cells	[86]
Silk fibroin-graft hydrophilic/zwitterionic polymers	Improved hydrophilicity, reduced protein and cell attachment, tunable beta-sheet content	Drug delivery implants, anti-biofouling surfaces, tissue engineering scaffolds	ATR-FTIR, AFM, Contact Angle Measurements, Degradation Studies	Bovine serum albumin (BSA) adhesion studies, human mesenchymal stem cell (hMSC) attachment assays	[87]
SilkMA + pMHMGC	Enhanced mechanical strength, elasticity	Cartilage tissue engineering	Compression testing, FTIR, SEM	Cartilage-like matrix production in vitro	[88]

Considering intriguing properties and potential applications of fibroin in the biomedical area, Xing et al. [80] explored the development of a polymer hybrid material by modifying the surface of SF using atom ATRP. It involved grafting dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) onto the fibroin surface, followed by polymerization, to generate a material with antibacterial properties. The process began with the preparation of a macroinitiator by functionalizing the amino and hydroxyl groups on silk fibroin using 2-bromoisobutryl bromide (BriB-Br). The resulting SF-Br macroinitiator served as a foundation for ATRP, which polymerized DMAEMA in the presence of copper bromide (CuBr) and a ligand, N'',N''-pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA), in dichlorobenzene. It led to a smooth, uniform polymer layer on the fibroin surface without any unwanted homopolymers. Following polymerization, the tertiary amine groups (in DMAEMA) were reacted with methyl bromide, introducing quaternary ammonium functionalities that enabled the material with potential antibacterial properties. Characterization using techniques including Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray energy dispersive spectroscopy (EDS) was utilized to confirm successful grafting of DMAEMA and the presence of bromine on the fibroin surface. Scanning electron microscopy (SEM) revealed a smooth polymer coating, while gel permeation chromatography (GPC) demonstrated low polydispersity and controlled molecular weights of the grafted polymers. The authors evaluated the antibacterial properties of silk fibroin grafted with quaternary ammonium groups onto the hybrid's surface. These groups are known for their antibacterial activity due to their ability to disrupt microbial membranes. Although this study does not provide specific experimental details about the antibacterial assays, it highlights that the quaternized surface was designed to exhibit antibacterial potential. Typically, such evaluations would involve testing against common bacterial strains, such as *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli*, using assays like zone of inhibition, colony counting, or measuring bacterial growth in contact with the material. The quaternization process ensures a high concentration of quaternary ammonium groups, which likely contributes to the enhanced antibacterial performance of the silk fibroin material. Further evaluations of these systems, including specifics about the bacterial strains, incubation conditions, and quantitative or qualitative assessment methods used to measure antibacterial efficacy, are needed.

In 2019, Radu et al. [81] developed a hybrid system with silk fibroin grafted with poly(N-isopropylacrylamide) (SF-g-PNIPAM), synthesized through radical polymerization initiated by cerium ammonium nitrate (CAN). By grafting PNIPAM, a thermosensitive polymer, onto silk fibroin, the material gained responsiveness while maintaining biocompatibility and mechanical

properties inherent to fibroin. This hybrid material demonstrated significant potential for advanced biomedical applications, particularly in drug delivery and responsive biomaterials. Grafting was achieved by initiating radical polymerization at the tyrosine residues of silk fibroin, facilitated by the cerium-based redox system. The resulting SF-g-PNIPAM was characterized to confirm successful grafting and to understand its structural and functional changes. FTIR and Raman spectroscopies confirmed the introduction of PNIPAM onto the fibroin backbone, while XPS analysis verified chemical modifications. Thermal analysis showed increased thermal stability, and CD and XRD analyses revealed structural rearrangements, with a decrease in β -sheet content and alterations in crystallinity. SEM imaging highlighted changes in surface morphology, indicating successful integration of PNIPAM. The most notable applications of this hybrid material were demonstrated through its potential in smart drug delivery systems. The thermosensitive nature of PNIPAM enabled controlled release of hydrophilic drugs, such as 5-fluorouracil (5-FU), through controlled responses to temperature changes. Drug release assays showed that the SF-g-PNIPAM hybrid could achieve sustained and targeted delivery, optimizing therapeutic efficacy. Additionally, the hybrid material's biocompatibility and structural integrity make it suitable for use in hydrogels, which are scaffolds for tissue engineering and wound healing systems. The combination of mechanical stability and temperature responsiveness creates an ideal platform for applications requiring precision and adaptability, such as regenerative medicine and responsive therapeutic systems. Overall, the results emphasized the hybrid material's ability to enhance biomedical applications by combining the intrinsic properties of silk fibroin with the tunable functionalities of PNIPAM.

In 2022, Flores-Vela et al. [82] reported the development of fibroin-g-polyaniline (Fib-g-PAni) copolymers synthesized through a one-pot method combining Fischer esterification and oxidative polymerization. The hybrid material, synthesized by grafting polyaniline chains onto silk fibroin, was designed to combine the biocompatibility and biodegradability of fibroin with the electroactive properties of polyaniline. The synthesis involved two key steps. As shown in Figure 4, initially, 3-aminobenzoic acid was esterified with fibroin to produce Fib-NH₂, which served as a substrate for further functionalization. Subsequently, polyaniline chains were grafted onto the Fib-NH₂ via oxidative polymerization. This process allowed for the production of Fib-g-PAni copolymers with varying mass ratios of fibroin to polyaniline, enabling control over material properties. The characterization of the hybrid material was carried out using a combination of ¹H-NMR and FTIR spectroscopies, confirming successful grafting of polyaniline onto fibroin. Thermal stability was evaluated through thermogravimetric analysis, and

morphological changes were studied using scanning electron microscopy. The results revealed significant structural transformations, with the copolymers exhibiting particulate and globular morphologies. The hybrid materials demonstrated electroactivity, with cyclic voltammetry tests confirming the presence of oxidation and reduction peaks typical of polyaniline. Cytotoxicity assays of the Fib-g-PAni copolymers using NIH/3T3 fibroblast cells showed that the copolymers exhibited low toxicity at certain concentrations, making them suitable for use in biocompatible platforms (Figure 5). The electroactive properties of the materials suggest their potential in developing electrochemical sensors that can interface with living tissues. Additionally, the combination of fibroin's biocompatibility with polyaniline's conductivity positions these materials as promising candidates for applications in tissue engineering and bioelectronics.

Kuang et al. [83] developed a silk fibroin-polyvinyl pyrrolidone (PVP-SF) interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel designed to enhance the mechanical and optical properties of silk fibroin. The polymerization process relied on an enzymatic free-radical polymerization mechanism. In this process, *n*-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) served as the monomer, and horseradish peroxidase (HRP) acted as the enzymatic catalyst. Hydrogen peroxide (H_2O_2) was used as the oxidizing agent to initiate polymerization. The resulting IPN hydrogels exhibited significantly improved properties compared to pure silk fibroin hydrogels. These showed superior light transmittance, achieving up to 97% transparency, and enhanced mechanical strength, with the ability to withstand up to 70% strain without rupture and resilience rates of up to 95%. These features make the IPN hydrogels highly suitable for advanced biomedical applications. The study emphasized potential applications of these IPN hydrogels in areas such as contact lenses and artificial vitreous materials, where high transparency, biocompatibility, and mechanical strength are critical.

Psoriasis is a cutaneous inflammation process that is characterized by abnormal epidermal tissue proliferation. Mao and collaborators [89] designed a nanoparticle system with improved skin-permeating properties aiming to deliver curcumin to the deeper skin's layers [89]. Seeking to improve the retention time of curcumin nanoparticles in the skin, the authors prepared a hydrogel-based matrix based on silk fibroin. The *in vivo* evaluation of the system was conducted in an imiquimod-induced psoriatic mouse model. The IMQ (imiquimod) cream was applied to the mice's skin for 8 days consecutively. The drug clobetasol was used as a positive treatment control. The preclinical results are shown in Figure 6, and the data revealed that the proposed system could significantly reduce psoriatic phenotypes (erythema, scaling, and thickening) compared to control groups, showing relevant anti-psoriatic activity. The authors attributed the

results to the capacity of the system to reach deeper skin layers and curcumin being retained in the CUR-NPs-SF hydrogel for a longer period.

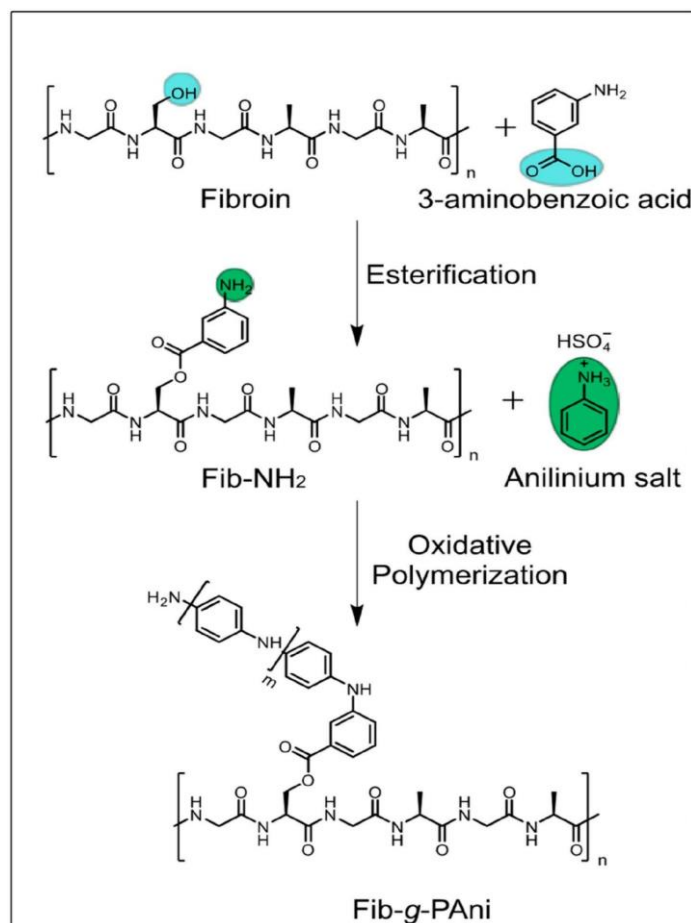


Figure 4. Scheme for the synthesis of fibroin-polyaniline (PAni) hybrid. Reproduced and adapted with permission from [82].

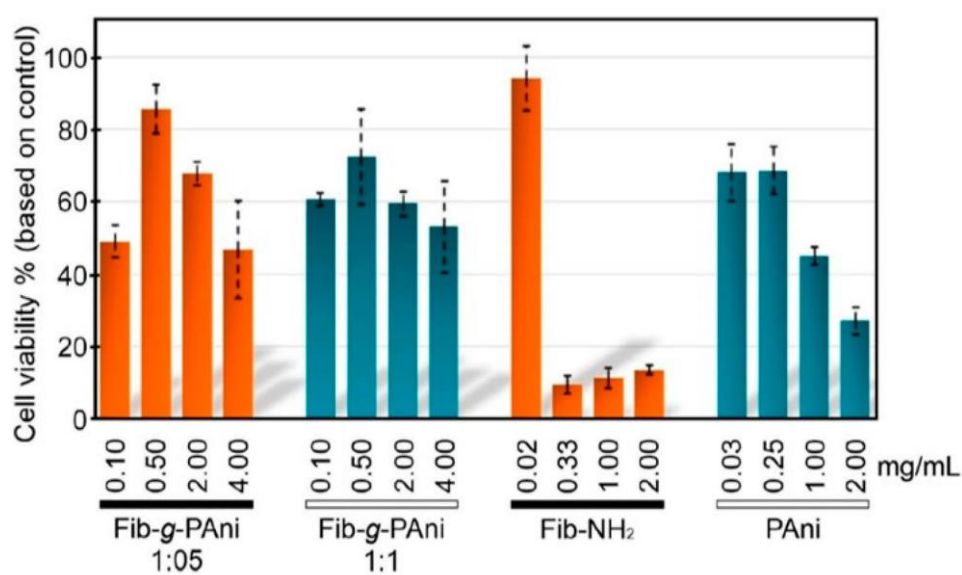


Figure 5. Cell viability (%) of NIH/3T3 fibroblast cells after exposure to various concentrations of Fib-g-PAni (1:05 and 1:1 mass ratios), Fib-NH₂, and polyaniline (PAni). The results demonstrate dose-dependent cytotoxicity, with Fib-g-PAni showing higher cell viability compared to pure PAni at similar concentrations, indicating improved biocompatibility due to the incorporation of fibroin. Reproduced and adapted with permission from [82].

In another study, Xing et al. [84] investigated grafting 2-diethylaminoethyl methacrylate (DEAEMA) onto silk fibroin, with optimization of parameters such as monomer concentration, reaction time, temperature, and catalyst ratios for maximum efficacy in generating fibroin-hybrid materials. This study highlighted DEAEMAs unique properties and focused on achieving not only antibacterial properties but also greater control over mechanical and chemical modifications. The hybrid material showed high grafting efficiency and robust washing resistance, with a focus on broader applications in textile engineering, material science, and potential biomaterial innovations.

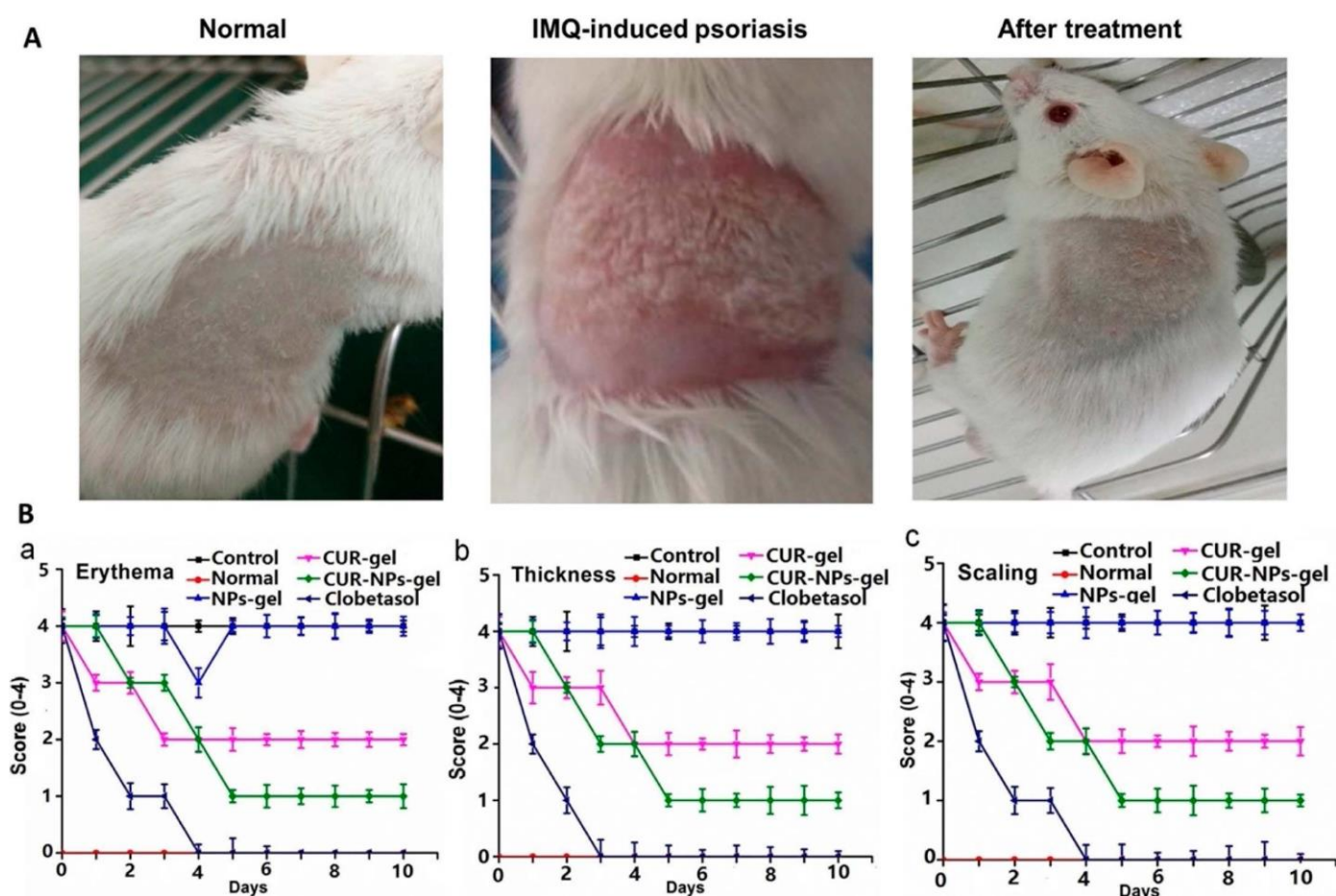


Figure 6. Preclinical evaluation of different therapeutic systems applied to control three main phenotypic psoriatic activities (erythema, thickness, and scaling) in an imiquimod-induced psoriatic mouse model. Different treatment and control groups were constituted as follows: Group 1

(Normal untreated mice); Group 2 (IMQ-induced psoriatic mice); Group 3 (Blank NPs-gel treatment); Group 4 (CUR-gel treatment); Group 5 (CUR-NPs-gel treatment); Group 6 (Clobetasol treatment as the positive control group). **(A)** Representative images of skin conditions: Normal skin, IMQ-induced psoriatic skin, and skin after treatment with various formulations. **(B)** PASI scoring of psoriatic skin over 10 days of treatment: **(a)** Erythema scores comparing control, normal, CUR-gel, CUR-NPs-gel, and clobetasol treatments; **(b)** Thickness scores for the same treatment groups; **(c)** Scaling scores across treatment groups. Data are expressed as Mean \pm SD (n = 12) Reproduced with permission [89].

Di Foggia et al. [85] proposed the functionalization of protein fibers, including silk fibroin (from *bombyx mori* and *Antheraea pernyi*) and wool keratin, by grafting phosphorylated methacrylate monomers (phosmers). These modifications were designed to enhance bioactivity and enable biomedical applications such as bone tissue engineering. Silk fibroin was grafted with two commercial phosphorylated methacrylate monomers, phosmer CL and phosmer M. The reaction was conducted at 80°C in an acidic environment using ammonium persulfate as an initiator. The degree of grafting was adjusted by varying the monomer concentration and reaction time, resulting in fabrics with different weight gains. Figure 7 summarizes the synthetic route used by the authors for the fibroin hybrid. It illustrates the process used to functionalize protein fibers, such as silk fibroin or keratin, with phosphorylated methacrylate monomers (phosmers). Initially **(A)**, phosmer M reacted with the tyrosine residues of the protein, where the hydroxyl group served as the reactive site. In the grafting step **(B)**, covalent bonds formed between phosmer M and the protein backbone, anchoring the monomers. Polymerization **(C)** was then initiated, with methacrylate groups reacting to form brush-like polymer chains extending from the protein surface. The final hybrid material **(D)** consisted of a protein backbone functionalized with phosphate-rich polymer chains, providing bioactive properties. The grafted fibers were characterized using Raman and infrared spectroscopies, which identified the phosphorylation of tyrosine and serine residues and confirmed the successful incorporation of phosphate groups into the fibers. The structural integrity of the proteins was largely maintained, with only minor changes observed in their secondary structures. β -sheet regions dominated after grafting, while amorphous regions showed some reactivity. The applications of these grafted fibers were demonstrated for the development of bioactive materials for bone regeneration. When immersed in simulated body fluid (SBF), the modified material demonstrated nucleation of carbonated calcium phosphate phases, indicating strong bioactivity. The phosphate groups, and to some extent sulfate/sulfonate groups, acted as nucleation sites for apatite formation, which is critical for bone tissue engineering. The

grafted wool samples exhibited additional contributions from sulfur-containing groups, further enhancing their potential for mineralization. This work highlighted the potential of phosphorylated methacrylate-grafted protein fibers in creating bioactive materials for biomedical devices and tissue engineering applications, particularly for bone regeneration. The study suggested further research into long-term immersion effects and cellular interactions to expand the understanding of these materials' biomedical potential.

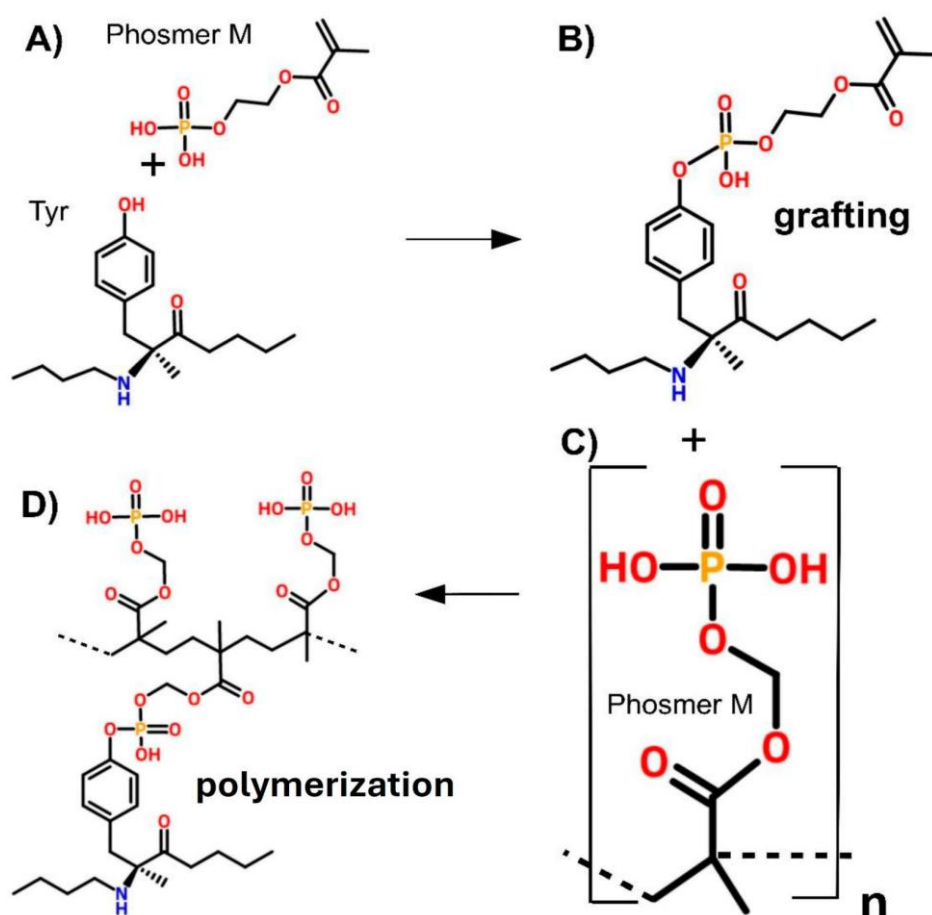


Figure 7. Scheme for the synthesis of the hybrid system. (A) Phosmer M reacts with silk fibroin, with tyrosine serving as the preferential reaction site; (B) grafting of a Phosmer M molecule onto the tyrosine side chain of silk fibroin; (C) and (D) subsequent polymerization. Reproduced and adapted with permission from supplementary material in [85].

Niu et al. [86] grafted a low molecular weight polyethyleneimine (LMW-PEI) onto the side chains in SF. The focus of this work was the preparation of structurally modified and cationized silk fibroin (CSF), capable of packaging plasmid DNA (pDNA) for applications in gene therapy. The polymerization does not occur on the surface of the protein but in the structure through the linked entities and reactive groups present in the protein through the grafting-to approach. PEI

was linked to BSF, resulting in hybrid CSF-PEI, which was loaded with pDNA for the transfection of human lung adenocarcinoma cells (A549 model) and human embryonic lung fibroblast cells (WI-38 model) in order to modulate the gene expression on target cells. The complex CSF/pDNA was able to significantly inhibit A549 cell proliferation; however, the hybrid system displayed little effectiveness and cytotoxicity against WI-38 cells, demonstrating that the hybrid system has potential for gene therapy applications against lung cancer.

Recently in 2024, Viola et al. [88] studied hybrid materials based on silk fibroin hydro- gels reinforced with melt electro-written fibers of a methacrylated polymer (pMHMGCL). The hybrid system was synthesized by covalently bonding methacrylated silk fibroin (silkMA) to the fibers via photopolymerization. The hybrid material exhibited enhanced mechanical properties, including a threefold increase in compression resistance and a 40–55% increase in tensile strength compared to systems without covalent interactions. Articular cartilage progenitor cells embedded in the silkMA hydrogels produced a cartilage- like matrix after 28 days of in vitro culture, demonstrating the material's applicability in cartilage tissue engineering. This approach highlighted the capability of hybrid silk fibroin systems to fulfill the mechanical and biological requirements of tissue engineering applications, particularly for load-bearing tissues like cartilage.

The exploration of hybrid silk fibroin-polymer systems has demonstrated the remarkable potential of combining natural proteins with synthetic polymers to create materials with tailored properties and broadened applications. Through chemical modifications, such as grafting with hydrophilic, zwitterionic, phosphorylated, or electroactive polymers, fibroin's intrinsic biocompatibility and biodegradability can be complemented by functionalities such as mechanical strength, thermal stability, conductivity, and environmental responsiveness. The synthesis strategies, ranging from ATRP to oxidative polymerization, have shown that precise control over polymer grafting is key to tailoring the hybrid materials for specific needs. Characterization techniques like FTIR, NMR, thermal analysis, and microscopy have confirmed the successful incorporation of polymers while maintaining fibroin's structural integrity. These modifications address fibroin's natural limitations, such as enzymatic degradation and low stability, by introducing properties like improved bioactivity, resistance to biofouling, and tunable mechanical and surface characteristics. Applications of these hybrid systems span various biomedical fields, including drug delivery, tissue engineering, wound healing, and bioelectronics. The ability to design fibroin hybrids with controlled drug release profiles, enhanced cell interactions, and even electroactive capabilities underscores their versatility. For instance, fibroin-grafted polyaniline systems show promise in developing

electrochemical sensors and conductive scaffolds, while phosphorylated fibroin systems offer solutions for bone tissue engineering by promoting mineralization.

These studies clearly demonstrate that fibroin-based hybrid systems exemplify the synergy between natural and synthetic materials while serving as a versatile platform for tackling complex biomedical challenges. The ability to fine-tune their properties through controlled synthesis highlights their potential as next-generation biomaterials, capable of bridging the gap between structural functionality and biological compatibility. This field continues to pave the way for innovative solutions in healthcare and material science. Gene therapy is based on the use of exogenous nucleic acids (genes, genetic segments, RNA, DNA, and others) with the ability to modify patients' genes and treat or extinguish diseases [90,91]. This therapy can act through different mechanisms, for example, replacement of the disease-causing gene by a healthy copy, inactivation of the disease-causing gene, or even by introducing a new or modified gene to help in the treatment of a disease [90]. Due to its great versatility and application potential, this therapy has received much attention in recent decades for the treatment of diseases caused by genetic abnormalities [92].

Despite the great potential of gene therapy, “naked” therapeutic nucleic acids do not present efficient internalization in target sites, since they are susceptible to nuclease attack, uptake by phagocytes, renal clearance, and stimulation of the immune response, factors that make clinical applications of these molecules unfeasible [93]. To achieve the expected action and overcome such limitations, it is essential to use efficient carrier systems (vectors), which can be viral or non-viral [91]. Taking advantage of the properties and nature of viruses, viral vectors were the first ones to be proposed for gene therapy. However, these systems raise concerns mainly related to immune response [5]. Alternatively, several studies have been carried out to develop nanostructured systems capable of achieving better immunological and toxicological responses and, therefore, safer [94–96]. Silk protein has gained great prominence due to its biocompatibility, DNase resistance, and especially high transfection efficiency [96]. These properties associated with the use of modern synthetic strategies have enabled the development of smart fibroin-based nanostructured systems. These new systems can be designed to have well-defined sizes, high stability, and efficiency in targeting, which makes them very promising for application as non-viral vectors [5,97,98]. SF methacrylates (SilMA) have attracted the attention of many researchers in tissue engineering and, especially for wound healing, proliferation and cell growth stimulation. Gong and collaborators [99], in 2019, studied the encapsulation of octreotide acetate in fibroin microspheres, a peptide that has been used for the treatment of gastrointestinal tumors and acromegaly. The main motivation of this work was due to incomplete

release and acylation reactions of the encapsulated octreotide in available pharmaceutical formulations based on PLGA microspheres (i.e., Sandostatin®) [99]. Furthermore, acidic degradation product-induced inflammation has resulted in major challenges hampering widespread clinical applications of this delivery system.

The authors developed a new method to fabricate microspheres using fibroin and polyethylene glycol (high molecular weight PEG) through an assisted emulsification method. They studied the *in vivo* pharmacokinetics behavior of the system, which was intramuscularly injected in healthy mice. The results revealed a sustained release profile for 102 days. The authors observed an important increase in plasma concentration of octreotide, which was attributed to slow degradation of the fibroin microspheres matrix, promoting a linear sustained release profile (Figure 8).

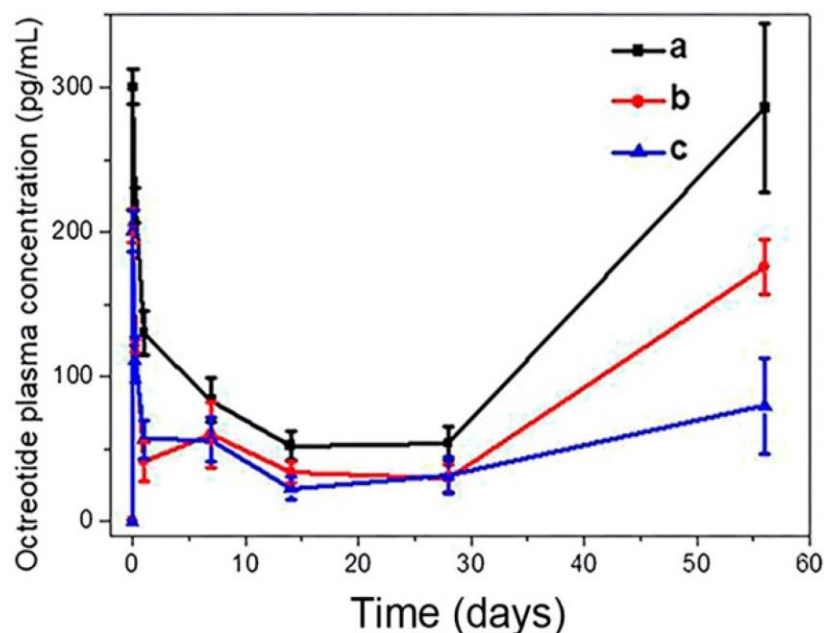


Figure 8. Octreotide concentration profile in rat plasma after intramuscular injection. (a) elevated dose group (8 mg/kg), (b) reduced dose group (2 mg/kg), (c) blank octreotide group at reduced dose. Reproduced with permission [99].

4. INORGANIC-FIBROIN HYBRID SYSTEMS

The development of fibroin-polymer hybrid systems has demonstrated promising advances for their applications in the biomedical field. In a similar vein, other hybrid systems based on fibroin have been explored, which include the integration of inorganic components,

such as silica and hydroxyapatite [22–24,100]. In the biomedical field, systems based on silica and fibroin offer a unique combination of thermal stability and mechanical strength of silica with the biological properties of fibroin, resulting in novel materials [16,24,101]. These systems could be utilized in tissue engineering, where silica contributes to structure and rigidity, while fibroin promotes cell adhesion and growth, and for controlled drug release, where the hybrid matrix can control release kinetics and increase therapeutic efficacy [16,100–103].

Silk-based scaffolds, in the last decade, have been the target of many studies, in particular, related to bone tissue regeneration, since mesoporous bioactive glass (MBG)-silk scaffolds have shown in vitro bioactivity and in vivo osteogenic properties. Such characteristics can be related to a favorable environment for cell attachment, proliferation, and differentiation, making the silk-silica hybrid system a potential substitute for treating local osteoporotic defects [104–106]. Table 3 provides an overview of hybrid inorganic systems, highlighting their properties, applications in biomedical engineering, characterization techniques, and biomedical assays.

Table 3. Summary of silk fibroin-inorganic hybrid systems, elaboration of the enhanced properties, potential biomedical applications, employed assays, and physicochemical characterization methods.

Hybrid System	Properties	Potential Applications	Characterization Methods	Biomedical Assays/ Next Steps	Reference
SF/HA	Enhanced mechanical and osteogenic properties	Bone regeneration, tissue scaffolds	SEM, FTIR, Mechanical Testing	Osteoblast adhesion, proliferation	[22]
SF/SiO ₂ Aerogel	High porosity, hierarchical structure	Bone tissue engineering	XRD, BET, Mechanical Testing	Osteoconduction assays, in vivo implant tests	[24]
SF/Silica Hybrid	Enhanced bioactivity, porosity	Drug delivery, bone tissue engineering	Sol-gel characterization	Cytotoxicity Pre-osteoblast proliferation and viability	[101]
THA/SF/BG Hydrogel	Strength, elasticity, wound healing	Wound healing	Rheology, Cell Migration Assays	In vivo wound closure analysis	[107]
NG/SF/HA Scaffold	Porosity control, angiogenic properties, biocompatibility, mechanical strength,	Bone defect repair	SEM, FTIR, ALP Assay, ARS	Angiogenesis, osteogenic differentiation	[108]
SF/hydroxyapatite composite	hydrophilicity, cytotoxicity-free (with HA), genotoxicity-free	Bone regeneration, wound healing	SEM, EDS, FTIR, mechanical testing, contact angle measurement	Cytotoxicity (XTT assay), genotoxicity, mutagenicity (micronucleus test)	[109]

Saleem et al. [22] investigated SF membranes combined with hydroxyapatite (HA) to evaluate their physicochemical properties and biomedical applications, specifically in bone regeneration and wound healing. Characterization revealed that HA crystals were uniformly deposited on the SF membrane, with SEM and EDS confirming the presence of calcium phosphate structures. FTIR analysis indicated the disappearance of fibroin-specific bands, likely masked by HA coating.

Mechanical tests showed reduced strength and energy expenditure for SF-HA membranes compared to SF while maintaining sufficient elasticity, especially in wet conditions, ideal for in vivo use. Biocompatibility assays demonstrated that SF-HA membranes exhibited no cytotoxic, genotoxic, or mutagenic effects, unlike unmodified SF membranes, which showed toxicity and compromised cell viability. The hybrid system supported cell adhesion and proliferation, essential for biomedical applications. The inclusion of HA enhanced osteoconductivity, making these membranes suitable for bone regeneration and tissue engineering. Overall, the findings highlighted SF-HA composites as promising materials for clinical use in wound healing and bone repair applications.

Maleki et al. [24] developed a silica-silk fibroin hybrid bioaerogel using sol-gel and freeze-casting, resulting in a porous, honeycomb-structured scaffold with excellent mechanical properties. The synthesis involved a one-pot aqueous sol-gel reaction using tetraethyl orthosilicate and silk fibroin, followed by unidirectional freeze-casting and supercritical drying. The material supported osteoblast attachment and promoted bone regeneration in vitro and in vivo, demonstrating its potential for bone tissue engineering. The hybrid scaffold was non-toxic and biocompatible, making it a promising candidate for clinical applications in bone repair.

In 2018, Pereira et al. [101] developed a hybrid system constituted of silk fibroin and silica aiming to enhance the mechanical properties and host viable MC3T3 pre-osteoblast cells. The authors obtained ordered mesoporous bioglasses (MBGs) fibroin/silica hybrid implants through sol-gel reactions, and the implant resulted in a hybrid system with superior characteristics. Although MBGs display high surface area and pore volume, the material exhibited high in vivo degradation rates and significant surface instability, compromising the mechanical stability and the cytocompatibility of the material. The presence of fibroin in the hybrid conferred a relevant improvement over these drawbacks, allowing the design of materials with tunable morphology and mesoporosity [101].

More recently, Yu and collaborators [107] prepared a hybrid system combining thiolated hyaluronic acid (THA), SF, and bioactive glass (BG) nanoparticles. The resulting material displayed enhanced properties related to strength, stability, elasticity, and other functionalities compared to the single-network-based THA gel only [107]. In terms of wound healing evaluation, the authors used Balb/c mice in the experiments that had a circular, full-thickness wound area fully covered with different preparations based on the prepared hybrid system: (i) THA/SF-b; (ii) BG/THA/SF-2; or (iii) BG/THA/SF-3, which were prepared with different amounts of THA, silk fibroin, and bioglass nanoparticles. A control group of mice had wounds

left uncovered without any gels. The control group and assay groups were photographed on days 0, 7, and 14, and the results are shown in Figure 9. The data indicated that THA/SF-b, BG/THA/SF-2, and BG/THA/SF-3 gels had a significant impact on wound healing, as evidenced by the notable decrease in remaining wound areas over time. For example, on day 7, the remaining wound areas in the BG/THA/SF-2 and BG/THA/SF-3 groups were considerably smaller compared to the control or THA/SF-b groups. This suggests a rapid response of BG/THA/SF-2 and BG/THA/SF-3 gels in promoting wound healing. After 14 days of treatment, the wounds treated with the BG/THA/SF-2 or BG/THA/SF-3 gels were almost completely healed, while the wounds in the other two groups were still present.

Quantitative analysis of the remaining wound areas demonstrated significant differences between the groups on days 7 and 14, with emphasis on the BG/THA/SF-3 group, which presented a significantly smaller remaining wound area compared to the BG/THA/SF-2. This indicates that the BG/THA/SF-3 gel may have even greater potential in promoting wound healing than BG/THA/SF-2. These results suggest that BG/THA/SF gels have the ability to significantly accelerate wound closure, making them promising material for clinical applications in the area of wound healing.

Zhao et al. [108] synthesized a novel hybrid scaffold composed of silk fibroin, hydroxyapatite, and naringin (NG) using a salt-leaching process. The hybrid scaffold exhibited favorable biodegradability, porosity, and mechanical properties, making it ideal for bone tissue engineering applications. The incorporation of naringin enhanced osteogenesis and angiogenesis, as demonstrated by in vitro assays with human umbilical cord mesenchymal stem cells and in vivo studies in rabbit femur defect models. This scaffold provided superior bone regeneration and vascularization compared to controls, showing promise as a clinical solution for bone defect repair.

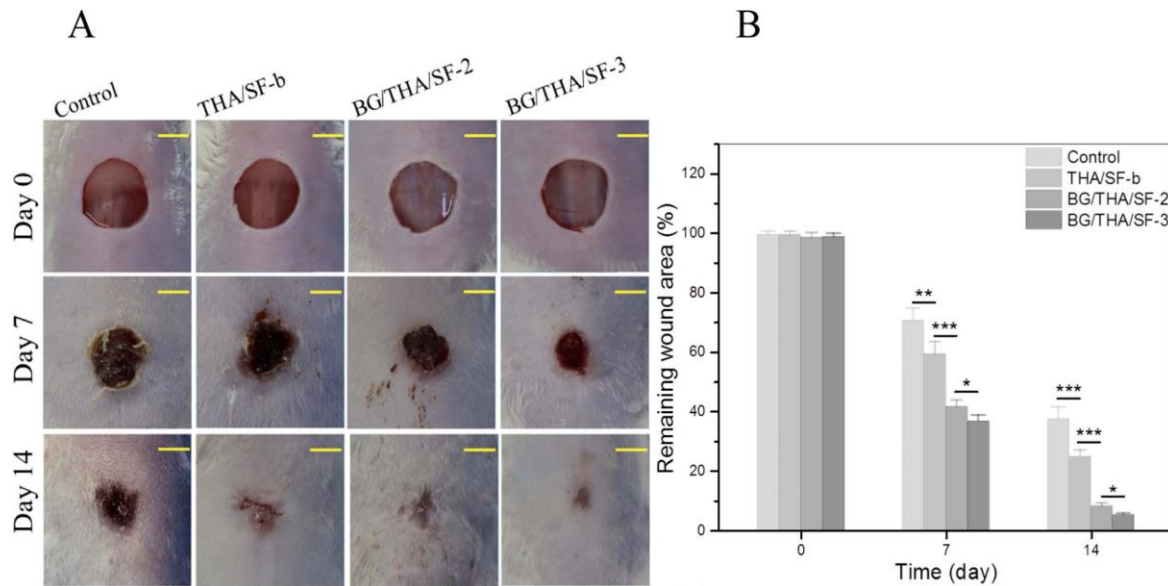


Figure 9. Assessment of wound healing: (A) Illustrative images of the wound area versus various gel groups and (B) calculated remaining wound area for different groups on days 0, 7, and 14, respectively ($n = 4$) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Reproduced with permission [107].

Coelho et al. [109] prepared silk fibroin membranes functionalized with hydroxyapatite (HA) to enhance their suitability in bone tissue engineering and wound healing. The biomedical potential of these membranes was thoroughly evaluated through in vitro assays using CHO-K1 cells. The SF-HA membranes demonstrated excellent biocompatibility, showing no cytotoxicity, genotoxicity, or mutagenicity, which were limitations observed in unmodified SF membranes. The hybrid membranes supported cell adhesion, proliferation, and viability, crucial factors for effective tissue regeneration. These results underscore their capability to serve as scaffolds that facilitate cell colonization and promote tissue repair. In addition to their in vitro performance, the SF-HA membranes exhibited significant potential for in vivo applications, particularly in bone regeneration. The osteoconductive nature of HA enabled the hybrid material to guide bone growth and mineral deposition, essential for healing critical bone defects. The improved mechanical and biological properties of the SF-HA membranes make them a promising solution for clinical applications in bone defect repair, wound healing, and broader regenerative medicine strategies.

The development of hybrid inorganic-fibroin systems has revealed significant potential in biomedical applications, particularly in bone regeneration, wound healing, and tissue engineering. The integration of inorganic components such as silica and hydroxyapatite (HA) into silk fibroin matrices has demonstrated the ability to combine the mechanical strength and thermal stability of these materials with the biocompatibility and cell adhesion properties of fibroin. These hybrid

systems provide a multifaceted approach in overcoming challenges for creating functional and biologically active scaffolds. Overall, inorganic- fibroin hybrid systems represent a versatile and promising class of materials, bridging the gap between mechanical functionality and biological activity. Their tunable properties and demonstrated efficacy across various biomedical assays highlight their potential for advancing clinical applications in tissue repair and regenerative medicine. Continued exploration of these systems may lead to novel solutions for unmet medical needs, driving innovation in biomaterials science.

5. CONCLUSIONS AND FUTURE OUTLOOK

There has been a recent surge in interest and research surrounding fibroin-based hybrid materials, especially for biomedical applications. This emerging and promising area of study presents vast opportunities for further investigation and development. This review offers an overview of the current state of the art, in which we have compiled and analyzed some of the most relevant advances in the field. It offers valuable insights into the potential and challenges of fibroin hybrids, establishing a solid foundation for future research in this rapidly evolving field. As discussed above, fibroin offers important properties, including biocompatibility and a low immunogenicity profile, making it a most promising material for biomedical applications. The presence of reactive groups on the fibroin's protein structure has offered the possibility of chemical modification that can help further advance its scope. Such modifications can also help facilitate the fabrication of hybrid materials with additional virtues such as responsivity to external or endogenous stimuli. The fabrication of such smart hybrids could lead to systems that would respond to stimuli activated through a change in the chemical or physical environment, temperature, enzymatic action, pH, applied magnetic field, or ultrasounds. The development of such materials will help enhance the intrinsic properties of the hybrids that can amplify their biomedical applications.

The development of fibroin-polymer hybrid systems has demonstrated the significance of such systems. However, to fully exploit their potential, it is necessary to develop an understanding of the structure-property relationships. Additionally, we need to elaborate on i) the production cost of polymer-hybrid systems, which presents a significant barrier to advancing to clinical trials, and ii) predicting and examining biological interactions with cells during the early design stage, which remains a major challenge. It is essential that the scientific community address significant issues in designing tailored hybrid systems, which include selection of chemical functionalities for bioconjugation, development of effective conjugation schemes, and optimization of polymer compositions and architectures. An evaluation of the desired

physicochemical properties in the resulting systems is also a critical and complex task. There has been good progress in the synthesis of hybrid systems and an evaluation of their potential in vitro and preclinical applications. However, a detailed comparative analysis of fibroin-hybrid systems to other relevant systems, including biocompatibility and low-immunogenicity profiles, will help expand the scope of fibroin- based materials. There is a critical need to evaluate their in vivo stability, enhancing drug payload capacity, endosomal escape ability for cancer drug delivery, reduced immune response (especially those related to the non-specific antibody production), and effective stimulus responsivity using external cues (lasers, magnetic field, or heat). More data from in vitro and preclinical assays need to be acquired to elucidate and consolidate unique characteristics of fibroin-hybrid systems compared to non-hybrid systems that have been well studied.

CAPÍTULO 2 – ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FIBROÍNA A PARTIR DE CASULOS DE BICHO-DA-SEDA

1. INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta inicialmente o isolamento e a caracterização físico-química da fibroína da seda obtida a partir de extração e purificação de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), utilizando duas rotas distintas e viáveis em escala laboratorial. As amostras obtidas por extração foram posteriormente caracterizadas e comparadas com a amostra comercial, com o objetivo de avaliar sua similaridade estrutural e a possibilidade de substituição da proteína comercial por aquelas extraídas de forma simples e de baixo custo.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração e a purificação de fibroína a partir de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*);
- Caracterizar físico-quimicamente as amostras extraídas em laboratório;
- Comparar os resultados obtidos com fibroína comercial visando avaliar a viabilidade de substituição da fonte comercial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau HPLC, sem necessidade de purificação adicional. A água ultrapura (H₂O) foi obtida por meio do sistema Milli-Q (Millipore). A fibroína de seda comercial, com pureza $\geq 99\%$ (100kDa), foi adquirida da Sigma-Aldrich. Para a extração da fibroína em laboratório, foram utilizados casulos brutos de *Bombyx mori*, sem grau de pureza especificado, provenientes de produção local (etapa realizada no Brasil). Os reagentes utilizados foram fornecidos pelas empresas Sigma-Aldrich, Thermo Scientific ou Oakwood, conforme disponibilidade. Durante a etapa de diálise, foram empregadas membranas semipermeáveis com peso molecular de corte (MWCO) de 12,4 kDa, também fornecidas pela Sigma-Aldrich.

3.1.EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FIBROÍNA DA SEDA

O método inicialmente empregado para a obtenção de fibroína a partir de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), utilizando brometo de lítio (LiBr) como agente solubilizante, foi adaptado com base nas metodologias descritas por Rockwood et al. [43] Feng et al. [44] e Kundu et al. [45].

Conforme relatado por esses autores, o protocolo consiste, essencialmente, em três etapas principais: extração, solubilização e purificação.

Na etapa inicial, os casulos previamente limpos foram fragmentados e imersos em uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3 , $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), sendo posteriormente submetidos a aquecimento até o ponto de ebulição, com agitação constante, durante 30 minutos. Essa etapa é fundamental para a remoção da sericina — proteína solúvel que representa a segunda maior fração proteica do casulo após a fibroína — promovendo sua separação da matriz fibrosa.

Após o tratamento alcalino, a massa insolúvel de fibroína foi coletada, seca à temperatura ambiente durante a noite e, em seguida, lavada com uma solução de Na_2CO_3 a 0,5% (m/v), com o intuito de remover resíduos remanescentes. Para a solubilização, a fibroína seca foi incubada em solução de brometo de lítio (LiBr , $9,3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a 85°C por 20 minutos, resultando em uma solução de coloração âmbar, indicativa da completa solubilização das fibras proteicas.

A solução obtida foi então submetida a diálise por 48 horas em água ultrapura, utilizando membrana semipermeável com peso molecular de corte (MWCO) de 12,4 kDa, visando à remoção de sais e impurezas de baixo peso molecular. O produto resultante é uma solução aquosa de fibroína, com baixa viscosidade e aparência translúcida.

Como etapa final de purificação, a solução foi centrifugada por 1 hora, permitindo a remoção de resíduos sólidos ainda presentes. O sobrenadante contendo a fibroína purificada foi então armazenado sob refrigeração (4°C) ou liofilizado, conforme a necessidade experimental. O processo completo de extração e purificação da fibroína está ilustrado esquematicamente na Figura 1

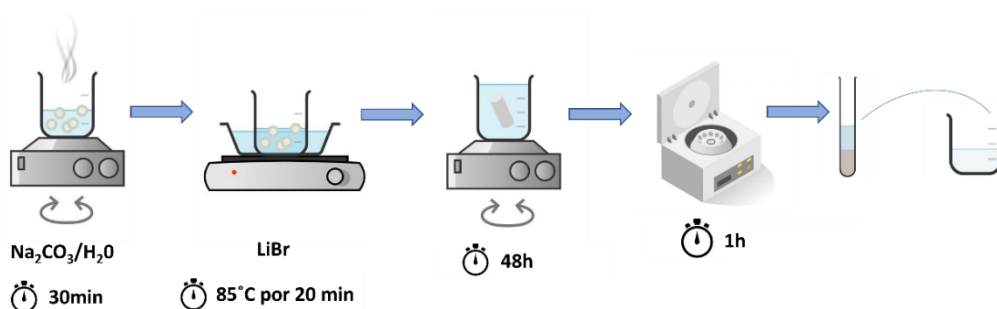


Figura 1 Etapas de extração da fibroína a partir de casulos de bicho-da-seda. Inicialmente, os casulos são fervidos em solução aquosa de Na_2CO_3 para remoção da sericina. Em seguida, a fibroína é solubilizada em solução de LiBr sendo posteriormente submetida à diálise por 48 h para remoção de sais bem como centrifugação para remoção de impurezas[46].

O segundo método de extração da fibroína a partir dos casulos do bicho-da-seda seguiu as mesmas etapas gerais descritas anteriormente por Rockwood et al.[43]. Com exceção da etapa de solubilização. A principal diferença deste protocolo está na utilização de uma solução mista de solventes contendo MgCl_2 /etanol/água, na proporção molar de 0,8:2:8, em substituição à solução de brometo de lítio (LiBr) tradicionalmente empregada. Essa metodologia alternativa foi baseada no procedimento descrito por Vaithanomsat e Punyasawon [47]. Assim, foram adotadas duas rotas distintas de extração com o objetivo de avaliar qual delas apresentaria desempenho mais adequado e propriedades comparáveis às da amostra padrão de fibroína comercial.

3.2. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

As análises espectroscópicas foram realizadas utilizando o espectrômetro Alpha II da Bruker, equipado com o acessório de Refletância Total Atenuada (ATR), permitindo a análise direta das amostras sem a necessidade de preparação prévia, garantindo maior praticidade e reprodutibilidade. O sistema ATR empregou um cristal de diamante e a detecção dos sinais infravermelhos foi realizada por um detector MIR padrão de LiTaO_3 , operando à temperatura ambiente. As análises foram conduzidas no intervalo espectral de 4000 a 800 cm^{-1} , abrangendo as principais regiões de interesse. A resolução espectral foi configurada em $0,5\text{ cm}^{-1}$. Antes da análise, as amostras foram submetidas a um processo de liofilização, seguido pelo acondicionamento direto do pó no equipamento, assegurando condições homogêneas para as análises.

3.3.ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

As análises espectroscópicas na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Cary 50Bio (Agilent), equipado com lâmpada de xenônio. Os espectros foram adquiridos por meio de varredura espectral na faixa de 200 a 800 nm , utilizando cuvetas de quartzo e operando à temperatura ambiente. Todas as medidas foram realizadas em triplicata ($n = 3$) para assegurar a reprodutibilidade dos dados.

3.4.ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada utilizando o equipamento Q500 da TA Instruments, com amostras de aproximadamente 5 mg analisadas sob uma taxa de aquecimento de 20 °C/min , em uma faixa de temperatura de 30 a 700 °C , sob atmosfera controlada de nitrogênio (N_2) com fluxo de 20 mL/min . Antes da análise, as amostras foram submetidas a liofilização, seguida do

acondicionamento direto do pó em uma célula de platina (Pt.) Concomitantemente à TGA, foram obtidas as curvas de derivada da perda de massa (DTG).

3.5. ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR POR SDS-PAGE E MALDI-TOF

Com o objetivo de avaliar e comparar a massa molecular das proteínas extraídas dos casulos do *Bombyx mori* em relação à fibroína comercial, foram empregadas as técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo (MALDI-TOF).

Para a análise por SDS-PAGE, utilizou-se gel de acrilamida pré-fabricado Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad), com gradiente de concentração de 4–20%. As corridas eletroforéticas foram conduzidas sob corrente constante de 100 V e 18 mA por 1 hora. As amostras foram previamente desnaturadas em tampão de amostra contendo 2-mercaptoetanol, aquecidas a 65 °C por 3 minutos. Em seguida, foram carregados 8 µL de solução de fibroína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg·mL⁻¹, além do marcador de peso molecular padrão adquirido da Sigma-Aldrich

As amostras foram analisadas por MALDI-TOF para confirmação da massa molecular das proteínas. Como matriz, foi utilizada Super-DHB — uma mistura 9:1 de ácido 2,5-di-hidroxibenzoico (DHB) e ácido 2-hidroxi-5-metoxibenzoico — preparada em solução de 50 mg/mL em água Milli-Q e acetonitrila (1:1, v/v), contendo 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA).

3.6. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM PÓ

As análises de difração de raios X em pó (XRD) foram realizadas utilizando um difratômetro Bruker D8 Advance, equipado com uma fonte de raios X de cobre (Cu K α , λ = 1,54056 Å) e filtro de níquel. As amostras foram previamente liofilizadas, e aproximadamente 5 mg de cada amostra foram utilizadas para as análises. As medições foram conduzidas em um intervalo de ângulo de espalhamento (2 θ) de 0,5° a 40°.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DA FIBROÍNA SF-COMERCIAL

4.1.1. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A técnica de espectroscopia no infravermelho (FTIR) foi utilizada para analisar os grupos funcionais presentes na fibroína, a Tabela 1 apresenta as principais bandas de absorção da fibroína descritas na literatura, com seus respectivos números de onda característicos e atribuições estruturais [48–52]. Dentre essas bandas, destacam-se aquelas associadas aos grupos amida A, B, I, II e III,

essenciais para a análise estrutural da fibroína. As bandas de absorção na *região do infravermelho* correspondentes às amidas A e B, em 3300 cm^{-1} e 3100 cm^{-1} , respectivamente, sendo atribuídas aos estiramentos da ligação N-H [53]. Já na região entre $1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, corresponde à amida I, foi associada ao estiramento da carbonila (C=O) e da ligação N-H [53]. Destaca-se que embora a deformação angular N-H contribua para ampliar a banca observada nesta região, a principal contribuição é do estiramento da ligação C=O[48–52].

Já a região entre $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ refere-se à amida II, relacionada às vibrações dos grupos N-H e C-N, englobando estiramento e deformação dessas ligações. Destaca-se que a deformação N-H é o modo vibracional dominante, e que o estiramento da ligação C-N possui contribuição em menor escala para a banda observada[48–52,54–57].

Por fim, a região entre $1300\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ corresponde à amida III, caracterizada pelas vibrações dos grupos C-N e N-H, incluindo modos vibracionais de deformação e estiramento. Ressalta-se que banda de absorção nesta região é mais complexa devido à sobreposição com outros modos vibracionais (como C-H e C-C), o que pode contribuir para que outras interpretações mais detalhadas possam ser conduzidas. A tabela 1 sumariza as principais bandas observadas e as atribuições conduzidas [48–52,54–57].

Destaca-se que a proposta desta análise não é realizar uma investigação aprofundada sobre os aspectos estruturais da proteína, como a identificação precisa de suas conformações. Em vez disso, a utilização da técnica de espectroscopia no infravermelho (FTIR), neste contexto, tem como finalidade fornecer um conjunto de informações complementares que contribuam para enriquecer a compreensão dos resultados obtidos.

Os resultados obtidos pela análise da fibroína por FTIR estão representados no espectro da Figura 2, onde é possível identificar as principais bandas de absorção características da proteína. As bandas observadas em 3298 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 1521 cm^{-1} , 1240 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} correspondem, respectivamente, às vibrações associadas às ligações N–H (estiramento), C=O (Amida I), N–H dobramento (Amida II), C–N (Amida III) e C–O.

Tabela 1 Principais bandas, número de onda e atribuições para fibroína por FTIR [48–52,54–57].

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo	Atribuição	Modo vibracional
3300	N-H	Amida A	Estiramento
3100	N-H	Amida B	Estiramento
1699	C=O	Amida I, folha- β	Estiramento
1642	C-N	Amida I	Estiramento
1620	N-H e C=O	Amida I, folha- β	Estiramento
1547	N-H	Amida II	Estiramento
1515	N-H, C-N	Amida II, folha- β	Deformação Angular e Estiramento
1270	C-N, N-H	Amida III, α -hélice	Deformação Angular e Estiramento
1260	C-N, N-H, C=O	Amida III, folha- β	Deformação Angular e Estiramento
1237-45	N-H	Amida III, espirais aleatórias	Deformação Angular
1230	C-N, N-H	Amida III, folha- β	Estiramento e Deformação Angular
1164	C-N	Tirosina	Estiramento
1083	C-N	Alamina	Estiramento

Embora algumas bandas apresentem valores de número de onda ligeiramente diferentes dos relatados na Tabela 1, essas variações são esperadas e atribuídas a fatores como por exemplo a condições experimentais. Ainda assim, esses resultados estão em conformidade com os dados esperados e amplamente reportados na literatura para a fibroína de seda [54–57].

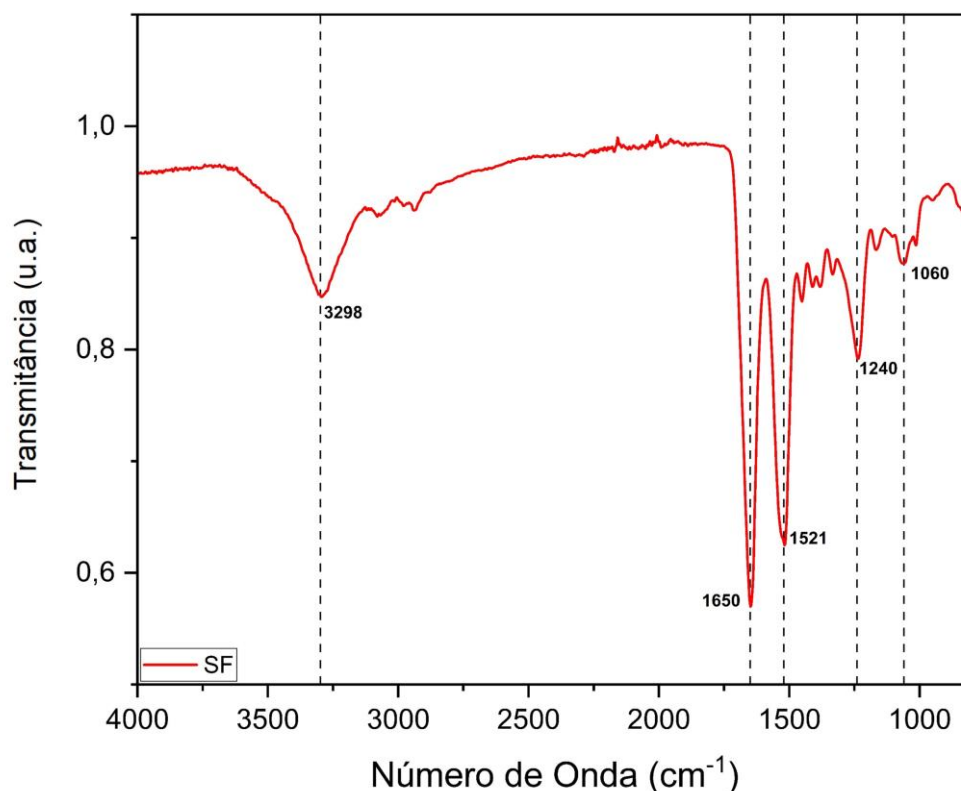


Figura 2 Espectros de FTIR nas regiões de 4000 a 800 cm^{-1} para SF (comercial).

Podemos relacionar os dados obtidos por espectroscopia no infravermelho (FTIR) às diferentes conformações estruturais da fibroína, em especial à presença de folhas β (β -sheets), que constituem a principal estrutura secundária dessa proteína. A folha β consiste em um arranjo ordenado no qual as cadeias polipeptídicas se alinham lateralmente, formando uma estrutura plana estabilizada por ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e amina ($\text{N}-\text{H}$) das cadeias adjacentes. Na fibroína do *Bombyx mori*, predomina a configuração antiparalela, que oferece maior estabilidade devido ao alinhamento mais eficiente das ligações de hidrogênio.

A formação dessa estrutura é favorecida pela composição rica em aminoácidos de cadeia lateral pequena, como glicina, alanina e serina. Essas unidades formam sequências repetitivas — por exemplo, Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser — que facilitam o empacotamento compacto das fitas polipeptídicas e promovem a organização em folhas β . Tais regiões organizadas se agrupam em domínios cristalinos, responsáveis pelas propriedades mecânicas notáveis da seda, como resistência e elasticidade. Em contraposição, regiões menos ordenadas, de natureza amorfa, conferem flexibilidade ao material.

Na análise de FTIR é possível observar uma banda em 3298 cm^{-1} , correspondente à amida A, indica o estiramento da ligação $\text{N}-\text{H}$, sugerindo a presença de interações intermoleculares estabilizadas por ligações de hidrogênio entre as cadeias peptídicas, um comportamento típico da estrutura β -pregueada [48,58]. A banda em 1650 cm^{-1} , associada à amida I, está relacionada ao estiramento da

carbonila (C=O) [48,54–58]. Já a banda em 1521 cm^{-1} , atribuído à amida II, está relacionado ao movimento combinado da ligação N-H e C-N (estiramento e flexão), confirmando a integridade da rede proteica e sua organização molecular [48,54–58]. A amida III, observada em 1240 cm^{-1} , reflete vibrações combinadas de C-N e N-H. Por fim, a banda em 1060 cm^{-1} é atribuída a vibrações de cadeias laterais da fibroína, possivelmente associadas a resíduos de tirosina e alanina, aminoácidos fundamentais na composição dessa proteína. [48,54–58]

A análise FTIR da fibroína revelou bandas de absorção características das estruturas amida, confirmando sua conformação molecular e organização estrutural. Os resultados obtidos estão em concordância com a literatura, evidenciando a preservação das ligações químicas essenciais da proteína.

4.1.2. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-VIS)

A espectroscopia UV-Vis é amplamente utilizada para a caracterização de proteínas devido à sua capacidade de detectar a presença de grupos cromóforos específicos em aminoácidos aromáticos, como fenilalanina, tirosina e triptofano. Esses resíduos absorvem luz na região entre 200 e 280 nm, uma faixa conhecida como janela de absorção de proteínas, permitindo a identificação e quantificação dessas biomoléculas [59,60]. As análises de absorção na região do UV-Vis foram realizadas com base em três amostras independentes ($n_{\text{amostral}} = 3$), cada uma analisada em triplicata ($n_{\text{analítico}} = 3$), com o objetivo de garantir a reprodutibilidade experimental e a confiabilidade dos dados. O espectro, -Figura 3, obtido para a fibroína comercial apresentou uma banda de absorvância em 276 nm, compatível com dados previamente descritos na literatura para proteínas contendo resíduos aromáticos, como triptofano e tirosina. [61].

Além disso, nenhuma outra banda significativa foi observado no espectro, sugerindo que não há a presença de contaminantes ou outras biomoléculas absorvendo na faixa analisada. A ausência de bandas adicionais indica que sua estrutura permaneceu preservada. Estudos anteriores apontam que deslocamentos ou múltiplas bandas nessa região podem indicar degradação proteica ou interações com outras moléculas [43,62], o que não foi verificado no presente estudo.

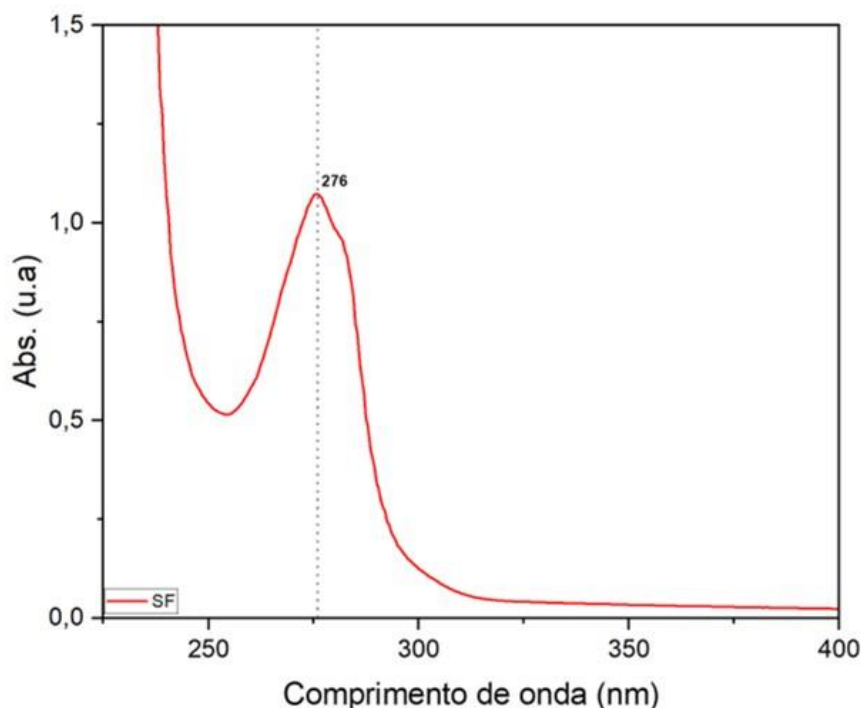


Figura 3 Espectro de absorção UV-Vis para a fibroína de seda (SF)

4.1.3. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica amplamente utilizada para avaliar a estabilidade térmica, composição e comportamento de degradação de materiais em função da temperatura. Por meio dessa técnica, é possível monitorar a perda de massa da amostra à medida que a temperatura aumenta, permitindo identificar eventos de degradação e possíveis transições térmicas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 4, evidenciando a estabilidade térmica da fibroína (SF) e suas etapas de decomposição.

A análise termogravimétrica (TGA) da fibroína comercial (Figura 4) revelou dois principais eventos de perda de massa. O primeiro ocorreu em torno de 100 °C, correspondendo a aproximadamente 4,61%, e pode ser atribuído à eliminação da água adsorvida na superfície da amostra. Essa perda inicial é comum em materiais proteicos e biopolímeros e está associada à evaporação da umidade residual e de moléculas de água fracamente ligadas à matriz proteica.

O segundo evento, mais expressivo, foi observado na faixa de 200 a 400 °C, com perda de massa de cerca de 56,94%, refletindo a degradação térmica da fibroína. Esse processo envolve a ruptura de ligações peptídicas, a decomposição de resíduos de aminoácidos e a liberação de produtos voláteis como CO₂, NH₃, H₂O e fragmentos orgânicos menores. [61].

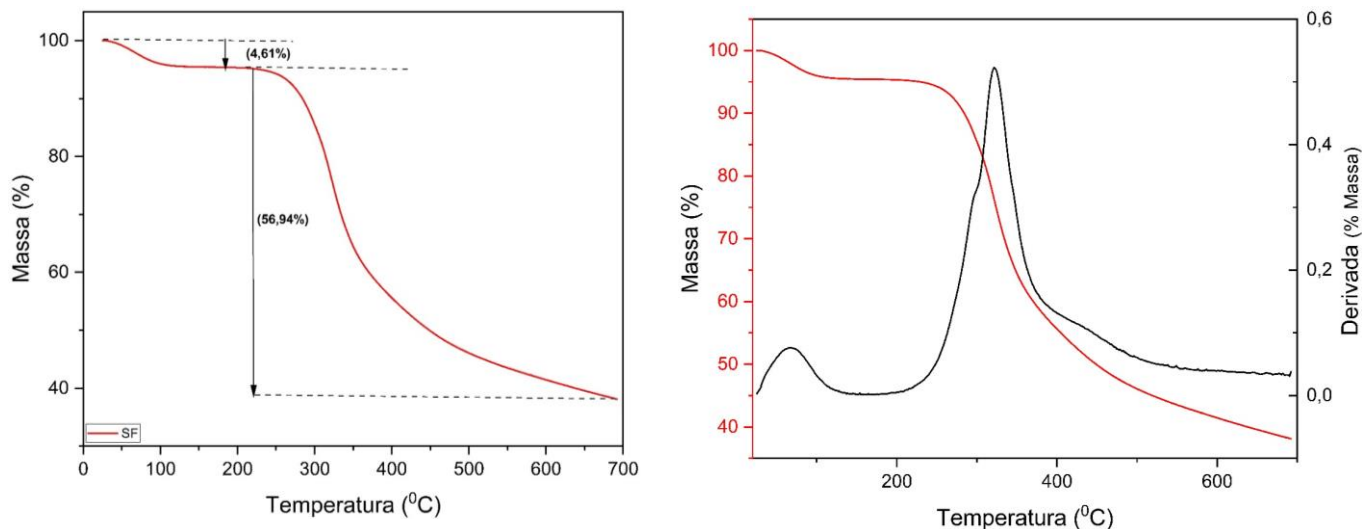


Figura 4 Análise Termogravimétrica (TG) e Taxa de Perda de Massa (DTG) para a fibroína de seda (SF)

Após 400°C, a taxa de degradação diminui consideravelmente, indicando que os resíduos carbonizados da proteína permanecem sem sofrer degradação total até aproximadamente 700°C. Esse resíduo remanescente pode estar associado à formação de estruturas carbonáceas, provenientes da degradação térmica incompleta da fibroína, semelhante ao que ocorre com outros polímeros naturais. Os valores obtidos no presente estudo estão alinhados com dados reportados na literatura para fibroína natural e regenerada [63,64].

A análise termogravimétrica da proteína foi complementada pela derivada termogravimétrica (DTG), conforme apresentado na Figura 4. A DTG permite uma avaliação mais detalhada dos eventos térmicos, destacando com precisão as faixas de degradação e a taxa de perda de massa ao longo do aquecimento. O principal pico de decomposição foi identificado em 350°C, indicando a temperatura na qual ocorre a maior taxa de degradação da fibroína. Esse comportamento térmico é característico de proteínas estruturadas com alta estabilidade.

4.1.4. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM PÓ (PXRD)

A análise de difração de raios X por pó (PXRD) foi utilizada para investigar o comportamento estrutural da fibroína comercial. O difratograma obtido para essa amostra (Figura 5) apresenta um pico

largo em torno de 20° (2θ), indicando uma predominância de estrutura amorfa e baixo grau de cristalinidade. Esse comportamento é típico de fibroína em sua forma regenerada ou hidratada, na qual há uma maior desordem nas cadeias polipeptídicas. Nessas condições, estruturas secundárias como α -hélices e espirais aleatórias tendem a ser mais frequentes, enquanto a organização em folhas β — típica da fibroína cristalina — se encontra reduzida [65,66].

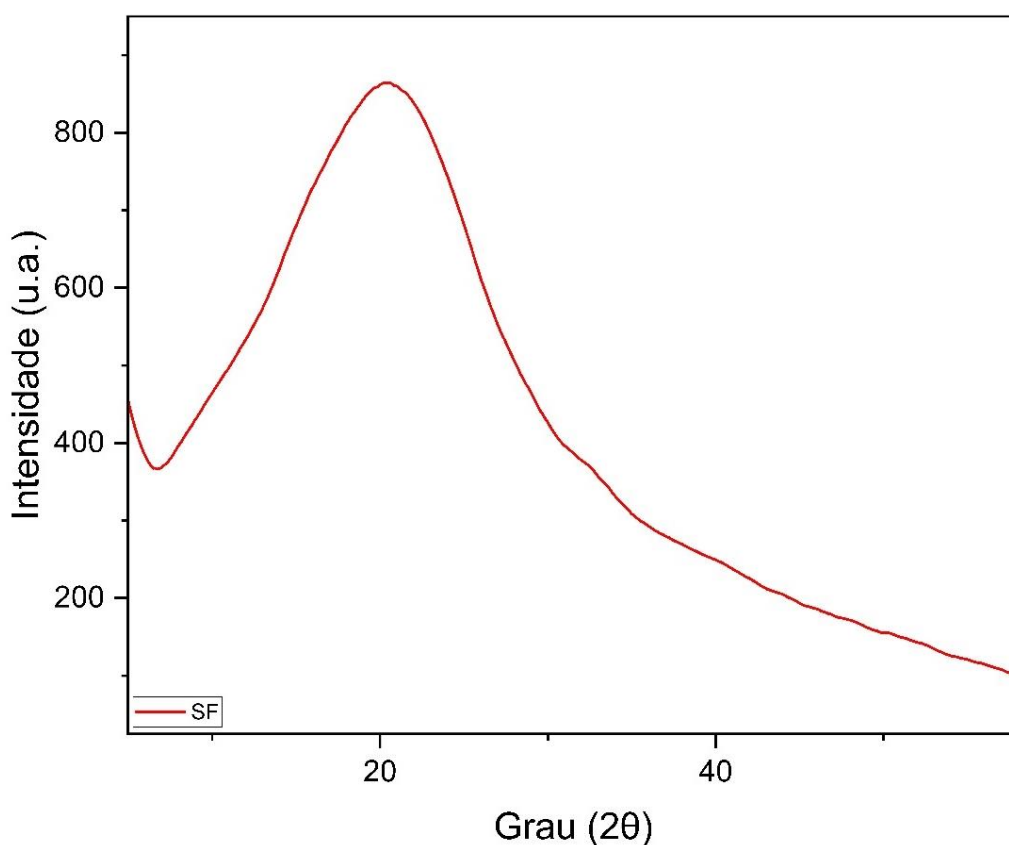


Figura 5 Espectro de Difração de Raios X (PXRD) para a fibroína de seda (SF) comercial.

A presença de estruturas do tipo folha- β , associadas às regiões cristalinas da fibroína, normalmente se manifesta como picos mais definidos e intensos na difração de raios X, especialmente na faixa de 16 a 24° (2θ). No entanto, o difratograma da fibroína comercial (Figura 5) não apresenta picos bem resolvidos nessa região, sugerindo uma organização estrutural predominantemente amorfa, com baixa fração cristalina [65,66]. Essa característica está em conformidade com amostras de fibroína regenerada, nas quais há maior predominância de α -hélices e espirais aleatórias, típicas de regiões desorganizadas.

A literatura indica que a transição entre conformações amorfas e cristalinas pode ser induzida por tratamentos como exposição a solventes orgânicos (ex.: etanol), variações de temperatura ou outras condições físico-químicas. Essa observação é particularmente relevante no contexto deste trabalho,

pois a organização estrutural da fibroína influencia diretamente suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, estabilidade térmica. Uma fibroína com menor cristalinidade tende a ser mais solúvel e reativa, o que pode favorecer sua modificação química, funcionalização ou interação com polímeros e agentes inorgânicos.

4.1.5. SOLUBILIDADE DA FÍBROINA

A Figura 6 apresenta a análise visual da fibroína antes e após sua dissolução em água a uma concentração de 5 mg/mL. Na Figura 6A, a fibroína é observada na forma de um sólido branco, enquanto na Figura 6B, percebe-se que a proteína foi totalmente solubilizada, formando uma solução homogênea e transparente.

A solubilidade da fibroína está diretamente relacionada à sua estrutura molecular. Em sua forma predominantemente amorfa, com conformações α -hélice e espiral aleatória, a proteína apresenta maior capacidade de dissolução em água. Por outro lado, se houvesse um alto teor de folha- β , sua solubilidade seria reduzida devido à organização mais rígida das cadeias [67]



Figura 6 Solubilidade em água da fibroína de seda (SF)

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FIBROÍNA EXTRAÍDAS DOS CASULOS DO BICHO DA SEDA *BOMBYX MORI*

4.2.1. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A Figura 7 apresenta os espectros de FTIR das amostras de fibroína comercial (SF/Sigma) e das fibroínas extraídas por duas rotas distintas: com brometo de lítio (SF/LiBr) e com cloreto de magnésio (SF/MgCl₂). As análises foram conduzidas na faixa de 4000 a 800 cm⁻¹, destacando-se as regiões características das bandas de Amida I (~1650 cm⁻¹), Amida II (~1540 cm⁻¹) e Amida III (~1230 cm⁻¹), associadas respectivamente às vibrações de estiramento C=O, flexão N-H e combinações entre ligações C-N e N-H — marcadores estruturais da conformação secundária da proteína.

Observa-se que a amostra SF/LiBr apresenta um perfil espectral bastante semelhante ao da fibroína comercial, com bandas mais intensas e bem definidas, especialmente na região da Amida I. Esse comportamento pode indicar que o uso de LiBr como agente solubilizante favorece a manutenção da organização estrutural da proteína.

Em contraste, a amostra SF/MgCl₂ apresentou bandas de menor intensidade, com leve deslocamento e alargamento, principalmente nas regiões de Amida I e Amida II. Esses resultados sugerem uma menor organização das estruturas ou a presença de impurezas residuais que interferem na assinatura espectral, o que está de acordo com a literatura para materiais com maior grau de desordem ou parcialmente desnaturados.

De modo geral, os espectros indicam que o método de extração influencia diretamente a integridade estrutural da fibroína, com o processo utilizando LiBr mostrando-se mais eficiente na preservação das estruturas características da proteína em comparação ao método com MgCl₂.

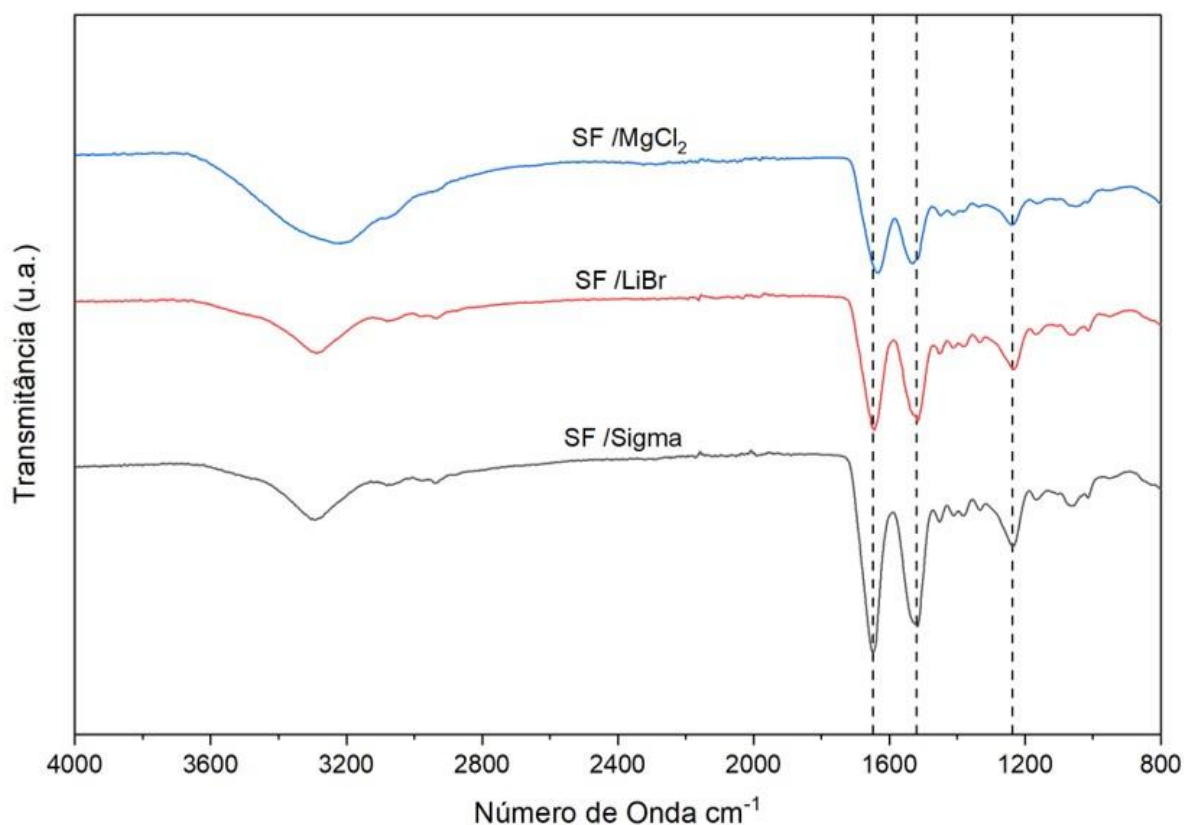


Figura 7 Espectros obtidos para as amostras de fibroína: SF/Sigma (fibroína comercial), SF/LiBr (fibroína extraída com brometo de lítio) e SF/MgCl₂ (fibroína extraída com cloreto de magnésio).

4.2.2. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

A Figura 8 apresenta os espectros de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) para as amostras de fibroína: comercial (SF/Sigma), extraída com brometo de lítio (SF/LiBr) e extraída com cloreto de magnésio (SF/MgCl₂). As análises foram realizadas na faixa de 200 a 900 nm, permitindo observar a presença de aminoácidos aromáticos com grupos cromóforos que absorvem intensamente na região do UV, como tirosina, triptofano.

Todas as amostras apresentaram um pico de absorção intenso abaixo de 300 nm, como esperado para proteínas naturais. A amostra SF/Sigma exibiu o perfil mais definido, com um máximo de absorbância mais pronunciado, o que pode estar associado a uma maior pureza e maior proporção relativa de resíduos aromáticos livres.

A amostra SF/LiBr apresentou um comportamento semelhante, embora com leve redução na intensidade do pico, indicando possível presença de resíduos ou menor concentração de grupos aromáticos expostos. Por outro lado, a amostra SF/MgCl₂ apresentou um espectro mais alargado, com deslocamento do pico máximo e aumento da absorbância na faixa entre 250–280 nm. Esse comportamento pode ser atribuído à presença de impurezas residuais, agregados proteicos ou à

desnaturação parcial da proteína, que alteram o microambiente dos resíduos cromóforos e sua capacidade de absorção.

Esses dados reforçam a influência do método de extração sobre as características ópticas e, indiretamente, estruturais das amostras de fibroína, com o método baseado em LiBr se aproximando mais do padrão comercial em termos de perfil espectral.

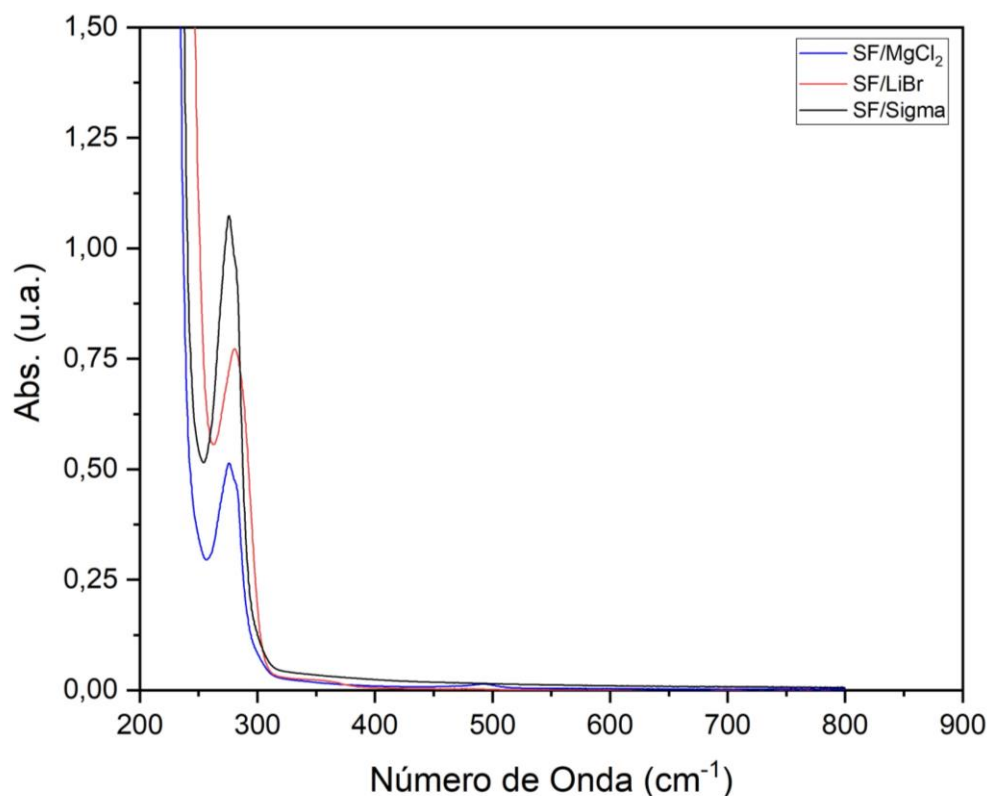


Figura 8 Espectros de absorção na região do UV-Vis das amostras de fibroína SF/Sigma (comercial), SF/LiBr (extraída com brometo de lítio) e SF/MgCl₂ (extraída com cloreto de magnésio) a uma concentração de 2mg mL⁻¹.

4.2.3. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

A Figura 9 apresenta os perfis térmicos das amostras de fibroína obtidos por análise termogravimétrica (TGA), na faixa de 30 °C a 700 °C. Todas as amostras apresentaram uma perda inicial de massa abaixo de 150 °C, atribuída à eliminação de água adsorvida. A etapa principal de degradação ocorreu entre ~250 °C e 400 °C, correspondente à decomposição das cadeias polipeptídicas.

A fibroína comercial (SF/Sigma) demonstrou o maior grau de estabilidade térmica, com início de degradação mais tardio próximo a 310 °C. A amostra SF/LiBr apresentou comportamento semelhante, com degradação ligeiramente antecipada (~295 °C), mantendo um perfil térmico coerente com uma estrutura parcialmente preservada. Em contraste, a amostra SF/MgCl₂ apresentou uma degradação mais acelerada.

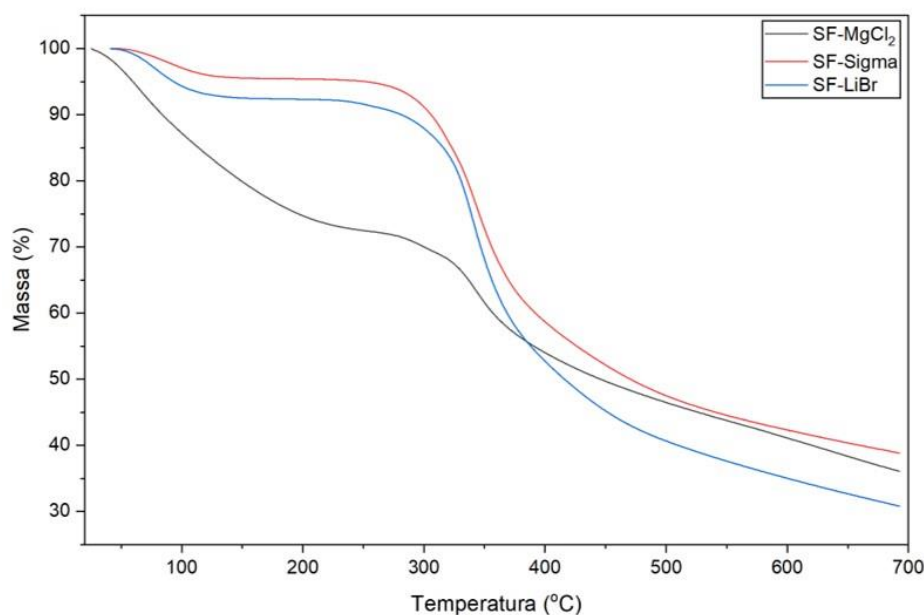


Figura 9 Curvas de análise termogravimétrica (TGA) das amostras de fibroína SF/Sigma (comercial), SF/LiBr (extraída com brometo de lítio) e SF/MgCl₂ (extraída com cloreto de magnésio), obtidas na faixa de 30 °C a 700 °C.

4.2.4. DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM PÓ (PXRD)

A Figura 10 apresenta os difratogramas de raios X (XRD) das amostras de fibroína SF-LiBr (extraída com brometo de lítio), SF-Sigma (comercial) e SF-MgCl₂ (extraída com cloreto de magnésio). As análises foram realizadas na faixa de 5° a 60° (2θ), permitindo a avaliação do grau de ordenamento molecular das amostras.

Todas as amostras apresentaram perfis com picos amplos e de baixa definição, característicos de materiais predominantemente amorfos. No entanto, observam-se diferenças importantes entre elas quanto ao grau de organização residual.

A amostra SF-LiBr apresentou o pico de maior intensidade e definição em torno de 20° (2θ), isso sugere que a extração com LiBr favorece a reorganização parcial da estrutura semicristalina da fibroína.

A fibroína comercial (SF-Sigma) apresentou um perfil intermediário, com pico também centrado próximo de 20°, porém menos intenso e mais alargado, indicando menor proporção de domínios ordenados em relação à SF-LiBr. Por fim, a amostra SF-MgCl₂ apresentou o padrão mais difuso e de menor intensidade, refletindo uma estrutura amplamente amorfa e desorganizada, possivelmente em função de desnaturação ou de uma extração menos eficiente na preservação da conformação β-estruturada.

Esses resultados demonstram que, embora todas as amostras apresentem características majoritariamente amorfas, o método de extração com LiBr foi o mais eficaz na conservação parcial da estrutura ordenada da fibroína, superando inclusive a amostra comercial em termos de cristalinidade detectável por XRD.

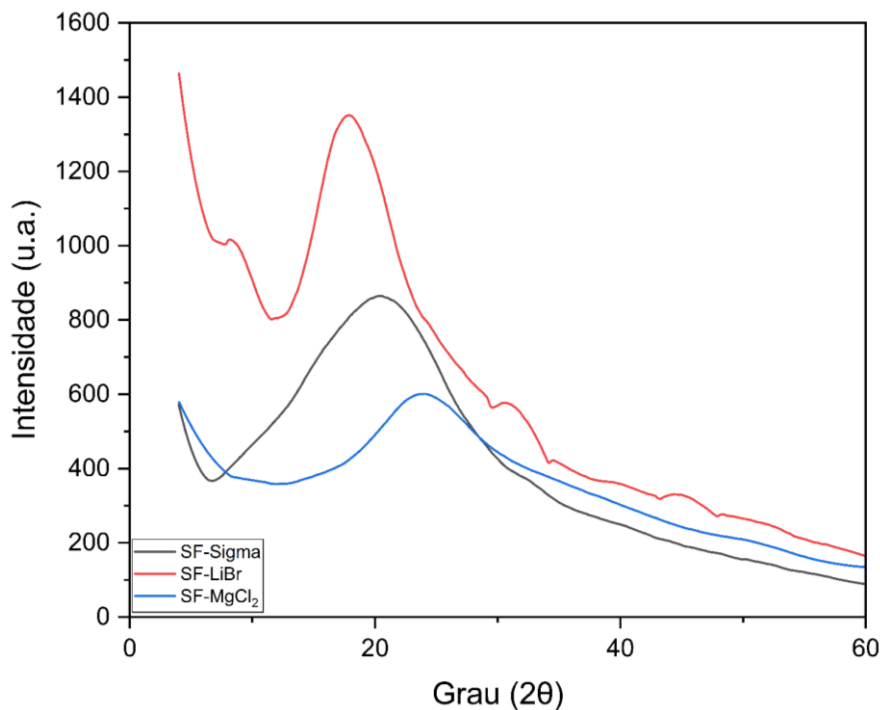


Figura 10 Difratogramas de raios X (XRD) das amostras de fibroína SF-Sigma (comercial), SF-LiBr e SF-MgCl₂

4.2.5. SOLUBLIDADE DAS AMOSTRAS DE FIBROÍNA

A Figura 11 ilustra a dispersão em água das amostras de fibroína ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) obtidas por diferentes métodos de extração: com brometo de lítio (LiBr), cloreto de magnésio (MgCl₂) e a amostra comercial (SF-Sigma). As imagens evidenciam diferenças na solubilidade das amostras em meio aquoso.

As amostras extraídas com LiBr (A e D) apresentaram baixa capacidade de solubilização, mantendo-se predominantemente na forma de agregados visíveis mesmo após tentativa de dispersão, o que sugere forte interação intermolecular entre as cadeias proteicas ou colapsos estruturais durante a liofilização.

As amostras obtidas com MgCl₂ (B e E) demonstraram comportamento intermediário, com leve dispersão e parte do material ainda precipitado ou parcialmente hidratado, indicando uma estrutura menos coesa, mas ainda com limitação na redispersão. Em contraste, a amostra comercial (C e F)

apresentou excelente solubilidade, resultando em soluções límpidas e homogêneas, sem presença de resíduos visíveis, o que reflete seu alto grau de pureza, organização molecular e adequada preparação industrial.

Esses resultados indicam que, embora o método de extração com LiBr favoreça a preservação estrutural da fibroína (conforme demonstrado pelas análises FTIR e XRD), sua solubilidade em água é limitada — um fator crítico para aplicações que demandam formulações hidrossolúveis. A fibroína comercial, por sua vez, demonstrou ser a mais adequada para sistemas aquosos, reunindo simultaneamente pureza, processabilidade e estabilidade coloidal.

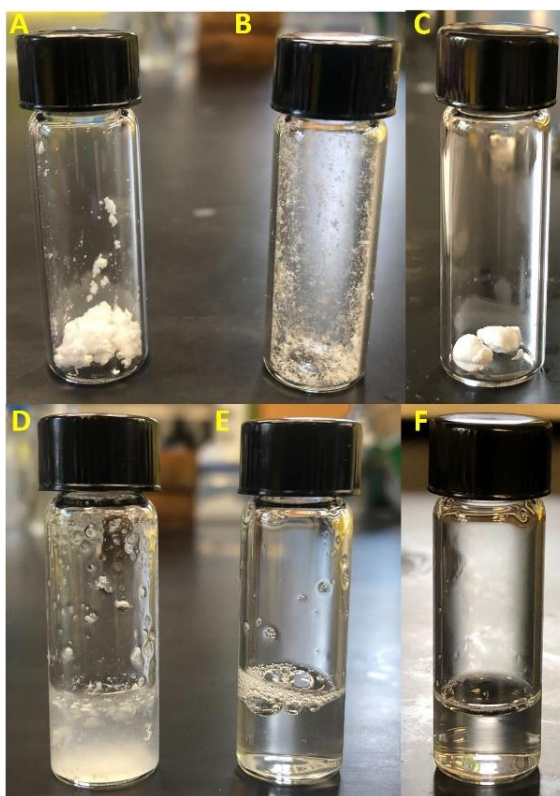


Figura 11 Análise visual das amostras de fibroína em diferentes condições após tentativa de solubilização em água. À esquerda: fibroína extraída com LiBr (A e D); ao centro: fibroína extraída com MgCl₂ (B e E); à direita: fibroína comercial SF-Sigma (C e F).

4.2.6. AVALIAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR SDS-PAGE E MALDI-TOF

Com o objetivo de caracterizar o perfil de massa molecular das amostras de fibroína extraídas e compará-las à amostra comercial, foram empregadas as técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e espectrometria de massas por ionização a laser assistida por matriz com análise de tempo de voo (MALDI-TOF).

Contudo, a análise por SDS-PAGE não permitiu a visualização clara e definida das cadeias proteicas, especialmente da cadeia pesada da fibroína (~300 kDa). Não foram observadas bandas

discretas em nenhuma das amostras analisadas. Em vez disso, verificou-se uma mancha difusa na região de alto peso molecular, indicando baixa resolução e possível presença de agregados proteicos ou conformações não desnaturadas. Ainda que o aumento da concentração da amostra tenha intensificado essa faixa, a separação permaneceu ineficiente. A literatura relata dificuldades semelhantes na caracterização da fibroína por SDS-PAGE, em especial no que diz respeito às cadeias pesadas, devido à sua elevada massa molecular, viscosidade e propensão à formação de estruturas agregadas.

Complementarmente, foi aplicada a técnica de MALDI-TOF, com o intuito de obter maior resolução para os componentes de alto peso molecular. No entanto, não foram obtidos espectros representativos para nenhuma das amostras, mesmo após ajustes nas condições analíticas. A ineficiência na ionização pode ser atribuída ao alto peso molecular, à complexidade conformacional e às fortes interações intermoleculares que dificultam a desorção das moléculas para análise por espectrometria de massas.

5. CONCLUSÃO

Neste capítulo, foi realizada uma caracterização físico-química detalhada da fibroína de seda comercial (SF-Sigma) e sua comparação com amostras obtidas a partir da extração laboratorial de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), utilizando duas rotas distintas: brometo de lítio (LiBr) e uma solução ternária contendo MgCl₂/etanol/água. Os resultados obtidos por meio das análises espectroscópicas (FTIR e UV-Vis), termogravimétricas (TGA), difração de raios X por pó (PXRD), solubilidade e avaliação de massa molecular permitiram estabelecer pontos de convergência e divergência relevantes entre as diferentes amostras.

Observou-se que, em diversos aspectos, a amostra extraída com LiBr apresentou comportamento semelhante ao da fibroína comercial, especialmente quanto ao perfil espectral por FTIR e à estabilidade térmica. No entanto, fatores críticos como a baixa solubilidade em meio aquoso e a ineficiência nas análises de massa molecular por SDS-PAGE e MALDI-TOF indicam limitações importantes dessas amostras extraídas para aplicações subsequentes. A amostra obtida com MgCl₂, por sua vez, apresentou características menos favoráveis em praticamente todas as análises realizadas.

Em contraste, a fibroína comercial demonstrou excelente solubilidade em água, e, apesar da ausência de dados diretos de massa molecular obtidos por espectrometria, sua ficha técnica assegura um peso molecular médio. Tais características tornam essa amostra a mais adequada para o desenvolvimento de sistemas híbridos funcionais, sobretudo aqueles que demandam processabilidade, reprodutibilidade e compatibilidade com formulações aquosas. No entanto, vale destacar que a fibroína

comercial apresenta custo elevado, de aproximadamente R\$ 908,00 por 1 g, enquanto a fibroína extraída em laboratório demanda solventes e reagentes de baixo custo.

A solubilidade da fibroína de seda está diretamente relacionada à sua estrutura molecular. Essa proteína apresenta regiões altamente organizadas que tornam sua estrutura mais rígida, estável e difícil de dissolver em água. Por outro lado, quando a fibroína apresenta regiões mais desorganizadas, como estruturas amorfas, ela tende a ser mais solúvel, pois essas partes são mais flexíveis e interagem melhor com a água. Essas diferenças de solubilidade afetam diretamente o uso da fibroína em reações químicas e na preparação de sistemas híbridos. Amostras pouco solúveis dificultam a funcionalização da proteína e a formação de nanopartículas.

Dessa forma, optou-se pelo uso da fibroína comercial como base proteica nos sistemas híbridos desenvolvidos no próximo capítulo. Essa escolha não invalida os avanços obtidos com a extração laboratorial, mas ressalta a necessidade de etapas adicionais de purificação e ajuste de protocolo para que essas amostras se tornem viáveis para aplicações mais sofisticadas.

CAPÍTULO 3 – SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS HÍBRIDOS SF-PNVCL VIA POLIMERIZAÇÃO RAFT

1. INTRODUÇÃO

A partir dos dados obtidos na caracterização físico-química da fibroína comercial e escolha da matéria prima para a continuidade dos estudos, este capítulo se dedica ao desenvolvimento de sistemas híbridos baseados em fibroína de seda (SF) e poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL), utilizando como estratégia sintética principal a polimerização radicalar por transferência de átomo via agente de transferência de cadeia reversível (RAFT – *Reversible Addition–Fragmentation chain Transfer*).

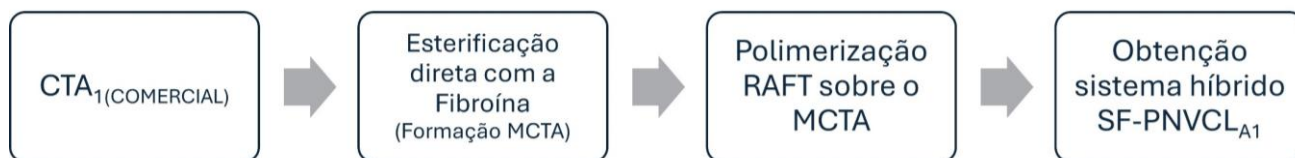
Em todas as etapas descritas neste capítulo, foi utilizada fibroína comercial (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), previamente caracterizada, com o objetivo de garantir a reprodutibilidade e a solubilidade do material de partida, aspectos fundamentais para o sucesso da funcionalização e subsequente formação do sistema híbrido. Diferentemente das amostras extraídas em laboratório, que apresentaram limitações quanto à solubilidade em meio aquoso e dificuldade na caracterização da massa molecular, a fibroína comercial ofereceu maior solubilidade e massa molecular definida.

A escolha da polimerização RAFT como abordagem central baseia-se em suas diversas vantagens da técnica em relação a outras metodologias de polimerização controlada/viva, como a polimerização por transferência de átomo (ATRP) ou *click chemistry*. Dentre os principais benefícios da técnica RAFT, destacam-se a tolerância a grupos funcionais sensíveis, a ampla compatibilidade com solventes aquosos e a capacidade de operar em condições mais brandas, características especialmente relevantes quando se trabalha com proteínas como a fibroína.

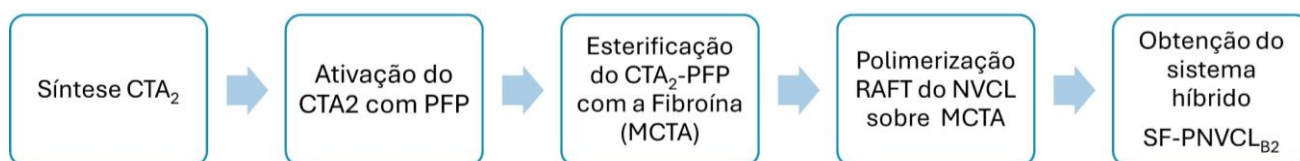
Ao contrário da ATRP, que frequentemente requer catalisadores metálicos (ex.: Cu(I), Fe(II)), potencialmente tóxicos e de difícil remoção, a RAFT permite a polimerização em meio livre de metais, o que é altamente desejável para aplicações biomédicas. Por sua vez, metodologias baseadas em *click chemistry*, como a reação azida-alquino catalisada por cobre (CuAAC), embora altamente eficientes, exigem a funcionalização prévia com grupos específicos, o que adiciona complexidade à rota sintética e pode comprometer a integridade da proteína.

Para a realização da polimerização via RAFT, é essencial a utilização de um CTA (*Chain Transfer Agent*), ou agente de transferência de cadeia, devidamente compatível com o monômero utilizado e com o meio reacional. O CTA é responsável por mediar o crescimento controlado das cadeias poliméricas, garantindo uma distribuição de massa molar estreita e a possibilidade de projetar arquiteturas macromoleculares bem definidas.

Neste trabalho, foram empregadas duas rotas distintas para a síntese dos sistemas híbridos SF–PNVCL, ambas baseadas na estratégia *grafting-from*, em que o crescimento do polímero ocorre a partir de sítios previamente funcionalizados na superfície da proteína. A Rota A utilizou um CTA comercial, enquanto a Rota B empregou um CTA sintetizado em laboratório e funcionalizado com pentafluorofenol (PFP).



ESQUEMA 1. Rota A para obtenção do sistema híbrido SF–PNVCL_{A1}. Nesta estratégia, utiliza-se um agente de transferência de cadeia comercial (CTA₁), que é diretamente acoplado à fibroína por meio de uma reação de esterificação, formando o macroagente de transferência de cadeia (MCTA). Em seguida, realiza-se a polimerização do monômero *N*-vinilcaprolactama (NVCL) via técnica RAFT, resultando na formação de um sistema híbrido.



ESQUEMA 2. Rota B para a obtenção do sistema híbrido SF–PNVCL_{B2}. Nesta rota, realiza-se inicialmente a síntese do agente de transferência de cadeia (CTA₂), seguido de sua ativação com pentafluorofenol (PFP), com o objetivo de aumentar sua reatividade frente aos grupos hidroxila da fibroína. Em seguida, o CTA₂-PFP é esterificado com a fibroína, formando o macroagente de transferência de cadeia (MCTA). A polimerização controlada do monômero *N*-vinilcaprolactama (NVCL) é então conduzida sobre o MCTA via polimerização RAFT.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterizar agente de transferência (CTAs)
- Síntese e caracterizar de agente de transferência ativado (CTA₂-PFP)
- Polimerizar o monômero NVCL sobre as espécies macroiniciadoras utilizando a técnica de polimerização RAFT;
- Caracterizar físico-quimicamente os sistemas híbridos obtidos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTE E SOLUÇÕES

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram adquiridos de fornecedores reconhecidos e empregados conforme fornecidos, exceto quando indicado. A pureza dos compostos foi verificada pelas especificações do fabricante. 4-dimetilaminopiridina (DMAP, $C_7H_{10}N_2$, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), ácido 2-((etoxicarbonotioil)tio)-2-metilpropanoico (CTA₁, $C_7H_{12}O_3S_2$, 95%, Fischer Chemical), ácido 2-bromopropiônico ($CH_3CHBrCOOH$, $\geq 98\%$, Oakwood), ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, $C_7H_{14}N_2$, 99%, Sigma-Aldrich), etil xantogenato de potássio ($C_2H_5OCS_2K$, $\geq 97\%$, Oakwood), pentafluorofenol (PFP, C_6HF_5O , $\geq 99\%$, Oakwood), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$, 99%, Fischer Chemical) e hidroperóxido de terc-butila ($((CH_3)_3COOH$, 70% em H_2O , Thermo Scientific).

Os solventes empregados incluíram 1,4-dioxano ($C_4H_8O_2$, anidro, Sigma-Aldrich), diclorometano (CH_2Cl_2 , anidro, Sigma-Aldrich), clorofórmio ($CHCl_3$, 99%, Fischer Chemical), metanol (CH_3OH , 99%, Thermo Scientific), n-hexano (C_6H_{14} , 99%, Thermo Scientific), acetona (C_3H_6O , grau HPLC, Fischer Chemical), etanol (C_2H_6O , 99,5%, Fischer Chemical) e água Milli-Q (ultrapura, sistema Millipore).

Para as análises espectroscópicas por RMN, foram utilizados solventes deuterados: clorofórmio deuterado ($CDCl_3$, 99,9%, Sigma-Aldrich) e água deuterada (D_2O , 99,9%, Sigma-Aldrich). A fibroína de seda (SF) foi adquirida da Sigma-Aldrich (pureza $\geq 99\%$, 100kDa, solúvel em H_2O). O monômero N-vinilcaprolactama (NVCL, $C_8H_{13}NO$, 98%, Sigma-Aldrich) foi previamente purificado por recristalização em n-hexano antes da polimerização.

Todos os reagentes e soluções tampão foram preparados com água ultrapura e manipulados sob condições adequadas de controle de atmosfera (N_2) quando necessário. Reagentes provenientes das marcas Sigma-Aldrich, Oakwood e Thermo Scientific foram utilizados conforme as recomendações dos respectivos fornecedores.

3.2. SÍNTESE DO AGENTE DE TRANSFERÊNCIA DE CADEIA (CTA₂)

A polimerização via RAFT requer a presença de um agente de transferência de cadeia (CTA). O ácido 2-((etoxicarbonotioil)tio)propanoico (CAS Number: 51440-83-6, $C_6H_{10}O_3S_2$, 194,3 g mol⁻¹), referenciado como CTA₂, foi sintetizado em laboratório com base em metodologia adaptada [68]. A síntese do CTA₂ foi realizada a partir da reação entre etil xantogenato de potássio (2,77 g, 1,73 mmol), ácido 2-bromopropiônico (1,76 g, 1,15 mmol) e acetona (10 mL) (Figura 1). Os reagentes foram

adicionados a um balão de fundo redondo e mantidos sob agitação magnética vigorosa, à temperatura ambiente, por 24 horas, sob atmosfera inerte de nitrogênio (N₂).

Após esse período, o sólido insolúvel foi removido por filtração com papel de filtro qualitativo, e o excesso de solvente (acetona) e de reagente não reagido (ácido 2-bromopropiônico) foi eliminado por evaporação rotativa sob pressão reduzida. O produto bruto obtido foi seco a vácuo, pesado e o rendimento da reação foi calculado com base na massa teórica esperada.

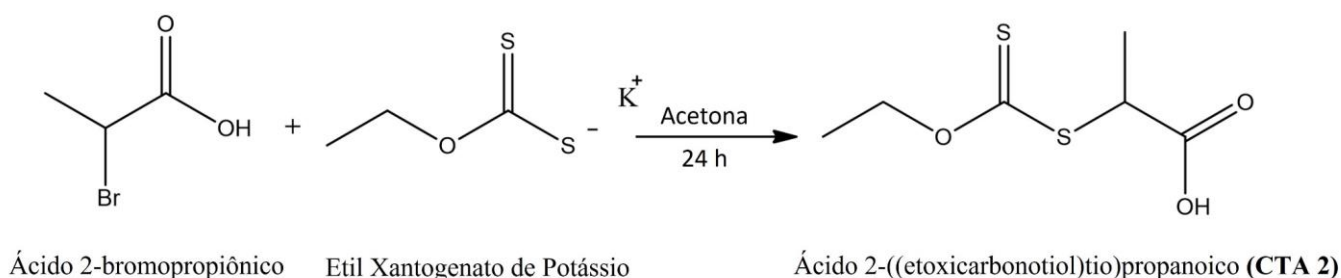


Figura 1 Esquema de síntese do agente de transferência de cadeia CTA₂

3.3.ATIVAÇÃO CTA₂ COM PENTAFLUOROFENOL (PFP)

CTA₂ foi ativado para a obtenção de um agente de transferência mais reativo, conforme metodologia adaptada de Vanparijs et al. [69]. Para isso, (0,971 g, 5 mmol) do agente de transferência, pentafluorfenol (PFP) (1,012 g, 5,5 mmol) e DMAP (61 mg, 0,5 mmol) foram dissolvidos em diclorometano anidro (DCM, 50 mL) dentro de um balão de fundo redondo, sob atmosfera de N₂ (Figura 2). A solução foi resfriada em banho de gelo, e uma solução de N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIC, 694 mg, 5,5 mmol) em DCM (10 mL) foi adicionada lentamente, gota a gota, sob agitação vigorosa. Após a adição, a mistura reacional permaneceu sob agitação no banho de gelo por 2 horas e, em seguida, foi mantida à temperatura ambiente durante a noite.

O material obtido foi inicialmente filtrado utilizando papel de filtro qualitativo (Whatman) para remoção de resíduos insolúveis. Em seguida, o solvente foi eliminado por evaporação sob vácuo, empregando um evaporador rotativo a vácuo. Para garantir a pureza do composto, o material bruto foi submetido à cromatografia em coluna, utilizando sílica gel 60 (granulometria 70–230 mesh, Merck) como fase estacionária. A coluna empregada possuía aproximadamente 2,5 cm de diâmetro e 20 cm de altura, previamente acondicionada com clorofórmio como eluente. A amostra foi aplicada no topo da coluna e eluída sob gravidade. Foi coletada a primeira fração eluída, correspondente à zona frontal do composto de interesse. O solvente da fração coletada foi removido sob vácuo, e o produto purificado foi seco e armazenado em dessecador.

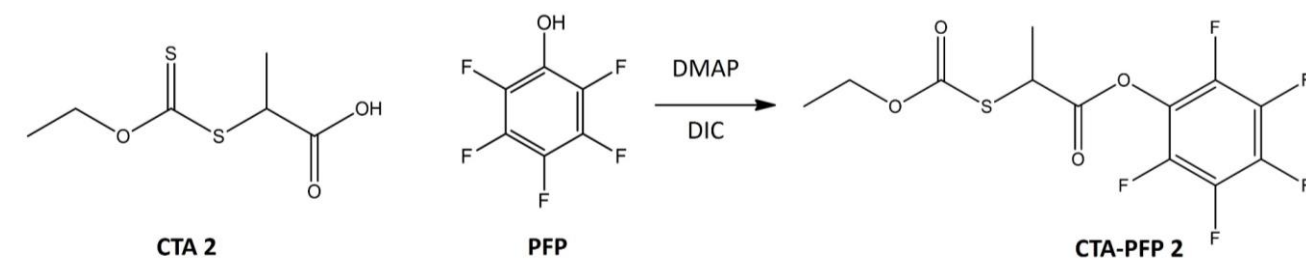


Figura 2 Rota de síntese do agente de transferência ativado CTA-PFP₂

3.4.SÍNTESE MACRO AGENTE DE TRANSFÊNCIA RAFT (MCTA) (ROTA A)

A fibroína apresenta, em sua sequência de aminoácidos, resíduos de serina contendo grupos hidroxila primários, os quais podem ser explorados como sítios reativos para a formação de ligações covalentes. Esses grupos –OH permitem a realização de reações de esterificação com agentes de transferência de cadeia (CTAs) contendo funções carboxílicas, resultando na formação de grupos ésteres e, conseqüentemente, na geração de um macroagente de transferência de cadeia (MCTA). Essa funcionalização é fundamental para a estratégia *grafting from* via polimerização RAFT. Para essa rota (denominada Rota A), foi utilizado um CTA comercialmente disponível: o ácido 2-((etoxicarbonotioil)tio)-2-metilpropanoico (CAS Number: 133944-74-8; fórmula molecular: C₇H₁₂O₃S₂; massa molar: 208,3 g·mol⁻¹), referenciado neste trabalho como CTA₁.(Figura 3).

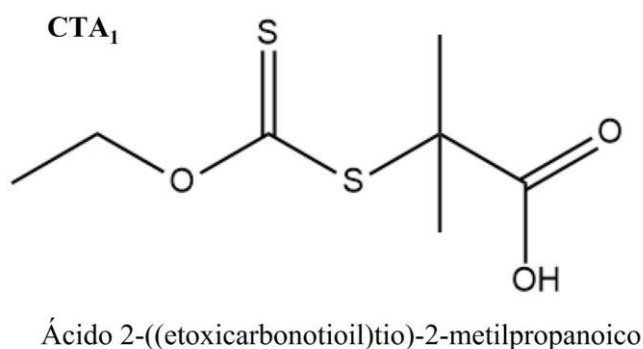


Figura 3 Agente de transferência de cadeia CTA₁ (comercial)

Para a reação, foram adicionados 50 mg de SF, 50 mg de CTA₁, 6,28 mg de DMAP e 12,74 mg de DIC em uma solução de DCM anidro, sob atmosfera de N₂ (Figura 4). Inicialmente, a mistura foi mantida sob agitação em banho de gelo e, em seguida à ambiente, onde permaneceu em reação por até 24 horas. Após a reação, a purificação foi realizada por diálise utilizando membranas de 3,5 kDa

em solução tampão PBS (pH 7,4) por 72 horas. Por fim, a suspensão contendo o MCTA foi liofilizada e utilizada para posterior polimerização.

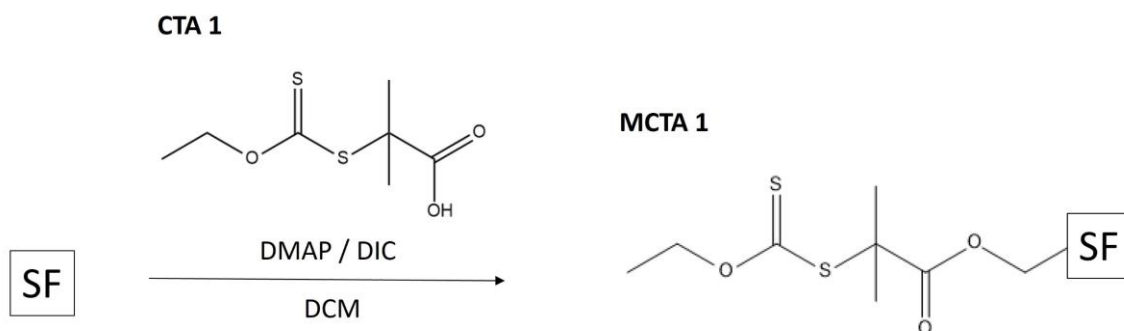


Figura 4 - Rota de síntese do macro agente de transferência MCTA_{A1}

3.5. SÍNTESE MACRO AGENTE DE TRANSFERÊNCIAS RAFT (ROTA B)

Diferentemente da Rota A, na qual foi utilizado um agente de transferência de cadeia (CTA) comercial diretamente acoplado à fibroína por meio de uma reação de esterificação simples, a Rota B se baseia no uso de um CTA sintetizado em laboratório e previamente ativado com pentafluorofenol (PFP) – CTA₂-PFP. A ativação com PFP confere ao CTA maior reatividade frente aos grupos –OH presentes na fibroína, facilitando a formação da ligação éster em pH alcalino moderado. O processo foi desenvolvido com base em estudos prévios da literatura [69].

Inicialmente, 2 mL de uma solução de fibroína (50 mg mL⁻¹) foram diluídos em 3 mL de solução tampão PBS (pH 7,4) temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se mais 3 mL de PBS (pH 8,2), e o pH da mistura foi ajustado para aproximadamente 9,0 com solução de NaHCO₃ 5 M. Após o ajuste do pH, 30 mg de CTA-PFP foram adicionados sob agitação contínua, mantendo-se a mistura a 25 °C por 24 horas (Figura 5). Após 2h o produto foi purificado por diálise utilizando membranas com peso molecular de corte (MWCO) de 3,5 kDa em PBS (pH 7,4) por 72 horas, a fim de remover reagentes residuais. Durante esse período, a temperatura foi mantida abaixo de 25 °C para preservar a integridade da proteína. Por fim, a suspensão contendo o material funcionalizado (MCTA-PFP) foi liofilizada e armazenada para posterior polimerização com NVCL.

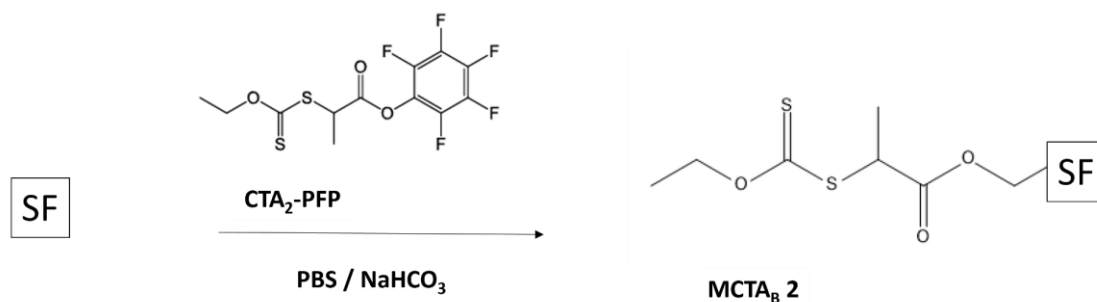


Figura 5 Rota de síntese do macro agente de transferência MCTA_{B2}.

3.6.POLIMERIZAÇÃO DO NVCL SOBRE OS MCTAs

A polimerização do monômero *N*-vinilcaprolactama (NVCL) foram realizadas a partir de metodologias adaptadas descritas em [69–71]. Um balão de fundo redondo com duas aberturas foi previamente desoxigenado com N₂, garantindo uma atmosfera inerte. Em seguida, foram adicionados MCTA (10 mg, 50 μmol, previamente sintetizado), solução de hidroperóxido de terc-butila a 70% em H₂O (7 μL, 50 μmol), NVCL (1 g, 7,2 mmol) e água Milli-Q (0,1 mL). Após essa etapa, foi incorporado ácido ascórbico (8,8 mg, 50 μmol) juntamente com uma mistura de água Milli-Q/1,4-dioxano (0,5 mL, 50/50). A reação de polimerização foi realizada sob atmosfera de N₂ à temperatura ambiente por 24 horas. Após a conclusão da reação, o polímero obtido foi purificado por diálise em solução tampão PBS (pH 7,4) utilizando membranas de 3,5 kDa durante 72 horas, garantindo a remoção de impurezas e reagentes residuais.

3.7.CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E TÉRMICA

As metodologias empregadas para a caracterização estrutural e térmica dos materiais, por meio de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), análise termogravimétrica (TGA/DTG) e difração de raios X por pó (PXRD), seguiram os protocolos previamente descritos no Capítulo 2, Seções 3.2, 3.4 e 3.6, respectivamente. Todos os ensaios foram conduzidos conforme as condições experimentais padronizadas e detalhadas nas referidas seções.

3.8.ESPECTROMETRIA DE MASSA

Os dados de espectrometria de massa por espectrometria de Massas por Ionização a Laser Assistida por Matriz com Análise por Tempo de Voo (MALDI-ToF MS) foram obtidos utilizando um espectrômetro de massas Autoflex III MALDI-TOF (Bruker), e analisado no programa FlexAnalysis

3.4. As análises foram realizadas no modo linear de íons positivos de reflexão, com uma tensão de aceleração de 18,8 kV. A ionização das amostras foi conduzida por um laser Nd:YAG SmartBeam™ com frequência de 355 nm, fornecido pela Bruker. Todas as amostras foram analisadas em replicata.

Os espectros de alta resolução e alta precisão (ESI-MS) foram obtidos utilizando um espectrômetro Exactive Orbitrap da ThermoFisher Scientific. O espectrômetro Orbitrap foi empregado para garantir a análise detalhada das amostras, proporcionando uma precisão excepcional na determinação das massas moleculares, essencial para a caracterização das substâncias analisadas. A espectrometria de ionização por electrospray (ESI-MS) foi realizada nos modos positivos e negativos, permitindo a detecção tanto de íons positivos quanto negativos, dependendo das características específicas das amostras analisadas.

3.9.RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As amostras foram previamente liofilizadas ou purificadas e solubilizadas em solventes deuterados, como clorofórmio ou água deuterada, para as análises. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) foram adquiridos utilizando espectrômetros Bruker AVIIIHD de 500 MHz, equipados com sondas BBFO+ SmartProbes. A aquisição dos dados foi realizada à temperatura ambiente, e todos os espectros foram processados e analisados no programa Mnova. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, referenciados em relação aos picos dos solventes, sendo δ (^1H) 7,26 ppm para CDCl_3 e δ (^1H) 4,79 ppm para D_2O .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE DE TRANSFERÊNCIA COMERCIAL (CTA₁)

O espectro de RMN de hidrogênio (^1H) obtido em (500 MHz) do composto CTA₁ (Figura. 6) foi analisado com o objetivo de confirmar a estrutura química obtida por meio da identificação dos sinais correspondentes aos diferentes tipos de prótons presentes na molécula. Para essa análise, foi utilizado o software MestReNova, empregado para o processamento e interpretação de espectros de RMN. O espectro foi calibrado com o sinal do solvente (CDCl_3) em 7,26 ppm.

A análise revelou um sinal em torno de 1,45 ppm, caracterizado como um tripleto, atribuído aos prótons (d), pertencentes a um grupo metila (CH_3). Observa-se também um sinal do tipo simpleto em torno de 1,6 ppm, atribuído aos prótons (a) e (b), pertencentes a dois grupos metila (CH_3) localizados em regiões da molécula onde não há acoplamento com prótons vizinhos. Além disso, há um quarteto em aproximadamente 4,5 ppm, correspondente aos prótons (c), que estão em um grupo

metileno (CH_2) acoplado com três hidrogênios vizinhos de um grupo metila. O próton do grupo ácido carboxílico ($-\text{COOH}$), que normalmente aparece como um singlete amplo entre 11 e 12 ppm, não é visível neste espectro, possivelmente devido à troca com traços de água no solvente CDCl_3 .

Com base na análise da multiplicidade dos sinais, das integrais e dos deslocamentos químicos, os dados obtidos confirmam a estrutura proposta para o CTA_1 . A presença de um tripeto em 1,45 ppm (próton d), um singlete em 1,6 ppm (prótons a e b), e um quarteto em 4,5 ppm (próton c) está em plena concordância com a estrutura esperada.

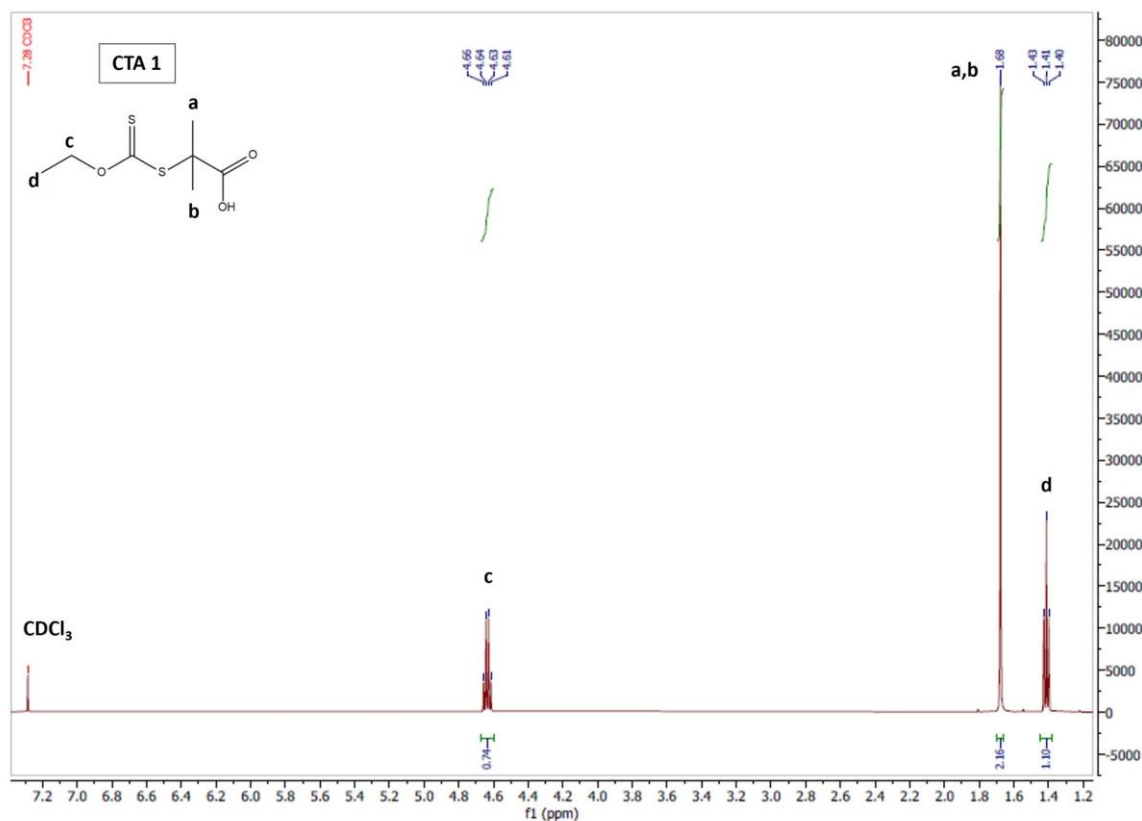


Figura 6 Espectro de ^1H -RMN do composto CTA_1

4.2. CARACTERIZAÇÃO DO AGENTE DE TRANFERÊNCIA CTA_2 E $\text{CTA}_2\text{-PFP}$

A síntese do agente de transferência CTA_2 foi validada por meio da obtenção de um espectro de RMN de hidrogênio (^1H), que evidenciou a formação do produto desejado com alta pureza (Rendimento 71%). A Figura 7 apresenta o espectro obtido em CDCl_3 , no qual é possível identificar os sinais característicos do composto alvo, sem a presença significativa de impurezas, o que reforça a eficiência do método sintético empregado.

No espectro, observa-se um tripeto em aproximadamente 1,30 ppm, atribuído ao grupo metila (d), acoplado a um grupo metileno vizinho. Em torno de 1,40 ppm, há um duplete referente ao grupo metila (a), que interage com um único próton vizinho, resultando na multiplicidade observada. Também é possível identificar um sinal em cerca de 2,10 ppm, que corresponde aos prótons dos grupos

metila da acetona (singlete), solvente utilizado durante a síntese. Apesar da aplicação de técnicas convencionais de remoção de solventes, vestígios de acetona ainda foram detectados.

Além disso, foram observados um quarteto em 4,16 ppm e um multipletto em 4,60 ppm, atribuídos aos prótons do grupos presentes em (b) e (c), respectivamente. Esses grupos estão próximos a heteroátomos (oxigênio e enxofre), o que justifica o deslocamento mais desprotegido no espectro. A multiplicidade de ambos os sinais sugere acoplamento com três hidrogênios vizinhos, coerente com a estrutura proposta para CTA₂.

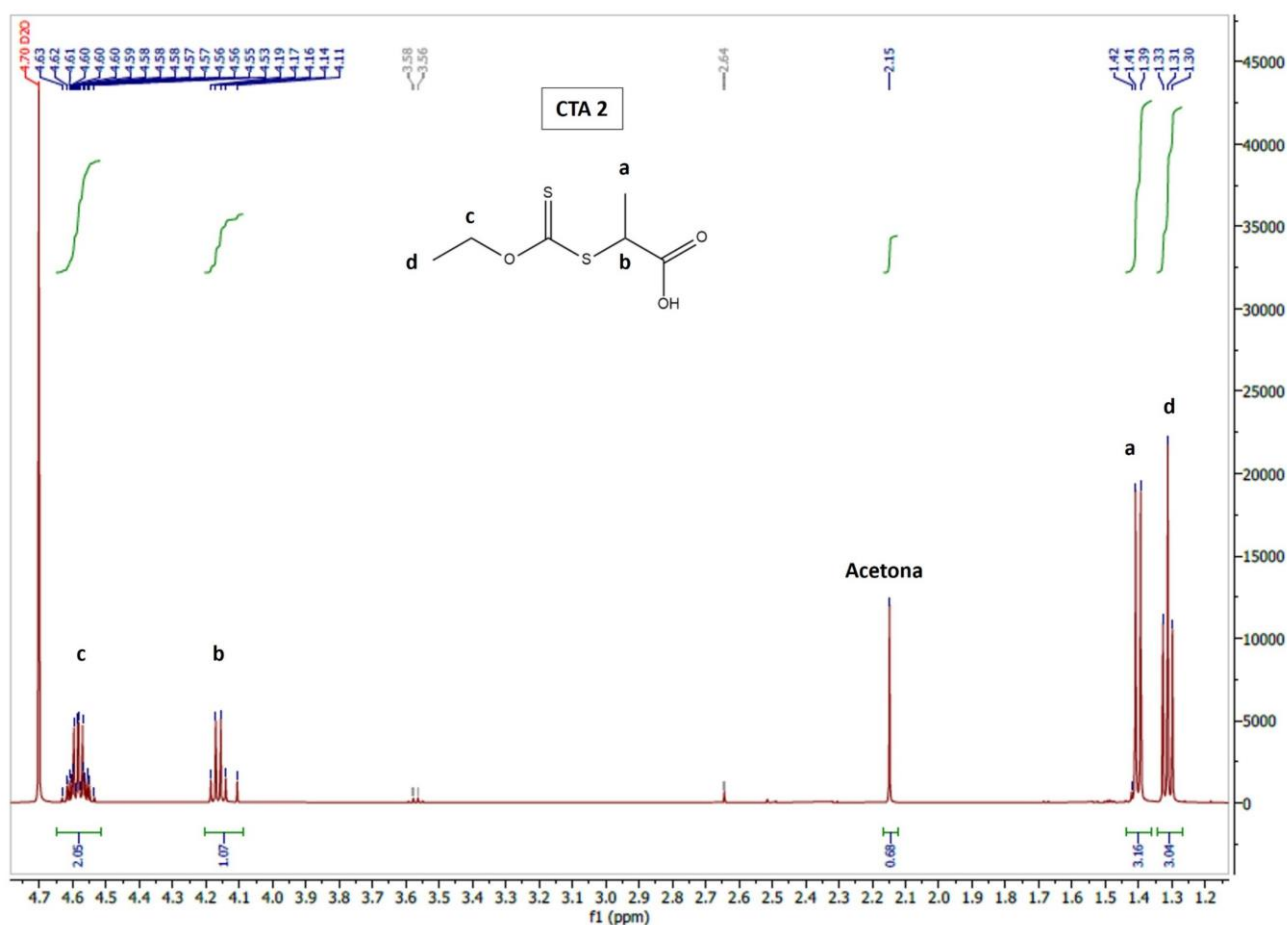


Figura 7 Espectro de ¹H-RMN do composto CTA₂

Além da caracterização estrutural por RMN de ¹H, a síntese do agente de transferência de cadeia CTA₂ foi confirmada por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) modo negativo, conforme mostrado na Figura 8. O espectro revelou um pico de maior intensidade em m/z 192,99 o qual foi atribuído ao íon [M - H]⁻, correspondente à forma desprotonada. A massa molecular

teórica do CTA₂ é de 194,0071 g mol⁻¹, e a formação do íon [M - H]⁻ com massa próxima de 193,0 confirma a presença da espécie molecular esperada.

Adicionalmente, observa-se no espectro um segundo pico significativo em m/z 387,0 que pode ser atribuído ao dímero desprotonado do composto, ou seja, [2M - H]⁻. A presença desse sinal sugere a tendência do CTA₂ em formar agregados em fase gasosa sob as condições da análise por ESI-MS, o que é comum em compostos com grupos funcionais polares, como ácidos carboxílicos e tióésteres, capazes de interações intermoleculares.

Portanto, os dados de espectrometria de massa confirmam a formação do produto esperado bem como a presença de espécies associadas (dímero), reforçando a caracterização e a identidade química do CTA₂. A combinação das análises por RMN e ESI-MS fornece evidências complementares e robustas para comprovar a eficácia do processo de síntese.

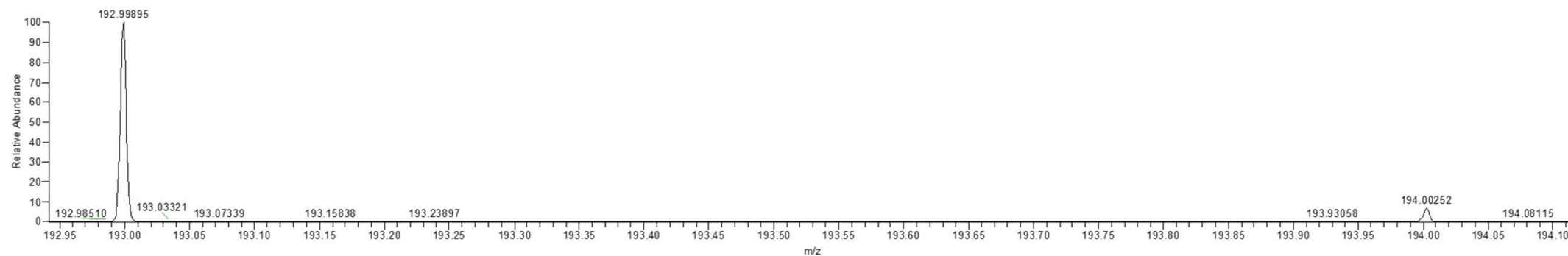
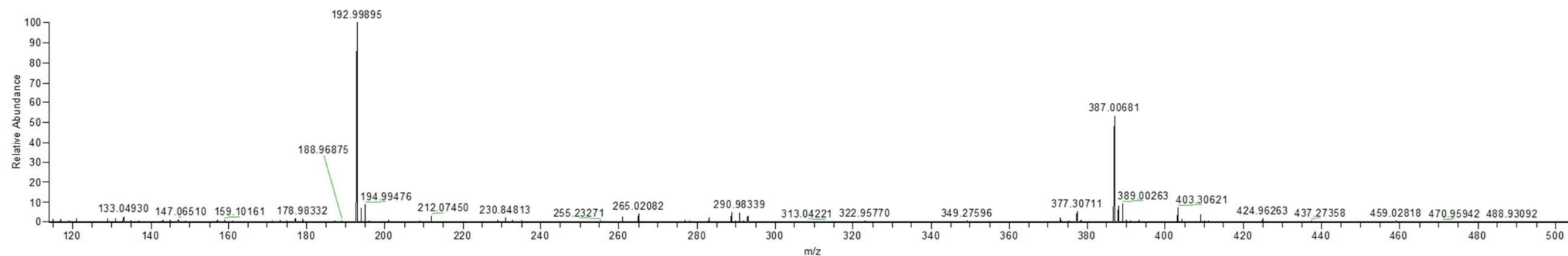


Figura 8 Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS, modo negativo) do composto CTA₂

A síntese do agente de transferência de cadeia ativado, denominado CTA-PFP₂ (rendimento 52%), a partir do CTA₂, foi confirmada por espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) em modo positivo, conforme ilustrado na Figura 9. O espectro revelou um pico principal em m/z 382,9790, que corresponde ao íon $[M + Na]^+$, resultado da adição de um cátion sódio à massa molecular do CTA-PFP₂. A massa molecular teórica do composto é 359,9912 g mol⁻¹, e a diferença observada é compatível com a massa do íon sódio ($Na^+ \approx 22,99$ u), indicando a presença do aduto sódico da molécula.

Um segundo pico de alta intensidade foi identificado em m/z 470,9771, que pode ser atribuído à formação do aduto $[M + Na + CH_3CN]^+$, ou seja, o produto monomérico associado simultaneamente a um cátion sódio e a uma molécula de acetonitrila. Essa hipótese é bastante plausível, considerando que a acetonitrila (CH₃CN) é um solvente comumente utilizado na diluição das amostras para análise por ESI-MS. Durante o processo de ionização, é comum que moléculas do solvente se associem ao analito, formando adutos detectáveis. A massa da molécula de acetonitrila é de aproximadamente 41 u, e sua adição ao aduto $[M + Na]^+$ ($382,98 + 41$) resulta em um valor muito próximo ao observado experimentalmente em 470,98, reforçando essa atribuição.

Além desses dois picos principais, o espectro apresenta sinais adicionais que corroboram a estrutura e a fragmentação esperada do composto. O pico em m/z 198,9852 pode ser atribuído a um fragmento contendo o grupo PFP (C₆HF₅O), evidenciando a presença da unidade ativadora no CTA₂-PFP. O sinal em m/z 333,0247 pode estar relacionado à perda de parte da cadeia lateral ou de grupos funcionais da molécula, formando fragmentos estáveis durante a ionização.

Na parte inferior da figura, o espectro de alta resolução confirma a precisão do sinal em m/z 382,9790, com correspondência exata com a fórmula C₁₃H₁₃F₅NaO₅S, correspondente ao íon $[M + Na]^+$. A combinação desses dados confirma com segurança a síntese bem-sucedida do CTA-PFP₂.

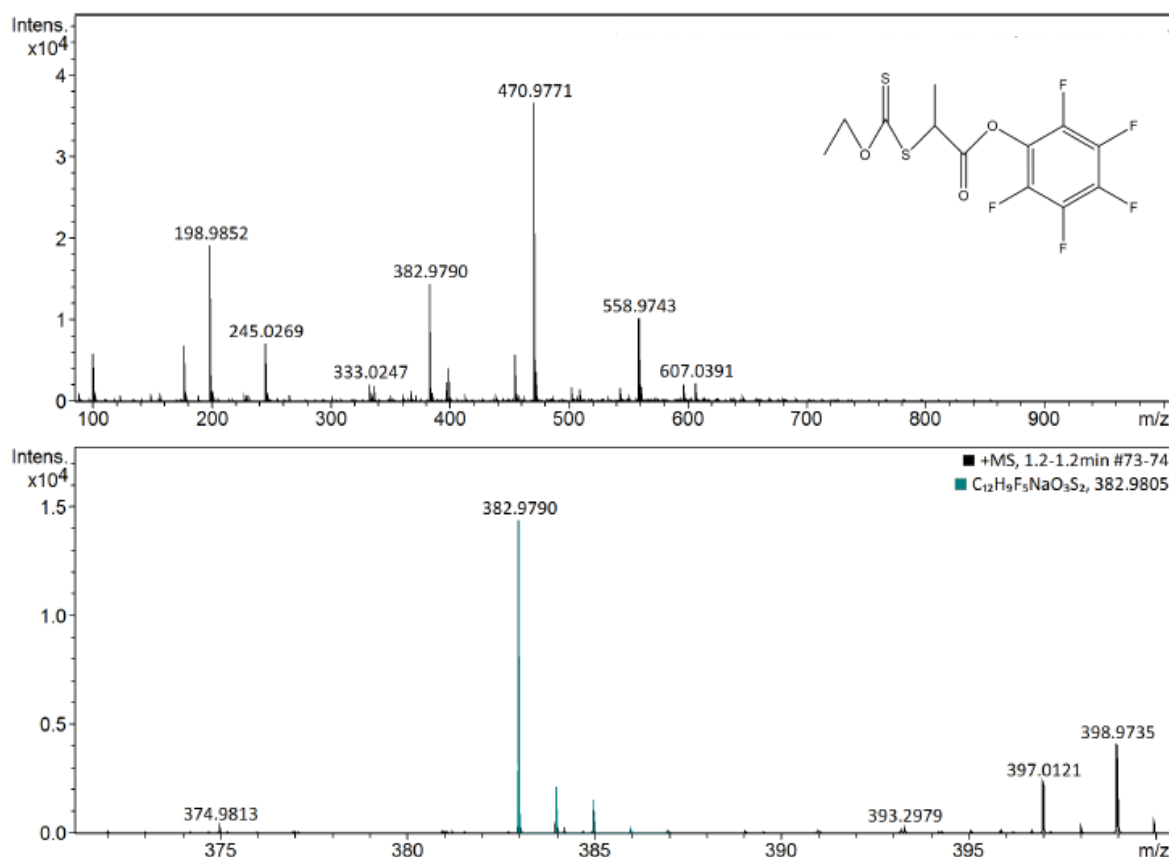


Figura 9 Espectro de massas de alta resolução (ESI-MS, modo positivo) do composto CTA-PFP₂.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL_{A1} VIA ROTA (A)

O sistema híbrido SF-PNVCL_(A1) foi obtido a partir da metodologia A, na qual o agente de transferência de cadeia comercial (CTA₁) foi previamente acoplado à fibroína por meio de uma reação de esterificação com os grupos hidroxila presentes em sua estrutura. Essa funcionalização permitiu a posterior realização da polimerização controlada via RAFT, resultando na formação do sistema híbrido. Para a caracterização e confirmação da polimerização e da efetiva formação do material SF-PNVCL, foram empregadas diversas técnicas analíticas complementares, descritas nas seções a seguir.

4.3.1. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DO SISTEMA SF-PNVCL_{A1}

A síntese do material híbrido SF-PNVCL_(A1) foi analisada primeiramente por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), conforme mostrado na Figura 10. Os espectros obtidos para o polímero puro (PNVCL), para a fibroína de seda (SF) e para o híbrido SF-PNVCL_{A1}

foram comparados a fim de identificar os principais grupos funcionais presentes em cada sistema e avaliar a eficácia do crescimento da cadeia do polímero na proteína.

No espectro da fibroína (SF), destaca-se uma banda intensa e bem definida em $\sim 1520\text{ cm}^{-1}$, atribuída à vibração de flexão da ligação N–H, característica fundamental da estrutura peptídica da proteína. Essa banda representa uma assinatura espectral exclusiva da SF dentro do intervalo analisado, uma vez que não está presente no espectro do PNVCL puro. Isso permite utilizá-la como um marcador direto da presença da proteína nos sistemas analisados.

No caso do PNVCL, as bandas dominantes estão localizadas em 2921 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de estiramento C–H dos grupos metila e metileno. O polímero não apresenta sinal significativo em 1520 cm^{-1} , o que reforça o fato de que essa absorção é exclusivamente relacionada à proteína.

Já no espectro do híbrido SF-PNVCL_{A1}, observa-se claramente a presença das bandas de 2921 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} , confirmando a incorporação do PNVCL. Mais importante, a manutenção da banda em $\sim 1520\text{ cm}^{-1}$ no híbrido comprova a presença da fibroína de seda na estrutura final. A persistência dessa banda, ausente no PNVCL puro, é uma evidência direta da preservação da matriz proteica e, ao mesmo tempo, da formação bem-sucedida do material híbrido.

A presença simultânea dos sinais vibracionais característicos tanto da SF quanto do PNVCL no espectro do híbrido confirma que a polimerização ocorreu a partir da superfície da proteína, sem degradação significativa da sua estrutura. A banda em 1520 cm^{-1} , portanto, desempenha um papel crucial na validação espectroscópica da graftização, servindo como um marcador confiável da incorporação da fibroína na composição do SF-PNVCL_{A1}.

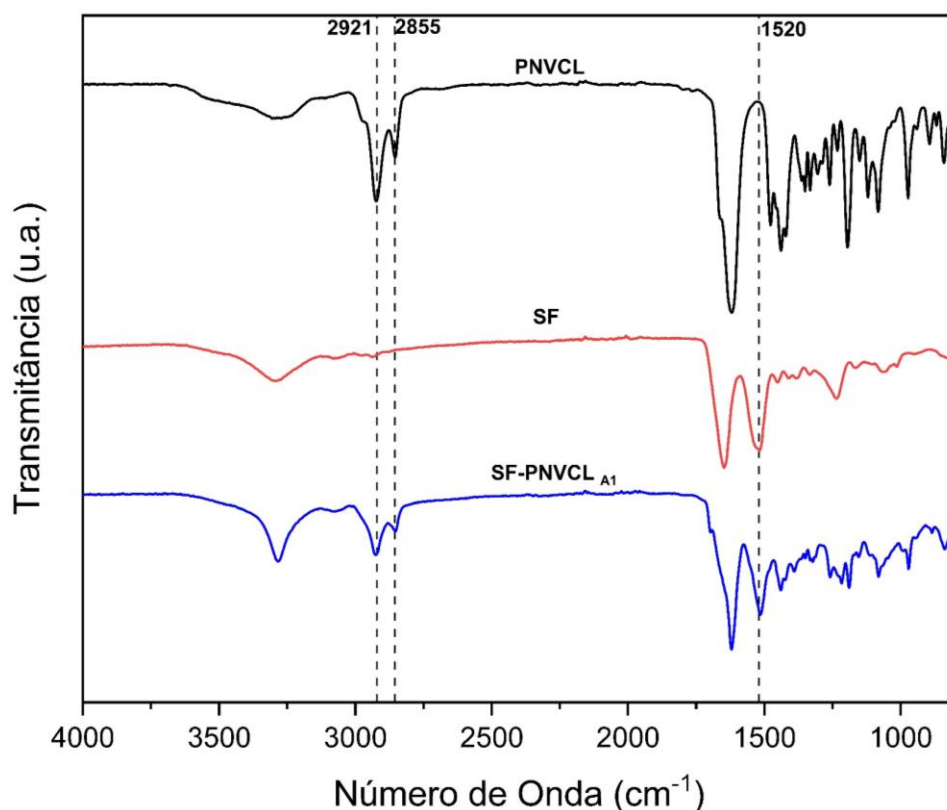


Figura 10 Espectros de FTIR das amostras de PNVL, fibroína de seda (SF) e do híbrido SF-PNVL_{A1}

4.3.2. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO SISTEMA SF-PNVL_{A1}

A estabilidade térmica do material híbrido foi investigada por meio de análise termogravimétrica (TGA) e sua derivada (DTG), conforme apresentado na Figura 11, respectivamente. A curva azul representa a TGA (perda de massa em função da temperatura) e a curva preta corresponde à DTG, que mostra a velocidade da perda de massa (%/°C) e permite identificar com maior precisão os eventos térmicos que ocorrem durante o aquecimento.

A curva de TGA revela que a degradação do material ocorre em quatro etapas distintas, mas é na DTG que essas transições se tornam mais evidentes e bem resolvidas. A primeira inflexão da DTG, com um pico largo e de baixa intensidade abaixo de 150 °C, corresponde à eliminação de água adsorvida e de solventes residuais presentes na matriz do híbrido. Esse evento representa um processo físico, sem quebra de ligações covalentes significativas, refletindo a natureza higroscópica da fibroína e do PNVL.

Na faixa de 150 °C a 300 °C, a DTG exibe dois picos sobrepostos de baixa a moderada intensidade, que indicam degradações parciais de grupos laterais ou cadeias curtas. Esses eventos podem estar associados à clivagem de grupos éster formados na funcionalização da proteína com o CTA, bem como à decomposição inicial de ramificações do PNVL enxertado.

O evento mais importante é observado na DTG como um pico intenso e bem definido em torno de 420 °C, o que corresponde à principal etapa de degradação do material híbrido. Esse pico marca a ruptura das cadeias principais tanto da fibroína quanto do polímero PNVCL, indicando que a estrutura do material entra em colapso térmico. O pico estreito e bem definido sugere uma degradação rápida e concentrada, característica de materiais com estrutura homogênea ou compatível, o que reforça a ideia de que o enxerto do PNVCL sobre a SF foi eficiente e gerou um sistema integrado.

Após esse ponto, entre 450 °C e 600 °C, observa-se na DTG uma queda abrupta na taxa de perda de massa, sem novos picos, o que indica a degradação residual e carbonização do material. Esse comportamento é típico de resíduos ricos em carbono que sofrem combustão lenta ou se estabilizam como resíduos carbonáceos.

Portanto, a análise da DTG, além de confirmar os múltiplos estágios de degradação identificados pela TGA, oferece uma visão mais refinada dos mecanismos térmicos envolvidos, permitindo correlacionar diretamente os picos com etapas específicas da decomposição dos componentes do híbrido. A presença de um pico principal em torno de 420 °C, bem isolado, evidencia uma boa estabilidade térmica até essa faixa de temperatura.

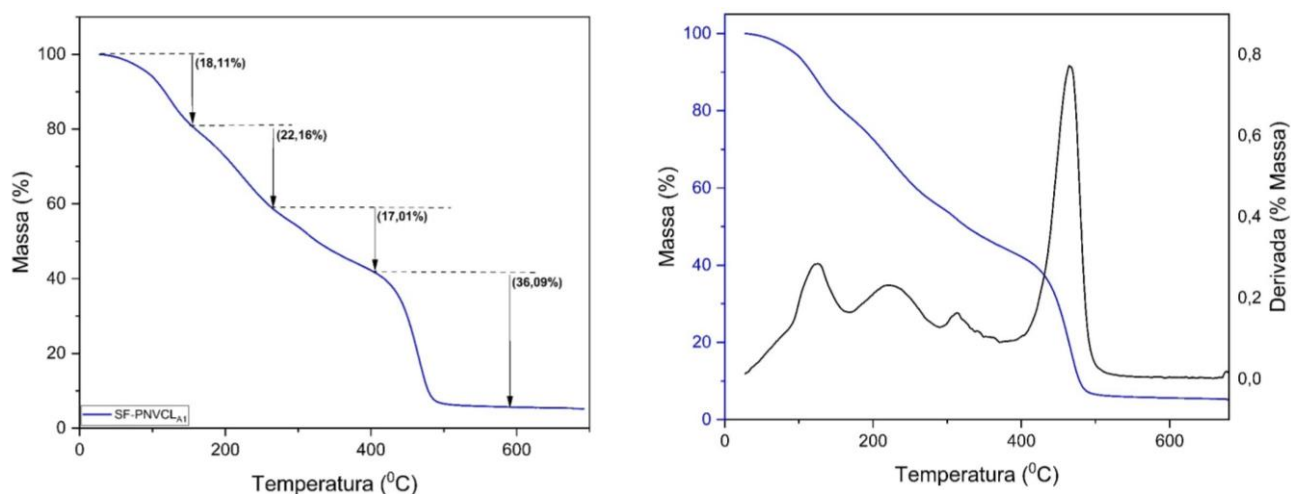


Figura 11 Curva de análise termogravimétrica (TGA) e (DTG) para o material híbrido SF-PNVCL_{A1}

A comparação entre os perfis térmicos da fibroína de seda (SF), do polímero PNVCL e do material híbrido SF-PNVCL_{A1} é apresentada na Figura 12. A curva de perda de massa em função da temperatura permite avaliar a estabilidade térmica individual dos componentes e do sistema híbrido formado a partir da graftização do PNVCL na matriz de SF.

O material híbrido SF-PNVCL_{A1} exibe um perfil intermediário, com características combinadas dos dois componentes. Observa-se que o início da degradação é antecipado, em torno de 100–150 °C, indicando a eliminação de umidade e resíduos voláteis, como observado também nos

sistemas anteriores. A curva de TGA do híbrido revela uma perda de massa progressiva, mas com uma transição acentuada entre 350 °C e 450 °C, semelhante à observada para o PNVCL. Isso indica que o enxerto do polímero sobre a fibroína confere ao sistema uma estabilidade térmica superior à da SF pura, aproximando-se da estabilidade observada no PNVCL, porém mantendo as características de decomposição em múltiplas etapas da proteína.

Essa diferença no comportamento térmico corrobora com os dados espectroscópicos que a estrutura híbrida foi obtida, conforme previsto, resultando em um material com perfil térmico distinto e mais estável do que a fibroína isolada. O SF-PNVCL_{A1} combina a resistência térmica do PNVCL com a complexidade estrutural da SF.

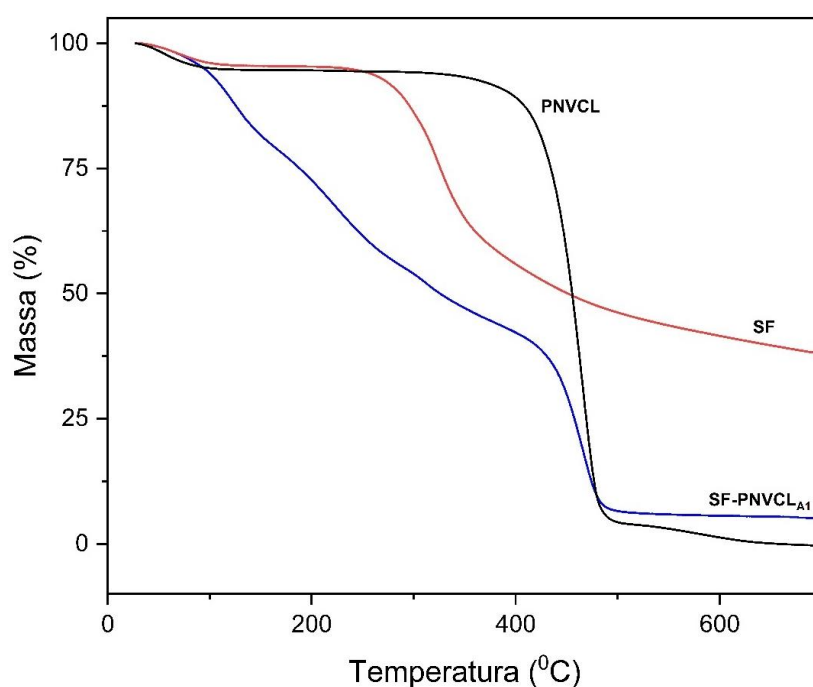


Figura 12 Curvas de análise termogravimétrica (TGA) comparando a estabilidade térmica do polímero PNVCL, da fibroína de seda (SF) e do material híbrido SF-PNVCL_{A1}

4.3.3. ANÁLISE DE DIFRAÇÃO DE RAIOS-X EM PÓ DO SISTEMA SF-PNVCL_{A1}

A caracterização estrutural dos materiais foi realizada por difração de raios X por pó (PXRD), como mostrado na Figura 13, com o objetivo de investigar o grau de cristalinidade e as alterações estruturais promovidas pela graftização do polímero PNVCL na fibroína de seda (SF). O difratograma da fibroína pura (SF), representado pela curva vermelha, mostra um pico largo e de baixa intensidade entre 18° e 22° (2θ), característico de materiais semicristalinos. Esse padrão é típico de proteínas como a fibroína, que apresentam estruturas β-lamelares parcialmente organizadas e regiões amorfas desordenadas. A baixa intensidade e a largura do pico indicam uma cristalinidade limitada, o que é esperado devido à natureza complexa e flexível das cadeias polipeptídicas.

O PNVCL (curva preta) exibe um padrão difratométrico com dois picos principais, um mais intenso centrado em $\sim 13^\circ$ (2θ) e outro em $\sim 21^\circ$ (2θ), o que indica a presença de um grau de cristalinidade maior em relação à fibroína. Esses picos são atribuídos ao empacotamento regular parcial das cadeias poliméricas de PNVCL, principalmente em função de interações intermoleculares e ordenamento local. Embora o PNVCL seja majoritariamente amorfo, esses dois picos sugerem regiões semi-organizadas em sua estrutura, que podem influenciar diretamente nas propriedades físicas do material, como rigidez e estabilidade térmica.

O híbrido SF-PNVCL_{A1} (curva azul) apresenta um perfil que combina características dos dois materiais. Observa-se uma possível presença dos picos do PNVCL, porém com intensidades suavizadas e sobrepostos à banda larga da fibroína. Isso indica que a estrutura cristalina do PNVCL foi parcialmente preservada no híbrido, mas que a graftização sobre a matriz proteica levou a uma distribuição mais dispersa e menos ordenada das regiões cristalinas, provavelmente devido à interferência das cadeias peptídicas da SF.

A presença simultânea das assinaturas difratométricas da SF e do PNVCL confirma que houve formação do material híbrido sem perda completa da organização de ambos os componentes. A incorporação do polímero à matriz proteica promoveu uma interação compatível, que resultou em um perfil semicristalino híbrido, com possível melhoria nas propriedades físico-químicas do material final.

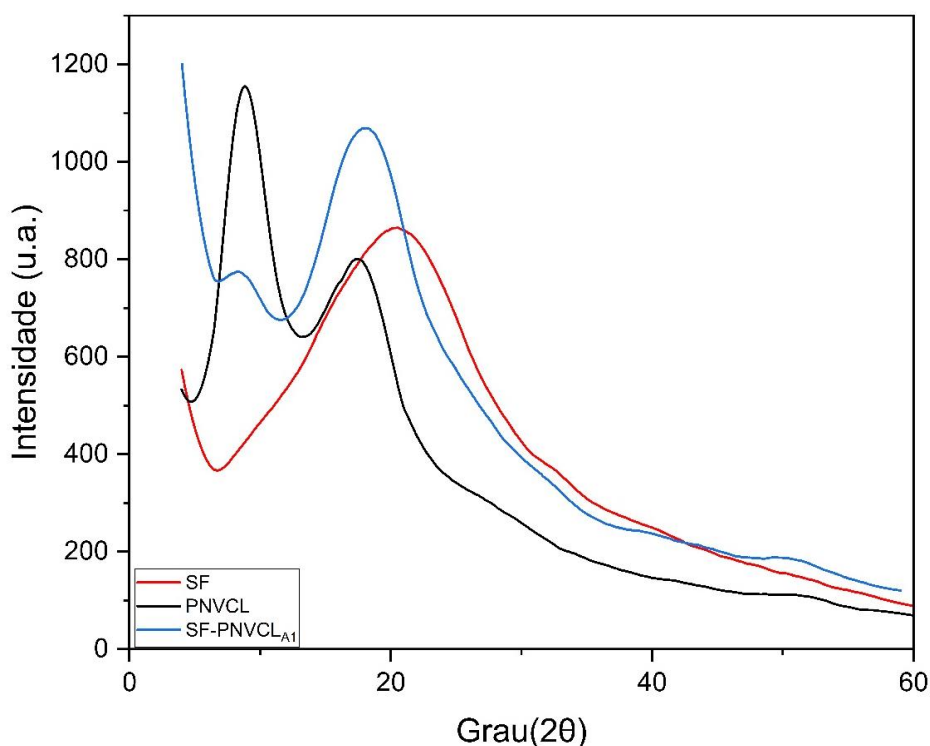


Figura 13 Difratogramas de raios X por pó (PXRD) das amostras de SF, PNVCL e do híbrido SF-PNVCL_{A1}

4.3.4. ESTUDO DA TRANSIÇÃO DE FASE DO SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL_{A1}

A Figura 14 apresenta o comportamento visual do sistema híbrido SF-PNVCL sem curcumina em duas temperaturas distintas, com o objetivo de evidenciar sua termorresponsividade. Na imagem 32A, o sistema encontra-se à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$), apresentando-se como uma suspensão translúcida e homogênea.

Na imagem 14B, o sistema é submetido a uma temperatura superior a 40°C , ultrapassando a temperatura crítica de solubilidade inferior (LCST) do PNVCL. Nessa condição, observa-se uma turvação da suspensão, reflexo da transição de fase do polímero para seu estado hidrofóbico, o que promove agregação das partículas e alteração da aparência do sistema. A termorresponsividade observada no material híbrido SF-PNVCL representa uma característica vantajosa em ambientes biológicos, pois permite a liberação controlada de fármacos em resposta a variações de temperatura — seja por estímulos externos induzidos ou devido ao fato de que regiões tumorais geralmente apresentam temperatura ligeiramente mais elevada em função de processos inflamatórios locais. Esse comportamento favorece a seletividade terapêutica, reduzindo efeitos colaterais em células saudáveis.

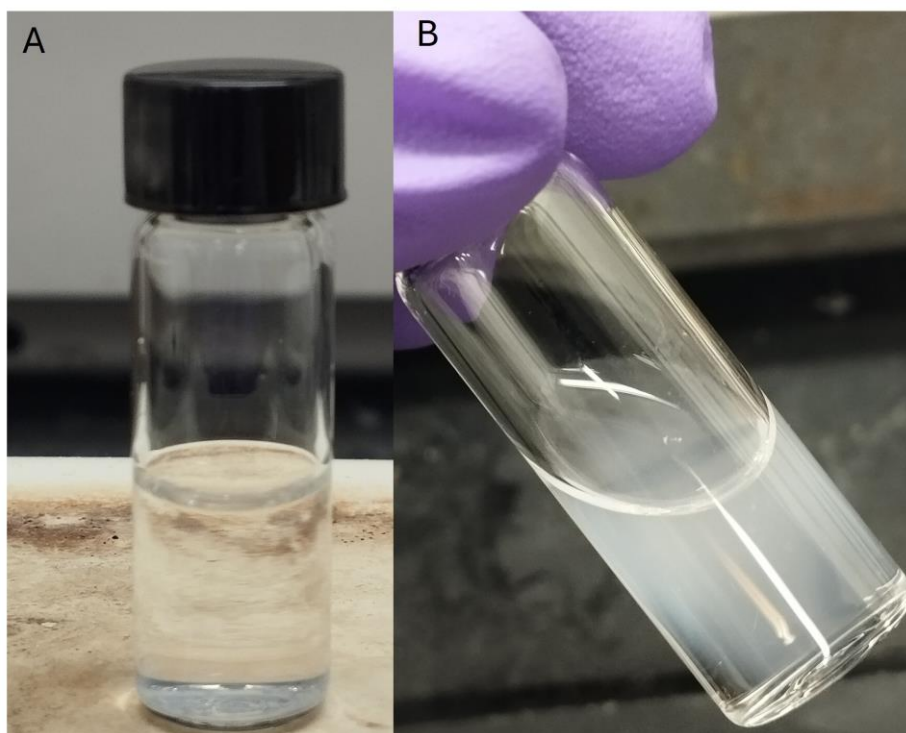


Figura 14 Transição de fase observada para o sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}. 14A sistema em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). (14B) Formação de turbidez característica após aquecimento a temperatura acima da LCST ($>40^\circ\text{C}$), indicando a transição de fase.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL_{B2} VIA ROTA (B)

A Rota B foi empregada para a síntese dos sistemas híbridos, se baseia na ativação prévia dos agentes de transferência de cadeia (CTA₂) com PFP. Essa estratégia visa aumentar a reatividade eletrofílica dos CTAs, tornando-os mais suscetíveis à reação com os grupos nucleofílicos presentes na fibroína de seda, o que favorece uma incorporação mais eficiente do agente à matriz proteica e representando uma abordagem alternativa à Rota A. O sistema SF-PNVCL_{B2} corresponde ao agente de transferência sintetizado em laboratório e posteriormente ativado com PFP.

4.4.1. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DO SISTEMA SF-PNVCL_{B2}

Para confirmar a incorporação do polímero à fibroína e a formação do material híbrido, foi empregada a técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), conforme mostrado na Figura 15. Os espectros dos materiais de partida — PNVCL e fibroína (SF) — foram comparados ao do material híbrido SF-PNVCL_{B2}, permitindo identificar os principais grupos funcionais presentes em cada sistema e avaliar a eficiência da graftização.

No espectro da fibroína (SF), destaca-se a banda em aproximadamente 1521 cm⁻¹, atribuída à vibração de flexão da ligação N–H (amida II), característica da estrutura peptídica da proteína. Essa banda, ausente no espectro do PNVCL, atua como um marcador direto da presença da proteína no material híbrido. O espectro do PNVCL exibe bandas intensas em 2926 cm⁻¹ e 2853 cm⁻¹, atribuídas aos estiramentos C–H alifáticos. Essas bandas são características da estrutura polimérica e não aparecem isoladamente na proteína. Já no espectro do híbrido SF-PNVCL_{B2}, observam-se simultaneamente as bandas de ambos os materiais, com destaque para as bandas de C–H do PNVCL (2926 e 2853 cm⁻¹) e a persistência da banda em ~1521 cm⁻¹, associada à fibroína. A coexistência desses sinais comprova que o PNVCL foi efetivamente enxertado sobre a proteína, sem degradação significativa da matriz peptídica.

A análise espectroscópica confirma, portanto, que a polimerização foi bem-sucedida a partir da superfície funcionalizada da fibroína, e que a estratégia baseada no uso do CTA sintetizado e ativado com PFP em laboratório permitiu a formação de um sistema híbrido.

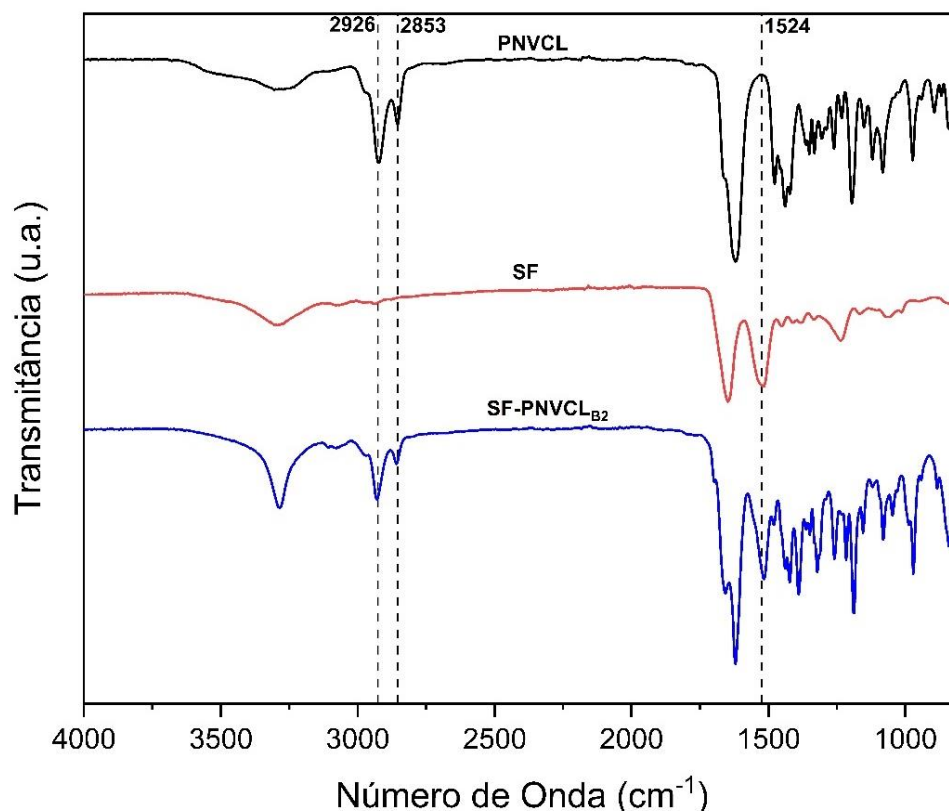


Figura 15 Espectros de FTIR das amostras de PNVCL, fibroína de seda (SF) e do híbrido SF-PNVCL_{B2}

4.4.2. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO SISTEMA SF-PNVCL_{B2}

A estabilidade térmica do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2} foi avaliada por meio de análise termogravimétrica (TGA) e sua derivada (DTG), cujos resultados são apresentados na Figura 16. A curva de TGA revela que o material apresenta múltiplas etapas de degradação térmica. A primeira perda de massa, de aproximadamente 3,84%, ocorre abaixo de 150 °C e pode ser atribuída à eliminação de água adsorvida ou solventes residuais presentes na amostra, o que é comum em materiais proteicos e híbridos. A principal etapa de degradação ocorre entre 200 e 350 °C, com uma perda de 61,69% da massa total, sendo atribuída à decomposição térmica tanto das cadeias polipeptídicas da fibroína quanto das cadeias do polímero PNVCL, resultando na quebra de ligações covalentes e na desestruturação da rede híbrida. Em seguida, observa-se uma perda adicional de 18,32% entre 350 e 500 °C, relacionada à degradação de resíduos carbonizados e intermediários parcialmente oxidados. Por fim, uma pequena perda de 9,42% ocorre acima de 500 °C, indicando a degradação de resíduos carbonáceos mais estáveis e a formação de material residual refratário.

A curva de DTG permite identificar com maior precisão os eventos térmicos. O pico de máxima degradação ocorre por volta de 220 °C, representando o ponto de maior taxa de perda de massa. Esse valor é ligeiramente inferior ao observado para a fibroína pura, o que sugere que a presença do PNVCL alterou o perfil térmico do sistema, conferindo-lhe uma nova organização estrutural. Além do pico principal, a DTG apresenta outros eventos secundários distribuídos ao longo da faixa de temperatura, o que evidencia a complexidade térmica do material híbrido, caracterizada por múltiplos domínios com diferentes graus de estabilidade.

Os dados de TGA e DTG indicam que o sistema SF-PNVCL_{B2} apresenta um comportamento térmico característico de materiais híbridos avançados, com degradação gradual e formação de resíduos estáveis em altas temperaturas. A modificação da matriz proteica com o polímero sintético, realizada por meio de polimerização iniciada com o CTA sintetizado em laboratório não comprometeu a estabilidade térmica da fibroína. Pelo contrário, resultou em um novo perfil térmico, reafirmando o sucesso da síntese e a viabilidade do material para aplicações que exigem desempenho térmico controlado.

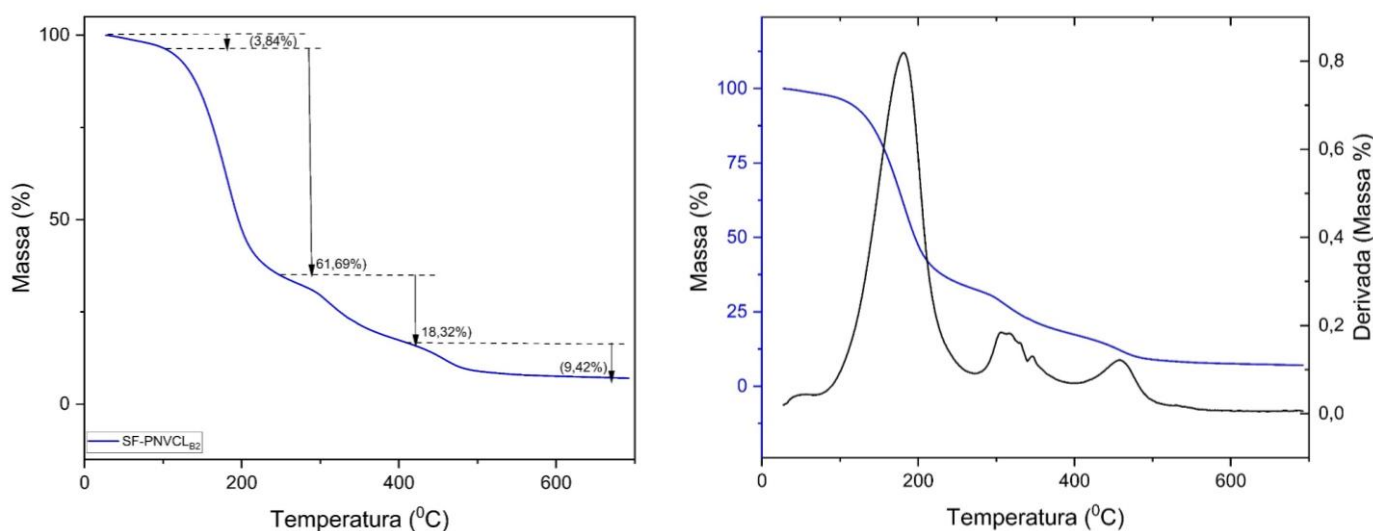


Figura 16 Curva termogravimétrica (TGA) e (DTG) do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}

O sistema híbrido SF-PNVCL_{B2} (curva azul) (Figura 17) apresenta um comportamento intermediário entre os dois materiais de origem. A curva revela múltiplas etapas de perda de massa, começando ainda abaixo de 150 °C e se estendendo até aproximadamente 600 °C. Esse perfil confirma a presença de duas fases térmicas distintas, correspondentes à matriz proteica (SF) e ao polímero sintético (PNVCL), indicando que o processo foi bem-sucedido e que houve incorporação efetiva do PNVCL à estrutura da fibroína. A modificação conferiu ao sistema uma nova estabilidade térmica,

sem suprimir as características fundamentais da proteína, como observado na preservação de eventos térmicos múltiplos.

Além disso, a ausência de um único pico abrupto no híbrido, como ocorre no PNVCL puro, sugere que a graftização alterou o mecanismo de degradação térmica do polímero. Essa mudança pode ser atribuída à interação entre o PNVCL e a matriz peptídica, que promove a formação de uma rede híbrida mais complexa, resultando em uma decomposição progressiva, em vez de um evento térmico único e definido. Essa distribuição térmica mais ampla também pode indicar que o polímero está distribuído de forma não uniforme ou está ligado covalentemente à proteína, dificultando sua liberação térmica direta.

A presença de uma fase inicial de degradação relacionada à fibroína e outra posterior, compatível com o comportamento térmico do PNVCL, reforça a interpretação de que o material híbrido é composto por domínios estruturais distintos, porém integrados, cujas propriedades térmicas são complementares. Portanto, a Figura 17 confirma que o sistema SF-PNVCL_{B2} combina as propriedades térmicas de seus constituintes, resultando em um material híbrido com perfil térmico distinto e estabilidade em múltiplas faixas de temperatura.

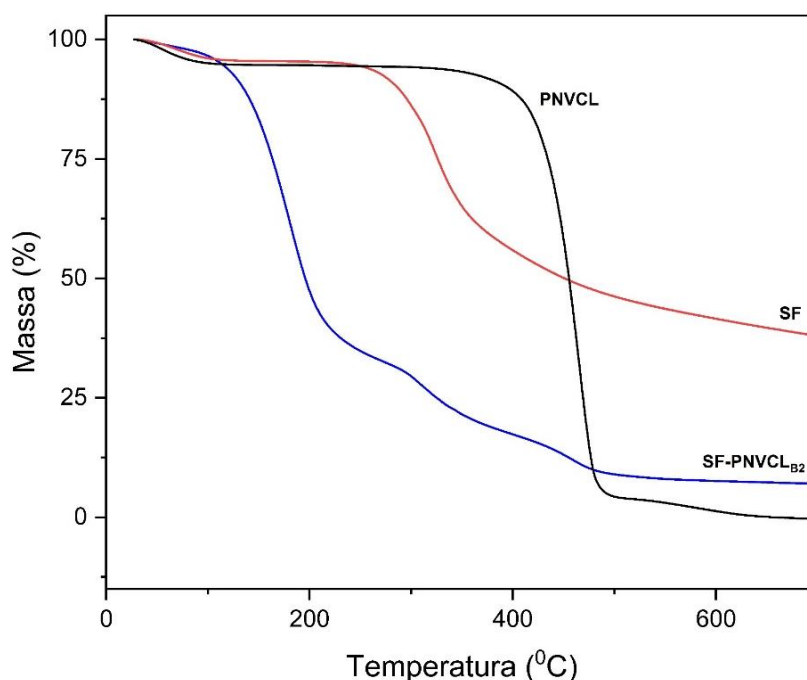


Figura 17 Curvas termogravimétricas (TGA) comparativas dos materiais puros (fibroína – SF, PNVCL) e do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}

4.4.3. ANÁLISE DA DIFRAÇÃO RAIOS-X EM PÓ DO SISTEMA SF-PNVCL_{B2}

A Figura 18 apresenta os padrões de difração de raios X (PXRD) dos materiais fibroína (SF), PNVCL e do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}, permitindo a avaliação da organização estrutural e do

grau de cristalinidade dos constituintes puros e do material final. A análise revela diferenças importantes no padrão difratométrico entre os componentes isolados e o sistema híbrido, evidenciando a modificação estrutural decorrente da formação do novo material.

O padrão da fibroína (curva vermelha) apresenta um pico largo centrado em torno de $2\theta \approx 20^\circ$, típico de materiais semi-cristalinos com predominância de fase amorfa, como é comum na fibroína regenerada. Esse pico está relacionado à presença de estruturas secundárias organizadas em folha- β , mas com baixa ordem de empacotamento, o que confere um perfil de difração pouco definido.

O polímero PNVCL (curva preta), por sua vez, também apresenta padrão difuso com dois picos amplos, localizados aproximadamente em $2\theta \approx 12^\circ$ e 21° , indicando uma estrutura predominantemente amorfa, com pequenas regiões de ordem.

Já o padrão de difração do sistema SF-PNVCL_{B2} (curva azul) mostra um perfil distinto, com aumento significativo da intensidade dos picos e maior definição das regiões de difração, particularmente nas faixas de $2\theta \approx 12^\circ$, 20° e 24° . Esse comportamento sugere a formação de um material com maior grau de organização supramolecular, possivelmente devido à interação entre as cadeias da fibroína e do PNVCL.

A intensificação e ligeira separação dos picos no híbrido em relação aos seus precursores também podem estar associadas à formação de domínios interpenetrantes entre o polímero e a matriz proteica, o que favorece o empacotamento cooperativo das cadeias.

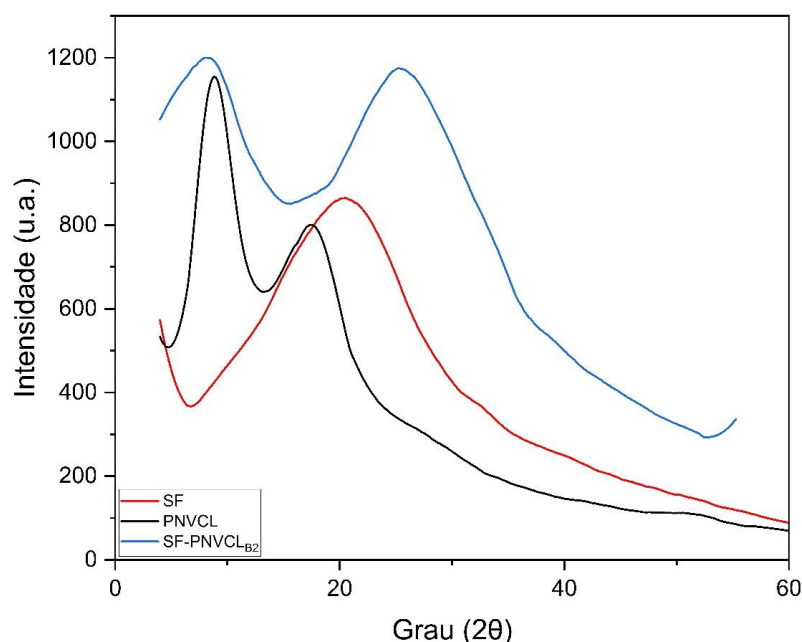


Figura 18 Difratogramas de raios X (PXRD) da fibroína (SF), do polímero puro (PNVCL) e do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}

4.4.4. TRANSIÇÃO DE FASE DO SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL_{B2}

A Figura 19 ilustra o comportamento termorresponsivo do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}, evidenciando visualmente a transição de fase típica de materiais com ponto crítico inferior de solução (LCST). No frasco A, o sistema está em temperatura ambiente, abaixo da LCST, apresentando-se como uma solução clara e homogênea, o que indica que as cadeias poliméricas estão solúveis e bem dispersas no meio aquoso. Já nos frascos B, C e D, a temperatura foi elevada para acima da LCST, nas concentrações de 1,25 mg mL⁻¹, 2,5 mg mL⁻¹ e 5 mg mL⁻¹, respectivamente. Nesses casos, observa-se a formação de uma fase turva e a agregação do material, reflexo da transição de um estado hidrofílico para hidrofóbico das cadeias do PNVCL. O efeito é mais pronunciado nas amostras de maior concentração, especialmente em D, onde ocorre a formação de um corpo gelatinoso sedimentado, sugerindo a presença de uma rede mais densa e estruturada. Esses resultados confirmam que o material híbrido mantém sua propriedade termorresponsiva mesmo após a funcionalização da fibroína.

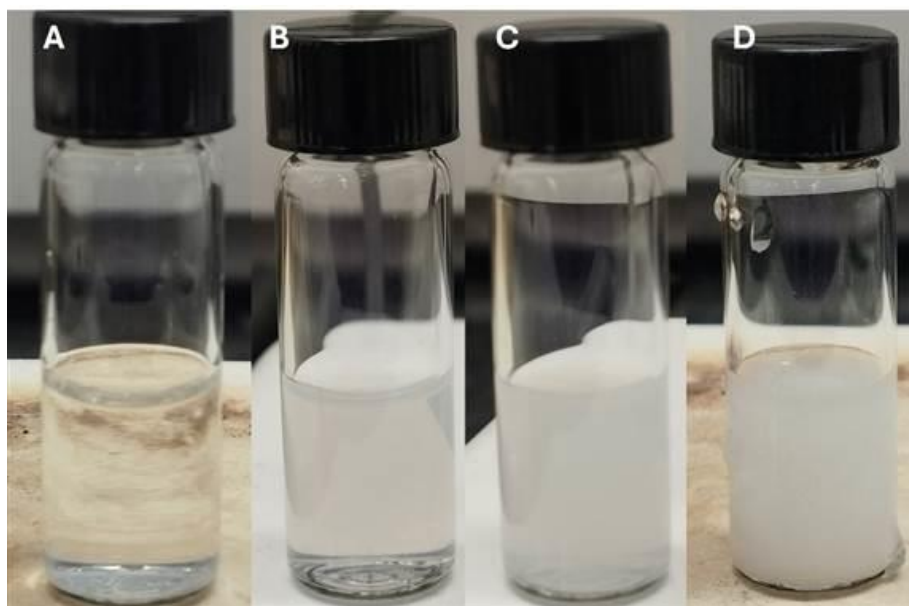


Figura 19 Imagem representativa do comportamento termorresponsivo do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}. (A) Solução clara e homogênea abaixo da temperatura crítica de solução inferior (LCST), em temperatura ambiente. (B), (C) e (D) mostram o sistema acima da LCST nas concentrações de 1,25, 2,5 e 5 mg mL⁻¹.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo demonstram que ambas as rotas de síntese adotadas — Rota A, com CTA₁ comercial, e Rota B, com CTA₂ sintetizado e ativado em laboratório — foram bem-sucedidas na obtenção de sistemas híbridos SF-PNVCL por meio da polimerização RAFT.

Ainda que apresentem diferentes estratégias de funcionalização, não foram observadas diferenças significativas nos resultados finais em termos de eficiência da reação ou formação do híbrido, o que reforça a viabilidade de ambas as abordagens. Cada rota apresenta características operacionais distintas, que podem ser exploradas de forma estratégica conforme o contexto experimental ou a aplicação desejada.

O mais relevante, contudo, é que este trabalho descreve, pela primeira vez na literatura, a obtenção de um sistema híbrido baseado em fibroína de seda (SF) e PNVCL com sucesso, resultando na formação de um material termorresponsivo.

O próximo capítulo abordará a preparação das nanopartículas a partir dos sistemas híbridos obtidos, com foco na síntese e caracterização de nanopartículas termorresponsivas.

CAPÍTULO 4 – PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS TERMOSENSÍVEIS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL COMO SISTEMA CARREADOR DE AGENTES TERAPÊUTICOS

1. INTRODUÇÃO

Neste capítulo, são descritos os procedimentos de preparação, caracterização e avaliação funcional de nanopartículas baseadas em fibroína de seda (SF) e nos sistemas híbridos SF–PNVCL previamente obtidos. A estratégia adotada tem como foco o desenvolvimento de nanopartículas termossensíveis com potencial aplicação como sistemas carreadores de agentes terapêuticos.

As nanopartículas foram obtidas pelo método de co-solvente, e suas propriedades físico-químicas foram avaliadas. A curcumina foi utilizada como molécula bioativa, a eficiência de encapsulação e o perfil de liberação da curcumina foram avaliados para as formulações baseadas em SF–PNVCL. Por fim, as nanopartículas brancas e carregadas com curcumina foram submetidas a ensaios *in vitro* frente a diferentes linhagens celulares, com o objetivo de verificar sua viabilidade como sistemas de liberação controlada.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterização de nanopartículas de fibroína
- Síntese e caracterização de nanopartículas de SF-PNVCL
- Avaliação das propriedades termorresponsivas das nanopartículas de fibroína e híbridas;
- Determinação do perfil de encapsulação da curcumina nos sistemas híbridos e perfil de liberação.
- Análise da citotoxicidade das nanopartículas híbridas em células saudáveis (MRC-5) e tumorais (4T1).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes e soluções empregados neste estudo foram utilizados conforme fornecidos, sem necessidade de purificação adicional, e apresentavam alto grau de pureza. A curcumina com alto

grau de pureza ($\geq 95\%$) foi adquirida da Sigma-Aldrich e utilizada tanto na construção das curvas de calibração quanto na preparação das nanopartículas carregadas, sendo previamente solubilizada em acetona grau HPLC (Fischer Chemical). A fibroína de seda (SF) e os sistemas híbridos SF-PNVCL foram dissolvidos em tampão fosfato (PBS, pH 7,4; 10 mM), preparado com água ultrapura (Milli-Q, Millipore).

A encapsulação da curcumina foi realizada pelo método co-solvente, utilizando como fase orgânica a acetona HPLC. O metanol (99%, Thermo Scientific) foi utilizado como solvente extrator nas análises quantitativas por UV-Vis. Nos ensaios de liberação, as nanopartículas foram acondicionadas em tubos de diálise com membranas de 3,5 kDa (Spectra/Por®) e dialisadas em tampão PBS (pH 7,4), suplementado com 1% v/v de Tween® 80.

3.2.PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas de fibroína (SF) e a nanopartículas híbridas de SF-PNVCL foram preparadas pelo método de evaporação de co-solvente, com base em estudos previamente descritos por Kakkar e colaboradores [72–75], utilizando acetona grau HPLC como fase orgânica volátil.

As amostras de fibroína de seda (SF) e dos sistemas híbridos sintetizados no Capítulo 3 foram dissolvidas em tampão PBS (pH 7,4; 10 mM), com concentração ajustada para $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Em seguida, 2 mL dessa solução aquosa foram adicionados lentamente a 2 mL de acetona sob agitação magnética constante (300 rpm), à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ \text{C}$), utilizando uma seringa com taxa de adição controlada (aproximadamente uma gota por segundo). A mistura foi mantida sob agitação durante a noite em sistema aberto, permitindo a evaporação gradual da acetona devido à sua alta volatilidade. Ao término do processo, a suspensão formada foi cuidadosamente coletada com o auxílio de uma seringa estéril e armazenada sob refrigeração (4°C).

3.3.PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS-CURCUMINA

As nanopartículas de fibroína (SF) e SF-PNVCL carregadas com curcumina foram preparadas pelo método de evaporação de co-solvente, utilizando acetona grau HPLC como fase orgânica, conforme descrito em estudos prévios [121–124]. Brevemente, em um procedimento típico, 2 mL de uma solução aquosa de SF ou SF-PNVCL (concentração ajustada para $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), previamente solubilizada em tampão PBS (pH 7,4), foram adicionados lentamente a 2 mL de uma solução de curcumina em acetona ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), sob agitação magnética constante (300 rpm), à temperatura

ambiente. A adição foi realizada com auxílio de uma seringa, na taxa de aproximadamente uma gota por segundo. A mistura foi mantida sob agitação vigorosa durante toda a noite, protegida da luz, permitindo a evaporação gradual da acetona e favorecendo a autoagregação e o encapsulamento da curcumina.

Para remover a curcumina não incorporada, as amostras foram submetidas à centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente. O pellet, composto por agregados ou partículas de maior densidade, foi descartado. O sobrenadante, contendo a fração coloidal das nanopartículas de SF carregadas com curcumina, foi então coletado e armazenado sob refrigeração (4 °C).

3.4. ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E MEDIDAS DE POTENCIAL ZETA

As amostras foram previamente solubilizadas em PBS ou água ultrapura. Para as análises de DLS, foi utilizada uma cubeta de quartzo com volume de 30 µL. Foram determinados o diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersividade (PDI) utilizando a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), com ângulo de detecção de 90°. As medições foram realizadas no equipamento Brookhaven 90Plus, equipado com um laser de diodo vermelho ($\lambda = 658 \text{ nm}$, 40 mW). Para as análises de potencial zeta, foi utilizada uma cubeta descartável de poliestireno, com volume de amostra de aproximadamente 2 mL. Todas as medições foram realizadas em triplicata ($n = 3$), assegurando a precisão e a reprodutibilidade dos resultados. As amostras foram preparadas em concentração final de $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), utilizando o microscópio Thermo Scientific Talos F200X G2 (S) 200 kV FEG, localizado no *Facility for Electron Microscopy Research* (FEMR) da McGill University. Previamente, as nanopartículas foram preparadas e solubilizadas, com a concentração ajustada para $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Para a análise, 10 µL das soluções aquosas de nanopartículas foram depositados sobre grades de cobre de 400 mesh, recobertas com filme de carbono. Em seguida, as amostras foram coradas negativamente com 10 µL de solução aquosa de acetato de uranila a 1% e deixadas para secar durante a noite à temperatura ambiente, antes da análise por MET.

3.6.AVALIAÇÃO DO PERFIL TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS

A temperatura de transição (LCST) da fibroína da seda (SF), do PNVCL e dos sistemas híbridos SF-PNVCL foi determinada por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) em função da temperatura, com base no método descrito por [76]. As amostras foram preparadas em uma concentração de 2 mg mL⁻¹ e submetidas a uma variação de temperatura entre 30 e 42 °C, com incrementos de 1 °C. Todas as medições foram conduzidas em triplicata para assegurar a reprodutibilidade dos resultados.

3.7.ESTUDO DA ENCAPSULAÇÃO DA CURCUMINA

A curcumina apresenta um pico de absorção característico em 424 nm, detectável por espectroscopia na região do UV-Visível. A intensidade desse pico foi utilizada para quantificar a concentração e a massa de curcumina encapsulada nas nanopartículas. Para essa análise, curvas de calibração foram construídas com padrões de curcumina, utilizando diferentes concentrações, expressas em microgramas por mililitro (µg mL⁻¹), absorvâncias foram medidas a 424 nm.

Um parâmetro essencial na caracterização de um nanocarreador é a avaliação de sua eficiência na encapsulação dos agentes terapêuticos, geralmente expressa em capacidade de carregamento (CC%) ou eficiência de encapsulação (EE%). Conhecendo a quantidade inicial de curcumina adicionada durante a preparação das nanopartículas e a concentração efetivamente encapsulada, é possível calcular esses parâmetros utilizando as equações apresentadas a seguir:

$$EE\% = \frac{\text{Fármaco encapsulado (mg)}}{\text{Quantidade de Fármaco total (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

$$CC\% = \frac{\text{Fármaco encapsulado (mg)}}{\text{Quantidade de Fármaco total (mg) + quantidade de híbrido (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

3.8.PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA

A suspensão de nanopartículas carregadas com curcumina (2 mL) foi preparada conforme descrito anteriormente e transferida para um tubo de diálise com porosidade de 3,5 kDa (MWCO, Spectra/Por 3), seguindo metodologia baseada em estudos prévios [74,77]. Para determinar o conteúdo de curcumina incorporado, o sistema foi submetido à diálise contra 140 mL de solução tampão fosfato (PBS 0,01 M, pH 7,4), contendo 1% v/v de Tween 80. A adição de Tween 80 teve como objetivo

melhorar a solubilidade da curcumina no meio de liberação, favorecendo sua difusão através da membrana de diálise.

A liberação da curcumina foi monitorada em diferentes intervalos de tempo: 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. Em cada ponto, alíquotas de 20 μ L foram retiradas da parte interna do tubo de diálise para quantificação da fração de curcumina não liberada. As amostras foram diluídas em metanol (1:5) e analisadas por espectroscopia na região UV-Vis, na qual a intensidade de absorção em 424 nm foi medida. O experimento foi conduzido em duas condições de temperatura (25 °C e 40 °C) para avaliar a influência térmica na liberação da curcumina.

Os valores obtidos foram comparados a uma curva de calibração padrão, permitindo a determinação da massa de curcumina liberada em cada intervalo de tempo. A concentração média da curcumina liberada foi então calculada e os resultados foram plotados em função do tempo de diálise ($n = 3$).

3.9. ESTUDO DA CINÉTICA DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA

Para estudar o mecanismo cinético da liberação da curcumina, as curvas de concentração versus tempo foram obtidas e ajustadas a diferentes modelos matemáticos nas duas temperaturas de liberação analisadas previamente (25°C e 40°C). Esses modelos permitem compreender se a liberação do composto ocorre predominantemente por difusão ou dissolução, contribuindo para o desenvolvimento de sistemas mais eficientes. A análise foi realizada utilizando DDSolver (uma extensão adicionada ao Microsoft Excel)) [78], no qual foram aplicados os modelos de Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Weibull e Gompertz. O ajuste dos modelos foi comparado por meio dos coeficientes de determinação (R^2) permitindo a identificação do modelo que melhor descreve o perfil de liberação da curcumina.

3.10. ENSAIOS *IN VITRO*

A avaliação da citotoxicidade das nanopartículas brancas e das nanopartículas carregadas com curcumina foi realizada por citometria de fluxo (BD FACsVERSE, San Jose, Estados Unidos), utilizando o kit *Fixable Viability Stain*[®], com fluorocromo que possui emissão máxima a 450 nm (a curcumina possui fluorescência intrínseca com emissão na faixa de 500–550 nm, não se espera sobreposição) e reage ligando-se covalentemente às aminas da superfície celular e ao meio intracelular. As células mortas apresentam fluorescência aumentada em comparação às células vivas. Para cada amostra, foram realizadas 50.000 aquisições, garantindo uma análise precisa e representativa da viabilidade celular. Todos os procedimentos de cultivo celular e análise seguiram os

critérios de biossegurança. Os experimentos foram conduzidos com as linhagens celulares MRC-5, composta por fibroblastos pulmonares humanos normais, adquirida da *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC), e 4T1, uma linhagem de células tumorais de mama murinas, originada de um tumor de mama metastático em camundongos BALB/c. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 2% de solução antimicótica-antibiótica, contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina, em frascos de 75 cm² (Thermo Fisher Scientific, Asheville, EUA), sob 5% de CO₂ e temperatura controlada a 37 °C. Após atingirem uma confluência superior a 90% as células foram transferidas para placas de cultura de 12 poços e incubadas por 48 horas com as amostras. A concentração final de cada amostra em cada poço foi ajustada para 100 µg mL⁻¹, e após as 48 horas, as amostras foram analisadas. A citotoxicidade contra as células 4T1 foi avaliada utilizando o mesmo protocolo experimental, garantindo a padronização das condições de cultivo, tratamento e análise para ambas as linhagens celulares, MRC-5 e 4T1, permitindo comparações consistentes entre os resultados obtidos para as células normais e tumor.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. QUANTIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA CURCUMINA

A curcumina apresenta absorção máxima em 424 nm, motivo pelo qual essa faixa foi escolhida para a construção das curvas de calibração utilizadas na quantificação do fármaco. Com base na intensidade do pico de absorção nessa região, foram construídas duas curvas de calibração (Figura 1), que permitiram determinar a concentração de curcumina nas amostras analisadas. Foram preparadas soluções padrão com concentrações variando de 0 a 60 µg·mL⁻¹ ($y = 0,0390x - 0,0234$; $R^2 = 0,9998$) (curva à esquerda) e de 0 a 5 µg·mL⁻¹ ($y = 0,1923x + 0,0249$; $R^2 = 0,9990$) (curva à direita), conforme o intervalo de linearidade requerido para as respectivas análises. O n amostral foi de 6 e cada ponto da curva foi analisado em triplicata.

As equações obtidas a partir das curvas foram posteriormente utilizadas para determinar a concentração de curcumina encapsulada e liberada nas amostras de nanopartículas, permitindo avaliar a eficiência de encapsulação e os perfis de liberação controlada do fármaco.

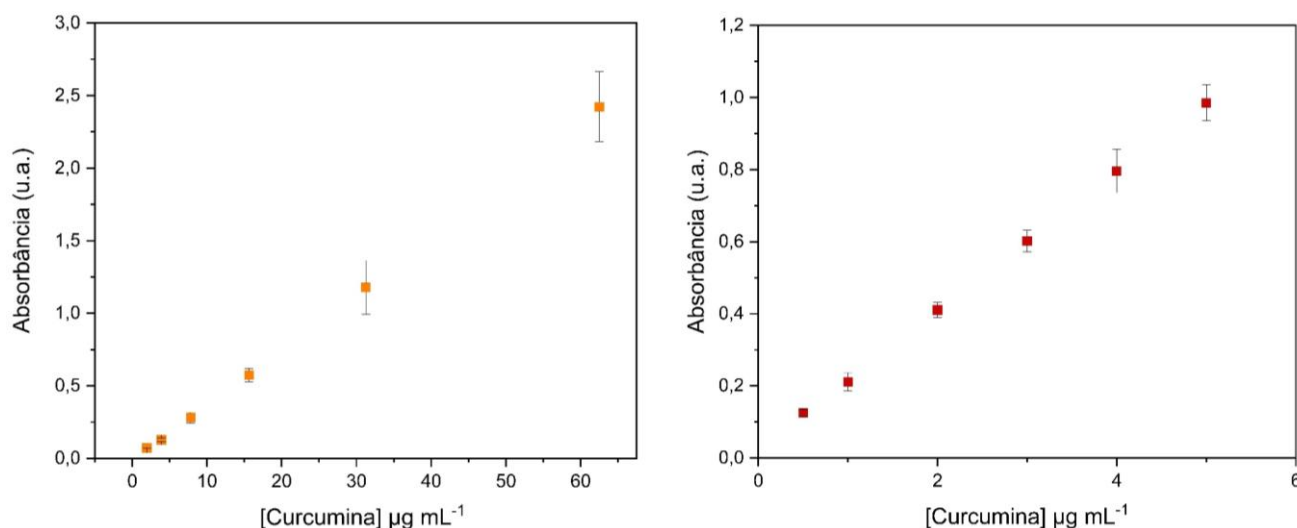


Figura 1. Curvas de calibração da curcumina obtidas com base na absorbância máxima em 424 nm. (Esquerda) Curva construída no intervalo de 0 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Direita) Curva construída no intervalo de 0 a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE FIBROÍNA DE SEDA (SF)

4.2.1. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA

A caracterização das nanopartículas de fibroína é essencial para avaliar sua estabilidade coloidal, comportamento em meio biológico e potencial para aplicações nanotecnológicas.

O tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de fibroína apresentou um valor médio de $83,16 \pm 1,12$ nm. Esse resultado é altamente favorável para aplicações biomédicas, especialmente em sistemas de liberação controlada e engenharia de tecidos, onde o tamanho das nanopartículas influencia diretamente na biodisponibilidade, penetração celular e tempo de circulação no organismo [79,80].

O potencial zeta é uma consequência indireta da carga superficial das nanopartículas e sua estabilidade coloidal. O potencial zeta de $-39,48 \pm 1,14$ mV obtido indica que as nanopartículas possuem estabilidade coloidal, minimizando a formação de agregados e garantindo maior tempo de circulação em meio biológico. O PDI de $0,198 \pm 0,029$ obtido para as nanopartículas de fibroína sugere que a amostra apresenta alta uniformidade e baixa variação de tamanho.

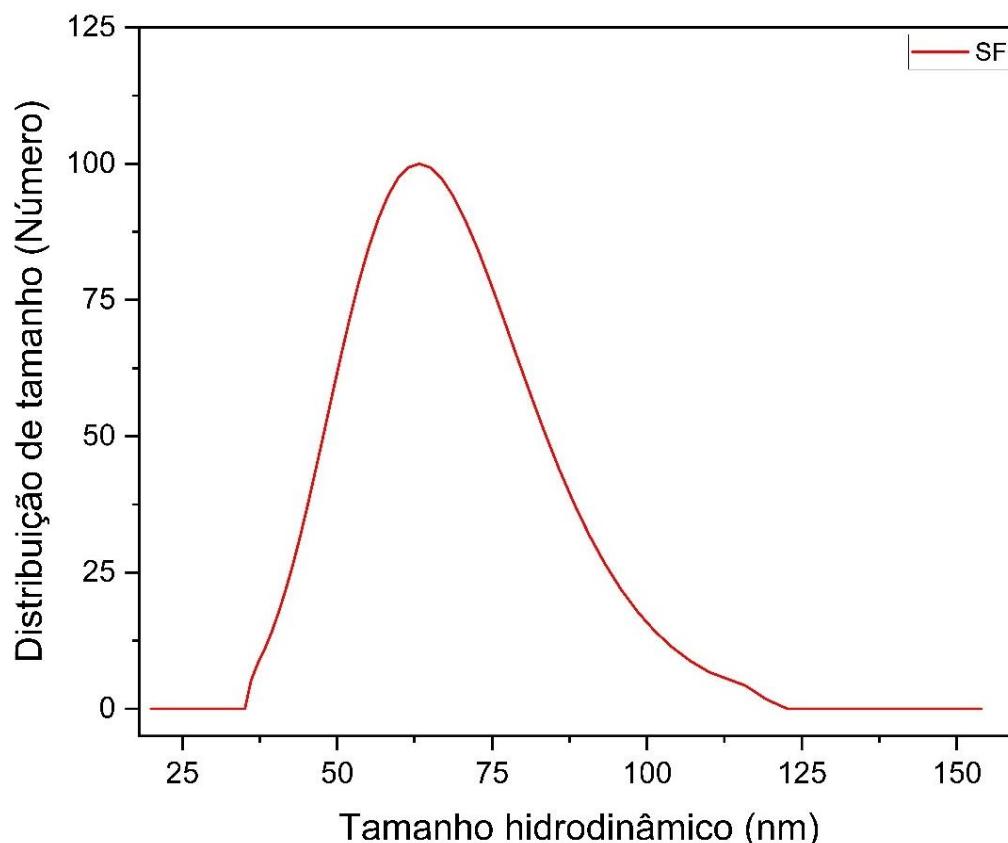


Figura 2 Distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de fibroína por número.

4.2.2. COMPORTAMENTO TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS DE SF

O comportamento termorresponsivo das nanopartículas de fibroína foi avaliado por meio da técnica DLS, monitorando as contagens de luz espalhadas por segundo (*Count Rate* (kcps)) em função da temperatura. A análise foi realizada na faixa de temperatura de 30 a 40°C, com incrementos de 1°C, a fim de identificar possíveis transições térmicas que pudessem indicar alterações na estabilidade coloidal ou no comportamento das nanopartículas.

Conforme mostrado na Figura 3, não foi observada nenhuma temperatura crítica na faixa analisada, uma vez que a contagem de luz espalhadas por segundo (*Count Rate* (kcps)) permaneceu praticamente constante, sem variações significativas. Caso houvesse uma transição térmica relevante, seria esperado um aumento do *Count Rate*, indicando fenômenos como agregação, colapso de cadeias polipeptídicas ou reorganização estrutural das nanopartículas. A ausência dessa resposta sugere que as nanopartículas de fibroína mantêm sua estabilidade coloidal dentro dessa faixa de temperatura, sem alterações significativas. Isso indica que as nanopartículas não apresentam um comportamento

termorresponsivo nesse intervalo de temperatura, além de não exibirem sinais de degradação, reforçando sua estabilidade estrutural

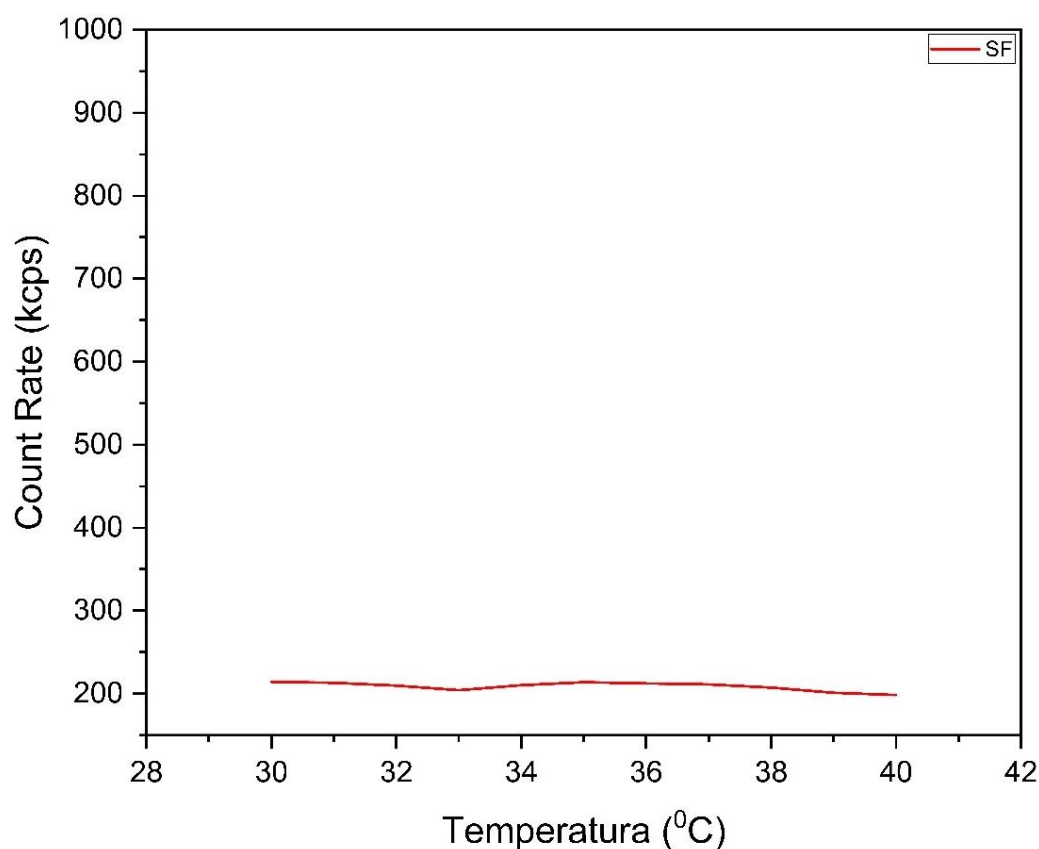


Figura 3 Perfil termorresponsivo das nanopartículas de fibroína.

A Figura 4 apresenta o perfil de liberação da curcumina a partir de nanopartículas de fibroína (SF) ao longo de 72 horas, sob duas condições de temperatura: 25 °C (ambiente) e 40 °C (elevada). O objetivo foi avaliar a possível termorresponsividade do sistema, isto é, se a variação de temperatura influencia significativamente a liberação da curcumina.

Observa-se uma liberação inicial rápida nas primeiras horas, característica de um efeito “burst”, seguida por uma fase mais lenta e controlada, que atinge um platô em torno de 45% da carga total. Comparando os dois perfis, verifica-se que não há diferenças significativas na liberação da curcumina entre 25 °C e 40 °C, considerando as barras de erro apresentadas.

Os resultados sugerem que, nas condições experimentais testadas, o sistema de liberação com base em nanopartículas de fibroína não apresenta comportamento termorresponsivo evidente.

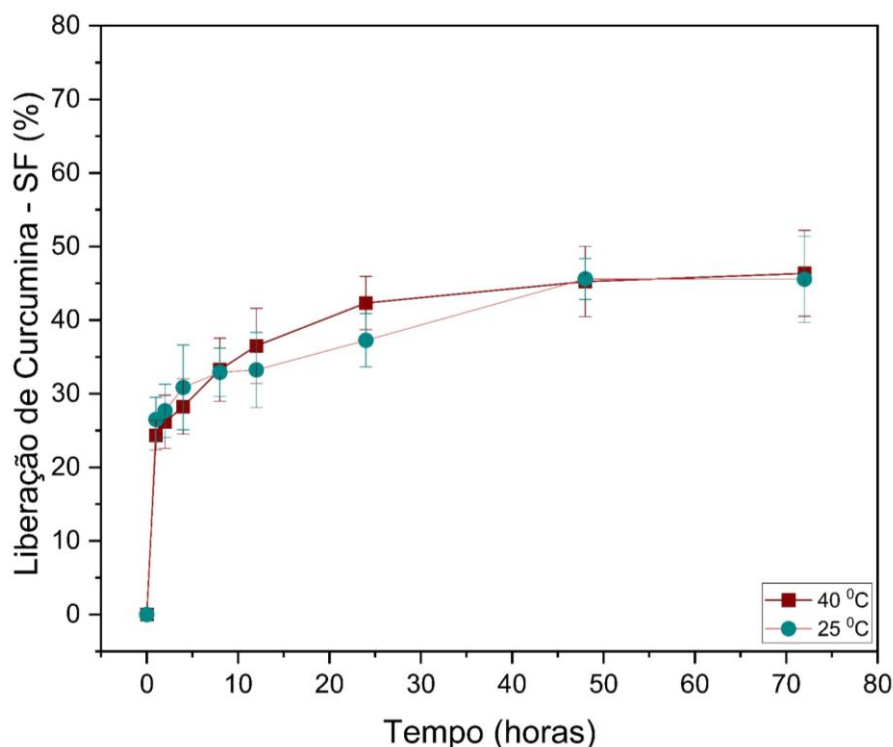


Figura 4 Perfil de liberação da curcumina a partir de nanopartículas de fibroína (SF) em diferentes temperaturas (25 °C e 40 °C), monitorado por 72 horas.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS SF-PNVCL_{A1}

4.3.1. TAMANHO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA E COMPORTAMENTO TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS DO SISTEMA SF-PNVCL_{A1}

Com a confirmação da graftização do polímero na fibroína de seda, obtendo-se o material híbrido SF-PNVCL_{A1}, foi possível avançar para a etapa de preparação de nanopartículas a partir desse sistema híbrido. A Figura 5 apresenta o resultado da análise de tamanho hidrodinâmico das nanopartículas de SF-PNVCL_{A1}, determinada por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Observa-se uma distribuição monomodal, indicando a formação de nanopartículas com tamanho médio bem definido.

A curva apresenta uma distribuição relativamente estreita, sem presença de populações secundárias significativas, o que sugere uma boa homogeneidade do sistema e eficiência no processo de auto-organização do material híbrido. Esses resultados demonstram que o híbrido SF-PNVCL_{A1}, é capaz de formar nanopartículas bem definidas.

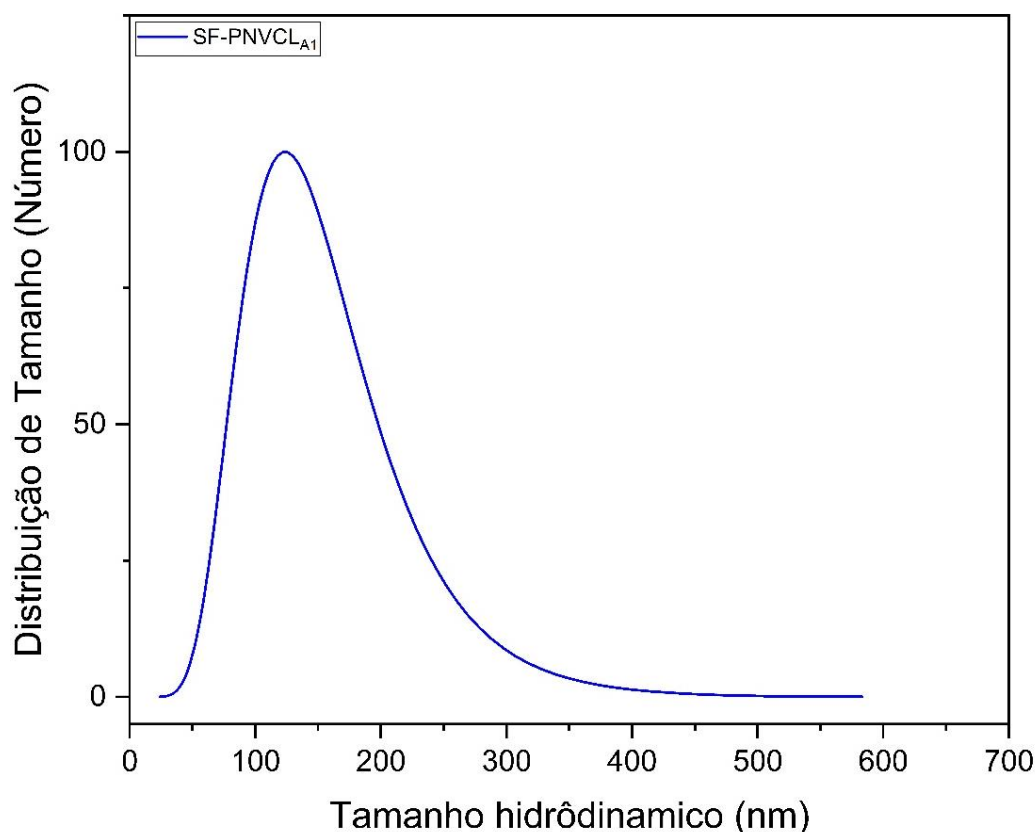


Figura 5 Distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas do híbrido SF-PNVCL_{A1}

A Tabela 1 apresenta os resultados de dispersão dinâmica de luz (DLS) e potencial zeta. No que diz respeito ao diâmetro médio hidrodinâmico, a fibroína pura apresenta nanopartículas com tamanho médio de 83,16 nm, valor típico para agregados formados por SF em solução aquosa. Após a funcionalização com o PNVCL, observa-se um aumento expressivo no diâmetro médio das partículas do híbrido SF-PNVCL_{A1}, que atinge 199,05 nm, indicando a formação de uma nova estrutura com maior volume hidrodinâmico. Esse aumento é coerente com a graftização do polímero PNVCL na superfície da SF, o que resulta em um material mais volumoso e com maior camada de solvatação ao redor das partículas.

O índice de polidispersidade (PDI) também fornece informações importantes sobre a uniformidade das nanopartículas. Ambos os sistemas — SF (PDI = 0,198) e SF-PNVCL_{A1} (PDI = 0,181) — apresentaram valores baixos indicando boa homogeneidade das populações de partículas em ambos os casos.

Quanto ao potencial zeta, que reflete a carga superficial das partículas e está diretamente relacionado à estabilidade coloidal, os resultados revelam variações importantes entre os sistemas. A fibroína pura apresenta um valor de -39,48 mV, indicando boa estabilidade eletrostática. Já o híbrido SF-PNVCL_{A1} exibe um valor de -23,42 mV, uma redução significativa na magnitude do potencial

zeta. Essa variação indica que ocorreram reações químicas de graftização, nas quais grupos ionizáveis da fibroína (como grupos carboxila e amina) foram consumidos ou mascarados pelo polímero enxertado, reduzindo a densidade de carga na superfície das partículas. Essa alteração no potencial zeta é uma evidência clara de modificação química da superfície e não apenas de uma mistura física.

Para fins comparativos, a amostra SF + PNVCL, correspondente à mistura física simples dos dois materiais sem reação química, apresentou um potencial zeta intermediário (-35,00 mV), próximo ao valor da fibroína. Isso mostra que a simples associação física entre os materiais não altera significativamente a carga superficial, reforçando que apenas a reação de graftização — como no caso do SF-PNVCL_{A1} — é capaz de modificar a interface de forma evidente.

Por fim, o PNVCL puro apresentou o valor mais negativo de potencial zeta (-44,23 mV), evidenciando a elevada carga negativa da superfície do polímero livre. A partir desses dados, conclui-se que a redução no potencial zeta do híbrido, acompanhada do aumento no diâmetro médio e da manutenção de uma baixa polidispersidade, são fortes indícios da formação bem-sucedida do sistema híbrido por reação química, diferenciando-o claramente de uma simples mistura física.

Tabela 1 Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta, PDI para (SF), SF-PNVCL_{A1}, SF + PNVCL e PNVCL. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. Para cada sistema, foram analisadas três amostras independentes (n amostral = 3)

Amostra	Tamanho Hidrodinâmico Médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
SF	83,16 \pm 1,12	0,198 \pm 0,29	-39,48 \pm 1,14
SF-PNVCL _{A1}	199,05 \pm 2,33	0,181 \pm 0,01	-23,42 \pm 0,2
SF + PNVCL	-	-	-35,00 \pm 0,92
PNVCL	-	-	-44,23 \pm 1,05

Com base nas imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}, apresentadas na Figura 6, é possível realizar uma análise das nanopartículas formadas a partir do material funcionalizado. As micrografias, apresentadas em diferentes escalas (1 μ m e 500 nm), revelam a presença de nanopartículas definidas, com morfologia esférica ou, distribuídas sobre a grade de observação. As partículas apresentam tamanho compatível com os valores obtidos por DLS (~120–200 nm), confirmando a formação de estruturas nanométricas a partir do sistema híbrido. Além disso, não são observadas grandes aglomerações ou agregados amorfs excessivos, o que indica boa estabilidade coloidal do sistema e eficiência no método de preparação.

Portanto, a análise por TEM confirma a formação das nanopartículas do material híbrido, revelando não apenas seu tamanho nanométrico, mas também uma morfologia adequada.

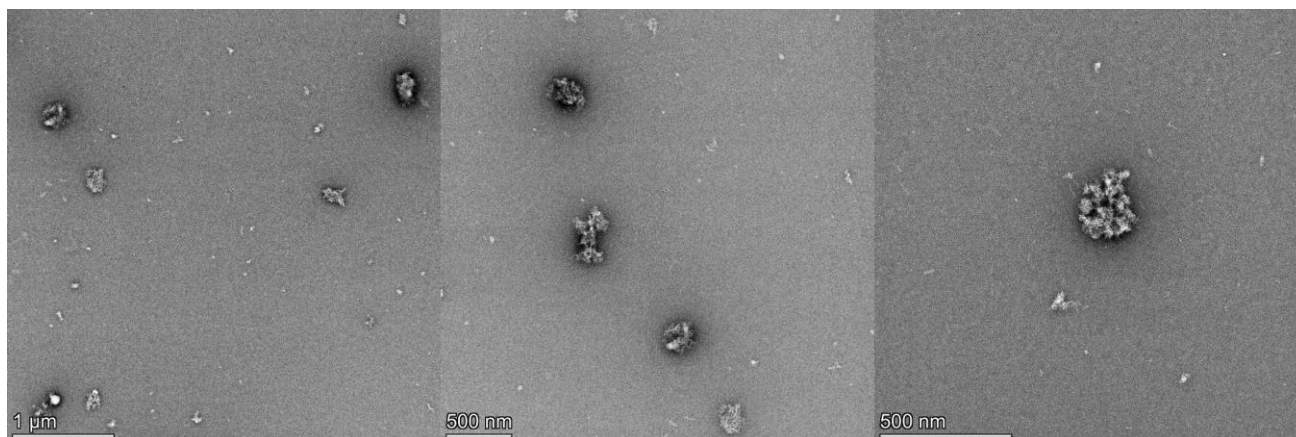


Figura 6 Micrografia obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) SF-PNVCL_{A1}.

4.3.2. COMPORTAMENTO TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS DO SISTEMA SF-PNVCL_{A1}

A avaliação do comportamento termorresponsivo do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1} foi realizada por meio de dispersão dinâmica de luz (DLS), monitorando as contagens de luz espalhadas por segundo (Count Rate (kcps)) em função da temperatura. Conforme apresentado na Figura 7, o híbrido manteve estabilidade coloidal até aproximadamente 38 °C, com o count rate se mantendo constante. A partir dessa temperatura, observa-se um aumento expressivo no count rate, o que indica a ocorrência de agregação das nanopartículas.

Esse comportamento evidencia que o material híbrido apresenta uma temperatura crítica de transição de fase (LCST) superior a 38 °C, o que é característico de sistemas poliméricos termorresponsivos. A transição ocorre quando as cadeias de PNVCL enxertadas na fibroína mudam de estado hidrofílico para hidrofóbico, promovendo o colapso das estruturas e aumento da dispersão de luz.

A comparação com os componentes isolados, conforme mostrado na Figura 8, reforça essa observação. O polímero PNVCL puro apresenta uma transição abrupta com LCST típica em torno de 38–40 °C, enquanto a fibroína de seda (SF) não demonstra nenhuma variação significativa nas contagens de luz espalhadas por segundo (Count Rate (kcps)) rate, refletindo sua natureza estável e não responsiva à temperatura.

Dessa forma, a análise confirma que o híbrido SF-PNVCL_{A1} preserva o comportamento termorresponsivo do PNVCL, com uma LCST ligeiramente deslocada para valores acima de 38 °C,

provavelmente em decorrência da graftização na matriz proteica e das interações específicas entre os dois componentes. A presença desse comportamento no híbrido, e sua ausência na SF, é uma forte evidência da funcionalização química bem-sucedida.

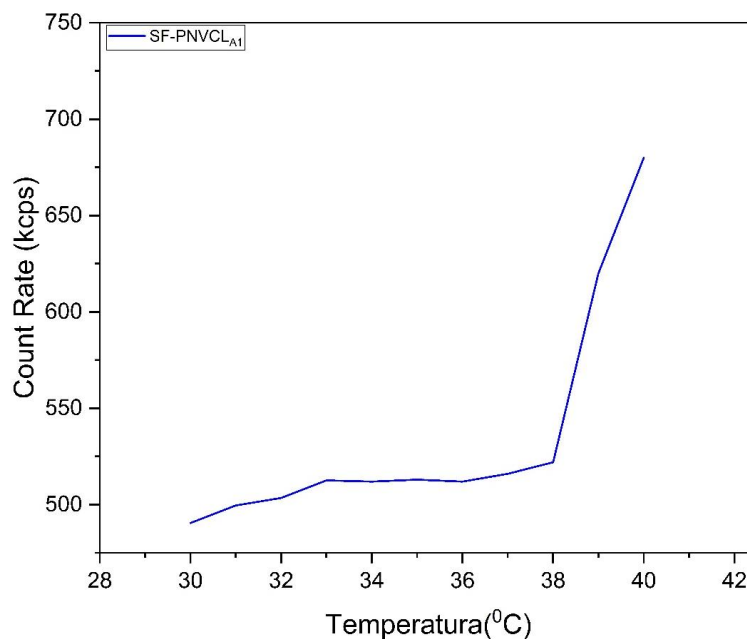


Figura 7 Curva de variação das contagens de luz espalhadas por segundo (Count Rate (kcps) em função da temperatura para o sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}

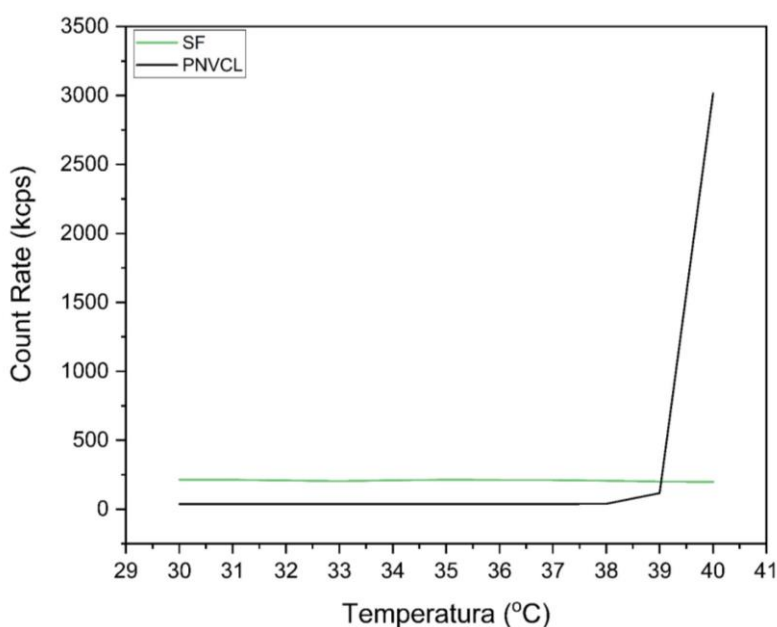


Figura 8 Curva de variação das contagens de luz espalhadas por segundo (Count Rate (kcps) em função da temperatura para SF e PNVCL

4.3.3. ENCAPSULAMENTO DA CURCUMINA E PERFIL DE LIBERAÇÃO

Utilizando as equações 1 e 2, juntamente com as curvas de calibração previamente obtidas com amostras padrão de curcumina, foi possível determinar a eficiência de encapsulamento (EE%) e a capacidade de carregamento (CC%) do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}. Os resultados demonstraram que o sistema foi capaz de encapsular $43,91 \pm 3,22$ % da curcumina inicialmente adicionada, o que representa uma eficiência de encapsulamento satisfatória para um sistema baseado em matriz proteica funcionalizada. Esse valor indica que uma fração considerável do ativo foi efetivamente retida dentro das nanopartículas formadas, possivelmente favorecida pelas interações entre a curcumina e os domínios hidrofóbicos da fibroína, bem como pela organização estrutural conferida pelo PNVCL enxertado. A capacidade de carregamento alcançada foi de $3,46 \pm 2,59$ % valor que representa a proporção da massa de curcumina em relação à massa total do sistema nanoparticulado.

A Figura 9 apresenta o perfil de liberação da curcumina encapsulada no sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}, avaliado em duas temperaturas: 25 °C e 40 °C, com o objetivo de investigar a influência da temperatura sobre o comportamento de liberação da curcumina. Os resultados demonstram de forma clara o caráter termorresponsivo do material, diretamente associado à presença do polímero PNVCL enxertado na matriz de fibroína.

Em 25 °C, temperatura abaixo da LCST do sistema, observa-se um perfil de liberação lento e controlado, com liberação cumulativa estabilizando-se em torno de 35–40% após 72 horas. Por outro lado, a liberação a 40 °C, temperatura superior à LCST (~38 °C) determinada previamente, foi significativamente mais elevada, atingindo cerca de 65% da curcumina total liberada no mesmo intervalo de tempo. Esse aumento expressivo está associado ao colapso das cadeias de PNVCL, que passam de um estado hidrofílico para hidrofóbico, levando à contração das nanopartículas, expulsão de água e consequente expulsão da curcumina encapsulada. A transição de fase térmica desencadeia a ruptura parcial da rede polimérica, facilitando a difusão da curcumina e promovendo uma liberação mais rápida e eficiente. A diferença entre os perfis demonstra claramente que o sistema responde à variação de temperatura, liberando maiores quantidades do composto bioativo sob condições que simulam ambientes fisiologicamente alterados, como inflamações ou tumores (que frequentemente apresentam temperaturas locais mais elevadas).

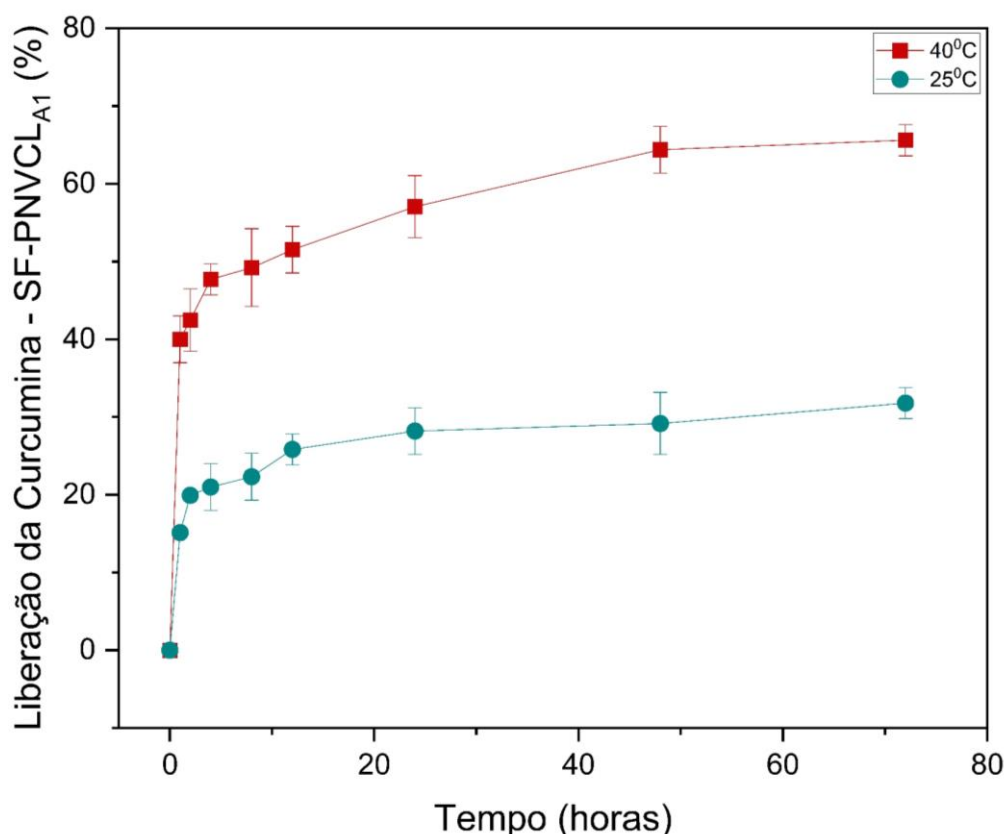


Figura 9 Perfil in vitro de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}

4.3.4. MODELAGEM MATEMÁTICA APLICADA AO PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA DO SISTEMA SF-PNVCL_{A1}

A cinética de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1} foi avaliada por meio do ajuste dos dados experimentais a diferentes modelos matemáticos, com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos no processo e a influência da temperatura sobre o comportamento do sistema. Os parâmetros ajustados para os modelos foram obtidos com base nos perfis de liberação obtidos a 25 °C e 40 °C, respectivamente abaixo e acima da temperatura crítica de transição de fase (LCST) do polímero PNVCL, e estão apresentados na Tabela 2.

Dentre os modelos testados, os que apresentaram melhor correlação com os dados experimentais foram os modelos Weibull e Gompertz, com valores de R^2 superiores a 0,99 em ambas as temperaturas. Esses modelos são reconhecidos por descreverem liberação multifásica e complexa, o que se alinha ao comportamento observado para o SF-PNVCL_{A1}, cujas nanopartículas apresentam morfologia estruturada e resposta à temperatura. O bom ajuste a esses modelos indica que o processo de liberação não ocorre por mecanismos simples, como difusão pura, mas sim por uma combinação

de eventos físicos e estruturais, incluindo a reorganização da matriz e a contração térmica das partículas.

O modelo de Korsmeyer–Peppas também apresentou bom desempenho, especialmente a 25 °C ($R^2 = 0,9872$), com um expoente de difusão $n = 0,15$, típico de mecanismo Fickiano, no qual a liberação é predominantemente governada pela difusão através da sistema híbrido. Já a 40 °C, o valor de n se reduz ainda mais ($n = 0,11$), indicando que a liberação passa a ocorrer por mecanismos adicionais, como a contração estrutural induzida pela transição térmica do PNVCL, fenômeno associado ao seu comportamento termorresponsivo. Em contraste, os modelos clássicos de Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi e Hixson–Crowell apresentaram valores de R^2 inferiores, indicando baixo grau de ajuste aos dados. Esses modelos são mais adequados para sistemas homogêneos com liberação controlada exclusivamente por difusão ou dissolução, o que não representa fielmente a complexidade do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}.

Em conjunto, os resultados demonstram que o mecanismo mais provável de liberação da curcumina é dependente da temperatura, sendo governado por difusão a 25 °C e por eventos multifásicos e reorganização estrutural a 40 °C, como evidenciado pelo colapso térmico do polímero acima da LCST.

Tabela 2 Parâmetros cinéticos e modelos matemáticos para liberação da curcumina a partir do sistema SF-PNVCL_{A1}

	Modelo Matemático	Parâmetros (40°C)	Parâmetros (25 °C)	Equação
SF-PNVCL _{A1} -Cur	<i>Ordem Zero</i>	$k_0 = 1,267 / R^2 = -1,994$	$k_0 = 0,602 / R^2 = -1,561$	$F = k_0 \cdot t$
	<i>Primeira Ordem</i>	$k_1 = 0,0298 / R^2 = -0,958$	$k_1 = 0,00714 / R^2 = -1,310$	$F = 100 \cdot [1 - e^{-k_1 \cdot t}]$
	<i>Higuchi</i>	$k_H = 10,499 / R^2 = -0,182$	$k_H = 4,958 / R^2 = 0,0689$	$F = k_H \cdot t^{0.5}$
	<i>Hixson–Crowell</i>	$k_{HC} = 0,0084 / R^2 = -1,234$	$k_{HC} = 0,0022 / R^2 = -1,388$	$F = 100 \cdot [1 - 1 - k_{HC} \cdot t^3]$
	<i>Korsmeyer–Peppas</i>	$k_{KP} = 39,436 / n = 0,11$ $R^2 = 0,9968$	$k_{KP} = 16,543 / n = 0,15$ $R^2 = 0,9872$	$F = k_{KP} \cdot t^n$
	<i>Weibull</i>	$\alpha = 1,916 / \beta = 0,16$ $T_i = 0,4$ $R^2 = 0,9929$	$\alpha = 5,262 / \beta = 0,16$ $T_i = 0,4$ $R^2 = 0,9912$	$F = 100 \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-T_i)^\beta}{\alpha}} \right]$
	<i>Gompertz</i>	$\alpha = 0,974 / \beta = 0,42$ $R^2 = 0,9916$	$\alpha = 1,818 / \beta = 0,24$ $R^2 = 0,9908$	$F = 100 \cdot e^{-\alpha \cdot e^{-\beta \cdot \log(t)}}$

A Figura 10 apresenta as curvas de ajuste dos modelos matemáticos Weibull, Korsmeyer–Peppas e Gompertz à liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}, nas temperaturas de 40 °C (coluna da esquerda) e 25 °C (coluna da direita). Os pontos em azul representam os valores experimentais obtidos ao longo do tempo, enquanto as curvas em vermelho correspondem aos valores preditos por cada modelo.

Observa-se que todos os três modelos exibiram excelente ajuste visual e estatístico (conforme previamente discutido na Tabela 2), reproduzindo com alta fidelidade os perfis de liberação em ambas as temperaturas. A adequação desses modelos reforça a natureza multifásica e não-linear da liberação da curcumina, especialmente evidente no comportamento acelerado observado a 40 °C, onde o sistema sofre transição de fase devido ao colapso térmico das cadeias de PNVCL. A partir dessas curvas, é possível verificar que os modelos são capazes de acompanhar tanto a liberação inicial rápida quanto a fase de liberação sustentada, o que os torna adequados para descrever sistemas de liberação controlada com comportamento complexo a estímulos como a temperatura.

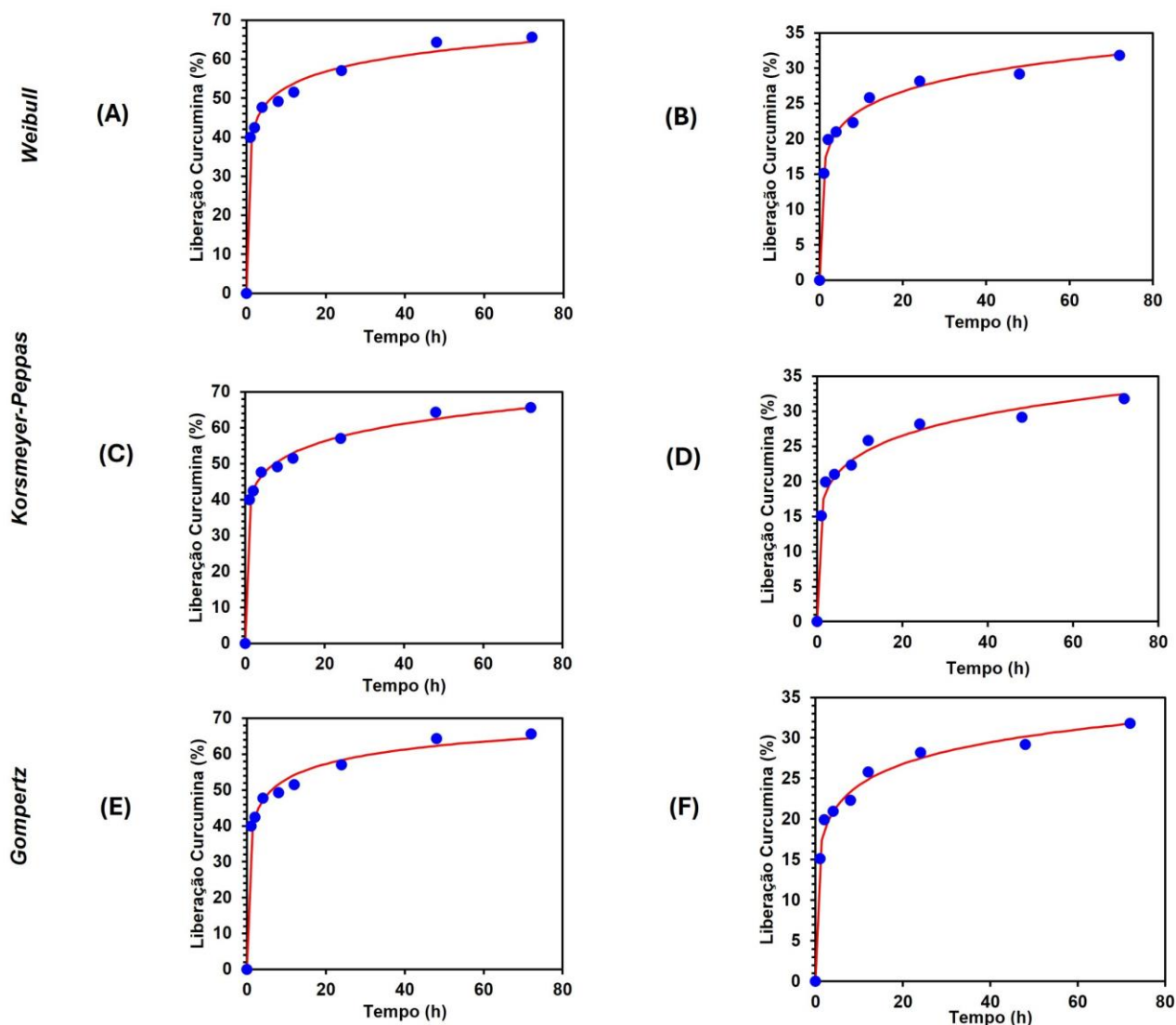


Figura 10 Ajuste dos modelos matemáticos de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}. Os gráficos apresentam os dados experimentais (pontos azuis) e os valores previstos pelos modelos (linhas vermelhas) para Weibull (A e B), Korsmeyer–Peppas (C e D) e Gompertz (E e F). A coluna da esquerda (A, C, E) corresponde aos dados obtidos a 40 °C, enquanto a coluna da direita (B, D, F) mostra os dados a 25 °C.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS HÍBRIDAS SF-PNVCL_{B2}

4.4.1. TAMANHO HIDRODINÂMICO E POTENCIAL ZETA DAS NANOPARTÍCULAS DO SISTEMA SF-PNVCL_{B2}

A Figura 11 apresenta a distribuição de tamanho hidrodinâmico das nanopartículas do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}, obtida por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS). O gráfico mostra um perfil de distribuição unimodal, com o pico máximo centrado em torno de 100 nm, o que indica a formação de nanopartículas bem definidas e com baixa polidispersidade.

O tamanho hidrodinâmico observado está dentro da faixa ideal para aplicações biomédicas, como liberação controlada de fármacos, terapia dirigida e diagnóstico por imagem, já que partículas nessa escala apresentam bom desempenho em termos de interação celular, circulação sistêmica prolongada e penetração tecidual [79]. Além disso, o perfil de distribuição relativamente estreito sugere uma síntese eficiente e um sistema com boa estabilidade coloidal, com baixa tendência à agregação.

O aumento do tamanho em comparação às nanopartículas de fibroína pura também reforça a evidência da graftização do PNVCL sobre a matriz proteica, promovendo um crescimento da estrutura e confirmando a formação do material híbrido.

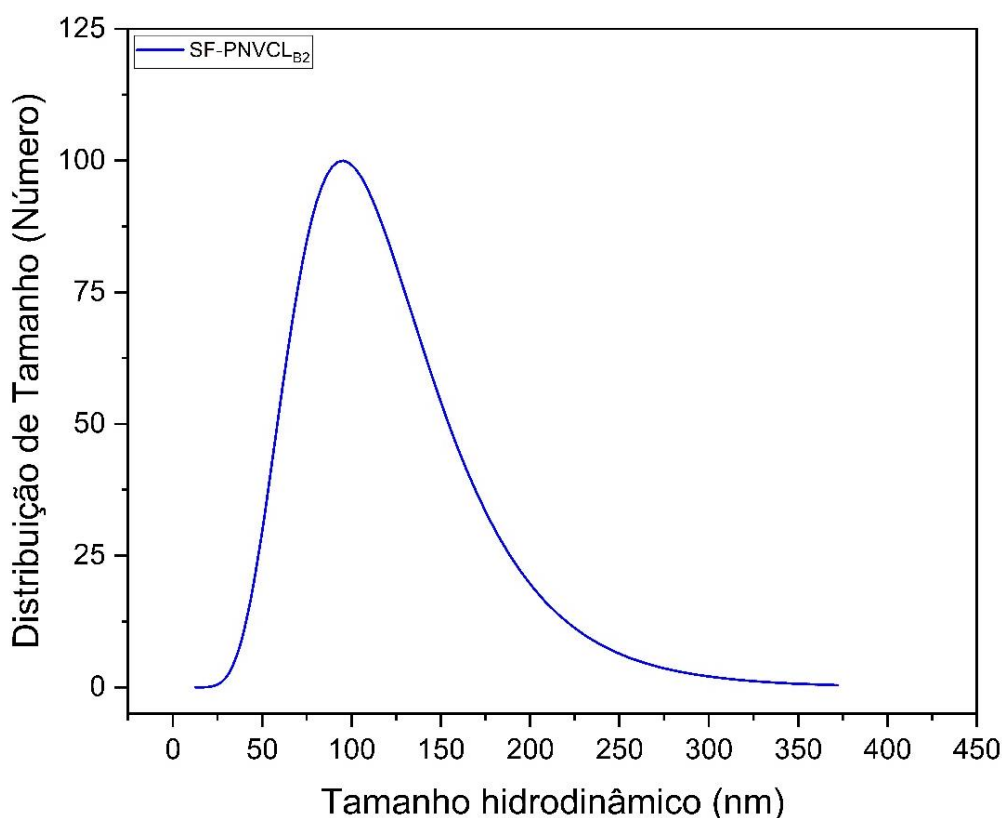


Figura 11 Distribuição de tamanho hidrodinâmico das nanopartículas do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2} obtida por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

A Tabela 3 apresenta os valores de tamanho hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta para as diferentes amostras analisadas, com destaque para o sistema híbrido SF-PNVCL_{B2} comparado à fibroína pura (SF) e às misturas físicas de SF com PNVCL.

Observa-se que a fibroína pura apresentou um tamanho hidrodinâmico médio de 83,16 nm, com um PDI de 0,198, indicando boa homogeneidade das nanopartículas e distribuição relativamente estreita. O potencial zeta de -39,48 mV sugere uma excelente estabilidade coloidal, já que valores absolutos acima de 30 mV indicam forte repulsão eletrostática entre partículas, impedindo a agregação.

No sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}, o tamanho médio aumentou significativamente para 183,09 nm, o que está diretamente relacionado ao crescimento da cadeia polimérica de PNVCL sobre a superfície da fibroína após o processo de graftização. O valor do PDI (0,191) permanece baixo e semelhante ao da amostra original, indicando que mesmo após a modificação, as nanopartículas mantiveram uma boa uniformidade de tamanho. Já o potencial zeta do híbrido reduziu para -11,11 mV, o que evidencia uma diminuição da carga superficial, possivelmente atribuída à presença das cadeias neutras de PNVCL na superfície, que mascaram parcialmente os grupos carregados da fibroína.

Esse comportamento também é confirmado pelos valores de potencial zeta das amostras controle: a mistura SF + PNVCL apresenta um valor de -35,00 mV, próximo ao da SF, enquanto o PNVCL puro possui um potencial zeta de -44,23 mV, típico de sistemas coloidais estáveis. O fato de a amostra SF-PNVCL_{B2} apresentar um valor tão distinto (-11,11 mV) sugere que o sistema não se trata de uma simples mistura física, mas sim de um material genuinamente híbrido, com modificação superficial que altera significativamente suas características coloidais.

Portanto, os dados da Tabela 3 reforçam a conclusão de que a síntese do sistema SF-PNVCL_{B2} resultou na formação de nanopartículas funcionalizadas, com aumento de tamanho compatível com a adição do polímero e modificação da carga superficial.

Tabela 3 Tamanho hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta das amostras analisadas: fibroína (SF), sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}, mistura física SF + PNVCL e PNVCL puro.

Amostra	Tamanho hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
SF	83,16±1,12	0,198 ±0,29	-39,48 ± 1,14
SF-PNVCL _{B2}	183,09±1,94	0,191±0,01	-11,11± 0,36
SF + PNVCL	-	-	-35,00 ±0,92
PNVCL	-	-	-44,23 ±1,05

As micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Figura 12) evidenciam a morfologia característica das nanopartículas formadas no sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}. Observa-se a presença de partículas predominantemente esféricas, bem definidas e distribuídas de

maneira relativamente homogênea no campo analisado. A escala de 500 nm permite estimar que os diâmetros das partículas estão majoritariamente abaixo de 200 nm, em concordância com os dados obtidos por DLS, o que reforça a eficácia do processo de síntese. A ausência de aglomerações e a uniformidade do padrão visual reforçam a estabilidade coloidal do sistema, um fator essencial para aplicações em sistemas de liberação controlada, engenharia de tecidos ou plataformas responsivas a estímulos. Embora se observe alguma variação de tamanho entre as partículas, a distribuição permanece dentro de uma faixa estreita, o que é compatível com a heterogeneidade natural dos sistemas híbridos.

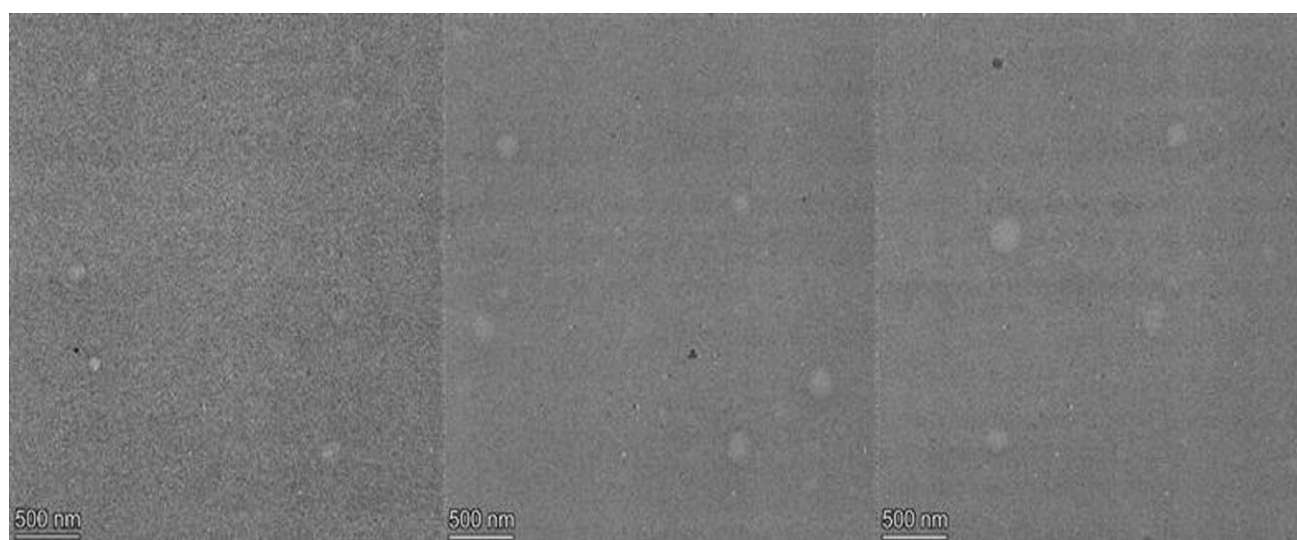


Figura 12 Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}.

4.4.2. COMPORTAMENTO TERMORRESPONSIVO DAS NANOPARTÍCULAS DO SISTEMA SF-PNVCL_{B2}

O gráfico apresentado na Figura 13 evidencia o comportamento termorresponsivo do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}, monitorado por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) por meio da variação da contagem de luz espalhada por segundo (Count Rate (kcps) em função da temperatura. A curva revela um perfil típico de polímeros com transição térmica do tipo LCST (Temperatura Crítica Inferior de Solubilidade), marcado por um aumento abrupto na intensidade de espalhamento próximo a 39–40 °C. Essa variação acentuada indica uma mudança no estado físico das nanopartículas,

refletindo a transição de uma fase solúvel para uma fase agregada, à medida que a temperatura ultrapassa o limiar de solubilidade do polímero funcionalizado.

Até cerca de 38 °C, as contagens de luz espalhadas por segundo (Count Rate) se mantêm relativamente estável, indicando que as nanopartículas permanecem dispersas e hidratadas em meio aquoso, com cadeias poliméricas em estado estendido. No entanto, ao se atingir a faixa de transição (~39–40 °C), observa-se um salto expressivo na intensidade do espalhamento de luz, sugerindo que o sistema sofreu uma mudança conformacional e colapsou devido à transição hidrofílica-hidrofóbica das cadeias de PNVCL. Esse fenômeno leva à agregação ou compactação das partículas, aumentando sua densidade óptica e, conseqüentemente, o sinal medido.

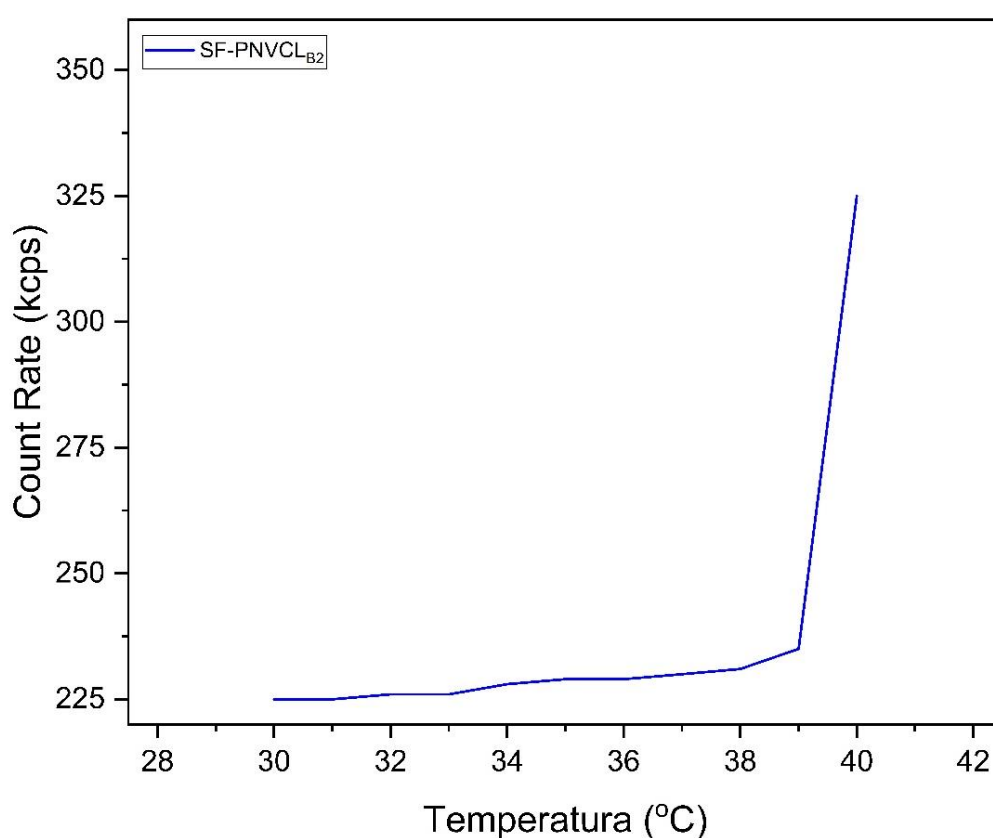


Figura 13 Perfil termorresponsivo do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2} obtido por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), representado pelo Count Rate (kcps) em função da temperatura.

4.4.3. ENCAPSULAMENTO DA CURCUMINA E PERFIL DE LIBERAÇÃO

Foram avaliadas a eficiência de encapsulamento (EE%) e a capacidade de carregamento (CC%) do sistema híbrido SF-PNVCLB₂, dois parâmetros cruciais para determinar o desempenho do

material como potencial sistema de liberação controlada de moléculas bioativas. A eficiência de encapsulamento foi de $42,60 \pm 4,3\%$ um valor satisfatório para nanopartículas à base de polímeros hidrofílicos e proteínas, cujas interações com o meio aquoso podem dificultar a retenção eficiente de moléculas ativas. Esse resultado indica que a matriz híbrida formada entre fibroína e PNVCL apresenta afinidade e compatibilidade química adequadas para acomodar e reter os agentes encapsulados, o que pode estar associado à presença de domínios interativos e à reorganização da estrutura interna promovida pelo processo de graftização.

A capacidade de carregamento obtida foi de $3,87 \pm 2,3\%$ refletindo a fração do composto ativo incorporado em relação à massa total das nanopartículas. Embora esse valor seja considerado moderado, ele é coerente com formulações baseadas em materiais naturais e pode ser suficiente para aplicações que requerem liberação sustentada ou doses reduzidas, como em terapias localizadas ou de ação prolongada. Ainda assim, esse parâmetro pode ser otimizado por meio do ajuste das condições de encapsulamento, da concentração do agente ativo ou da funcionalização adicional da superfície do sistema híbrido.

A Figura 14 apresenta o perfil de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2} em duas condições de temperatura: 25 °C e 40 °C, ao longo de 72 horas. Os resultados obtidos revelam um comportamento termorresponsivo evidente, característico de sistemas com transição tipo LCST, diretamente associado à presença do polímero funcionalizado PNVCL na matriz do híbrido.

A liberação em 25 °C, temperatura abaixo da LCST, apresenta um padrão controlado e limitado, alcançando cerca de 45% de liberação cumulativa ao final do período de incubação. Esse comportamento indica que, em condições onde as cadeias poliméricas permanecem hidratadas e expandidas, o sistema retém a curcumina de forma eficiente, funcionando como uma barreira física à difusão.

Em contraste, na condição de 40 °C, acima da temperatura crítica de transição do polímero, observa-se uma liberação significativamente superior, ultrapassando 60% após 72 horas. Esse aumento expressivo está diretamente relacionado ao colapso das cadeias de PNVCL, que se tornam hidrofóbicas e provocam alterações estruturais na rede polimérica-proteica. Esse processo resulta na expulsão do agente encapsulado e em maior permeabilidade da matriz, promovendo uma liberação mais acentuada da curcumina.

Além disso, é possível observar que a diferença entre as duas curvas se estabelece logo nas primeiras horas, evidenciando que o sistema responde rapidamente ao estímulo térmico. Essa característica é altamente desejável para aplicações termossensíveis, como liberação localizada de

fármacos em regiões inflamadas, onde a temperatura local se eleva, ou em sistemas inteligentes de liberação controlada por temperatura externa.

Portanto, os dados representados na Figura 14 confirmam que o sistema SF-PNVCL_{B2} atua como uma plataforma de liberação controlada e termorresponsiva, com potencial para aplicações em terapias dirigidas.

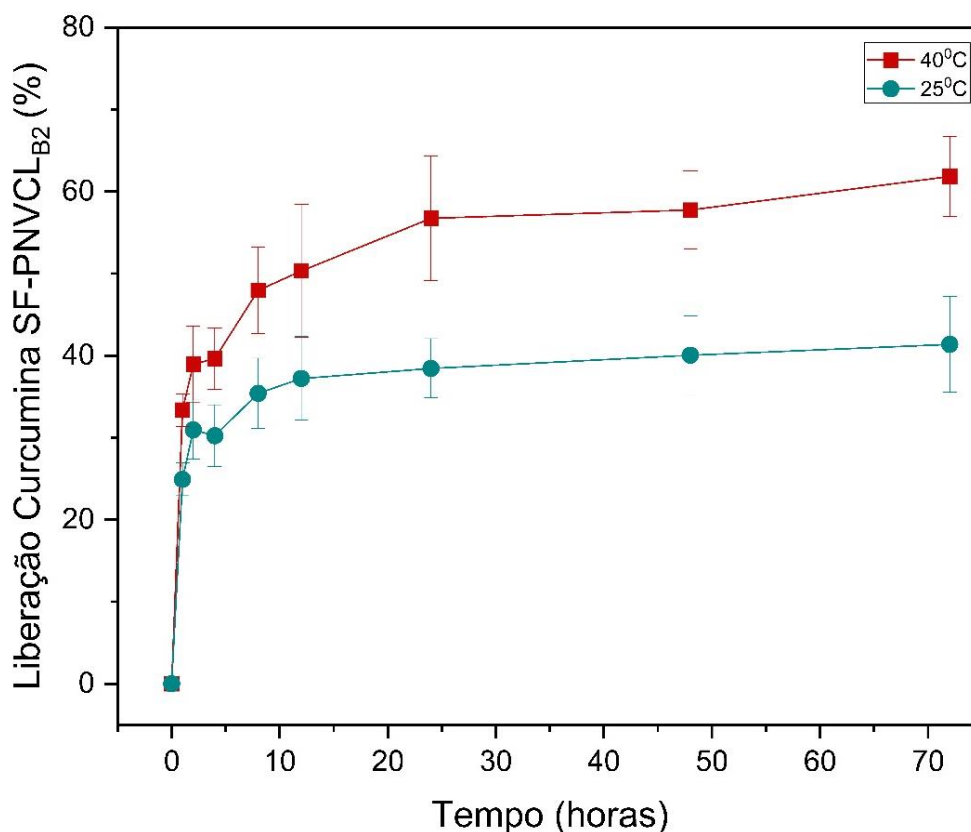


Figura 14 Perfil de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2} em diferentes temperaturas (25 °C e 40 °C) ao longo de 72 horas.

4.4.4. ESTUDO CINÉTICO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA DO SISTEMA SF-PNVCL_{B2}

A Tabela 4 apresenta os parâmetros ajustados para diferentes modelos matemáticos aplicados à cinética de liberação da curcumina a partir do sistema SF-PNVCL_{B2}, em duas condições de temperatura: 25 °C (abaixo da LCST) e 40 °C (acima da LCST). O objetivo da análise é identificar o

modelo que melhor descreve o perfil de liberação da curcumina e compreender o mecanismo predominante envolvido nesse processo.

Inicialmente, modelos clássicos como Ordem Zero, Primeira Ordem, Higuchi e Hixson–Crowell apresentaram valores de R^2 relativamente baixos, especialmente abaixo de 0,85, sugerindo um baixo grau de ajuste aos dados experimentais. Isso indica que a liberação da curcumina não segue uma simples difusão de ordem constante, nem um processo controlado exclusivamente por erosão da matriz ou dissolução superficial.

Em contraste, os modelos Korsmeyer–Peppas, Weibull e Gompertz mostraram excelentes coeficientes de correlação (R^2) em ambas as temperaturas, com valores superiores a 0,98, destacando-se como os mais adequados para descrever o comportamento do sistema. Em particular, o modelo de Gompertz obteve os maiores valores de R^2 (0,994 a 40 °C e 0,989 a 25 °C), sugerindo que esse modelo é o que melhor representa a cinética de liberação da curcumina no sistema estudado. Esse modelo é amplamente utilizado em sistemas de liberação controlada onde há crescimento lento inicial, seguido por uma aceleração e posterior estabilização, o que se encaixa com o perfil observado experimentalmente.

O modelo Korsmeyer–Peppas, por sua vez, forneceu uma interpretação do mecanismo de liberação. O parâmetro n foi inferior a 0,45 em ambas as temperaturas ($n = 0,143$ a 40 °C e $n = 0,109$ a 25 °C), o que indica um mecanismo de difusão Fickiana, ou seja, o transporte da curcumina ocorre predominantemente por difusão através da matriz polimérica. Essa conclusão é coerente com a natureza do sistema híbrido, em que a reorganização estrutural do PNVCL permite a liberação gradual da curcumina.

No modelo Weibull, os valores de α e β descrevem a forma da curva de liberação e também indicam um perfil de liberação sigmoidal moderado, com liberação acelerada próxima da LCST. O parâmetro T_i , apenas presente na equação de 40 °C, sugere um pequeno tempo de indução inicial antes do início efetivo da liberação mais intensa, condizente com o comportamento termorresponsivo do sistema. Portanto, a análise dos dados apresentados na Tabela 4 confirma que a liberação da curcumina pelo sistema SF-PNVCL_{B2} ocorre por difusão controlada, e é intensificada acima da LCST, sendo melhor descrita pelo modelo de Gompertz, seguido por Weibull e Korsmeyer–Peppas.

Tabela 4 Parâmetros ajustados dos modelos matemáticos aplicados à cinética de liberação da curcumina a partir do sistema SF-PNVCL_{B2} nas temperaturas de 25 °C e 40 °C

	Modelo Matemático	Parâmetros (40°C)	Parâmetros (25 °C)	Equação
SF-PNVCL _{B2} -Cur	<i>Ordem Zero</i>	$k_0 = 1,187 / R^2 = -1,751$	$k_0 = 0,815 / R^2 = -2,391$	$F = k_0 \cdot t$
	<i>Primeira Ordem</i>	$k_1 = 0,0267 / R^2 = -0,835$	$k_1 = 0,015 / R^2 = -1,896$	$F = 100 \cdot [1 - e^{-k_1 \cdot t}]$
	<i>Higuchi</i>	$k_H = 9,828 / R^2 = -0,0317$	$k_H = 6,871 / R^2 = -0,422$	$F = k_H \cdot t^{0.5}$
	<i>Hixson–Crowell</i>	$k_{HC} = 0,007 / R^2 = -1,110$	$k_{HC} = 0,003 / R^2 = -2,111$	$F = 100 \cdot [1 - 1 - k_{HC} \cdot t^3]$
	<i>Korsmeyer–Peppas</i>	$k_{KP} = 34,275 / n = 0,143$ $R^2 = 0,991$	$k_{KP} = 26,913 / n = 0,109$ $R^2 = 0,985$	$F = k_{KP} \cdot t^n$
	<i>Weibull</i>	$\alpha = 2,271 / \beta = 0,183$ $T_i = 0,4$ $R^2 = 0,993$	$\alpha = 3,074 / \beta = 0,123$ $T_i = 0,6$ $R^2 = 0,990$	$F = 100 \cdot \left[1 - e^{-\frac{(t-T_i)^\beta}{\alpha}} \right]$
	<i>Gompertz</i>	$\alpha = 1,112 / \beta = 0,445$ $R^2 = 0,994$	$\alpha = 1,321 / \beta = 0,229$ $R^2 = 0,989$	$F = 100 \cdot e^{-\alpha \cdot e^{-\beta \cdot \log(t)}}$

A Figura 15 apresenta os ajustes dos modelos matemáticos Weibull, Korsmeyer–Peppas e Gompertz aos dados experimentais de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}, analisados em duas temperaturas distintas: 40 °C (acima da LCST) e 25 °C (abaixo da LCST). Os gráficos fornecem uma representação visual clara da qualidade do ajuste de cada modelo frente aos dados obtidos, permitindo avaliar a adequação teórica à cinética de liberação observada experimentalmente.

Nos gráficos da esquerda (A, C, E), que correspondem à temperatura de 40 °C, é possível notar que todos os modelos testados foram capazes de reproduzir satisfatoriamente a curva experimental, com excelente correlação entre os dados experimentais (pontos azuis) e os valores previstos (curvas vermelhas). Dentre eles, o modelo de Gompertz (E) apresenta o melhor desempenho visual e estatístico, refletindo com precisão a rápida liberação inicial seguida por um platô, comportamento típico de sistemas com transição térmica e liberação controlada por estímulo.

Nos gráficos da direita (B, D, F), que representam a condição a 25 °C, observa-se uma liberação mais contida, como esperado para um sistema abaixo da sua temperatura crítica de transição (LCST). Novamente, o modelo de Gompertz (F) se destaca, fornecendo uma curva suavemente ajustada aos dados, representando fielmente a liberação lenta e progressiva da curcumina nesse intervalo térmico.

No geral, a figura 15 confirma os resultados apresentados anteriormente na Tabela 4: os três modelos se ajustam bem aos dados, mas o modelo de Gompertz se destaca como o mais robusto e representativo da liberação térmica da curcumina neste sistema híbrido funcionalizado. Esses achados reforçam o potencial do SF-PNVCL_{B2} como uma plataforma de liberação controlada sensível à temperatura, com comportamento previsível e eficiente.

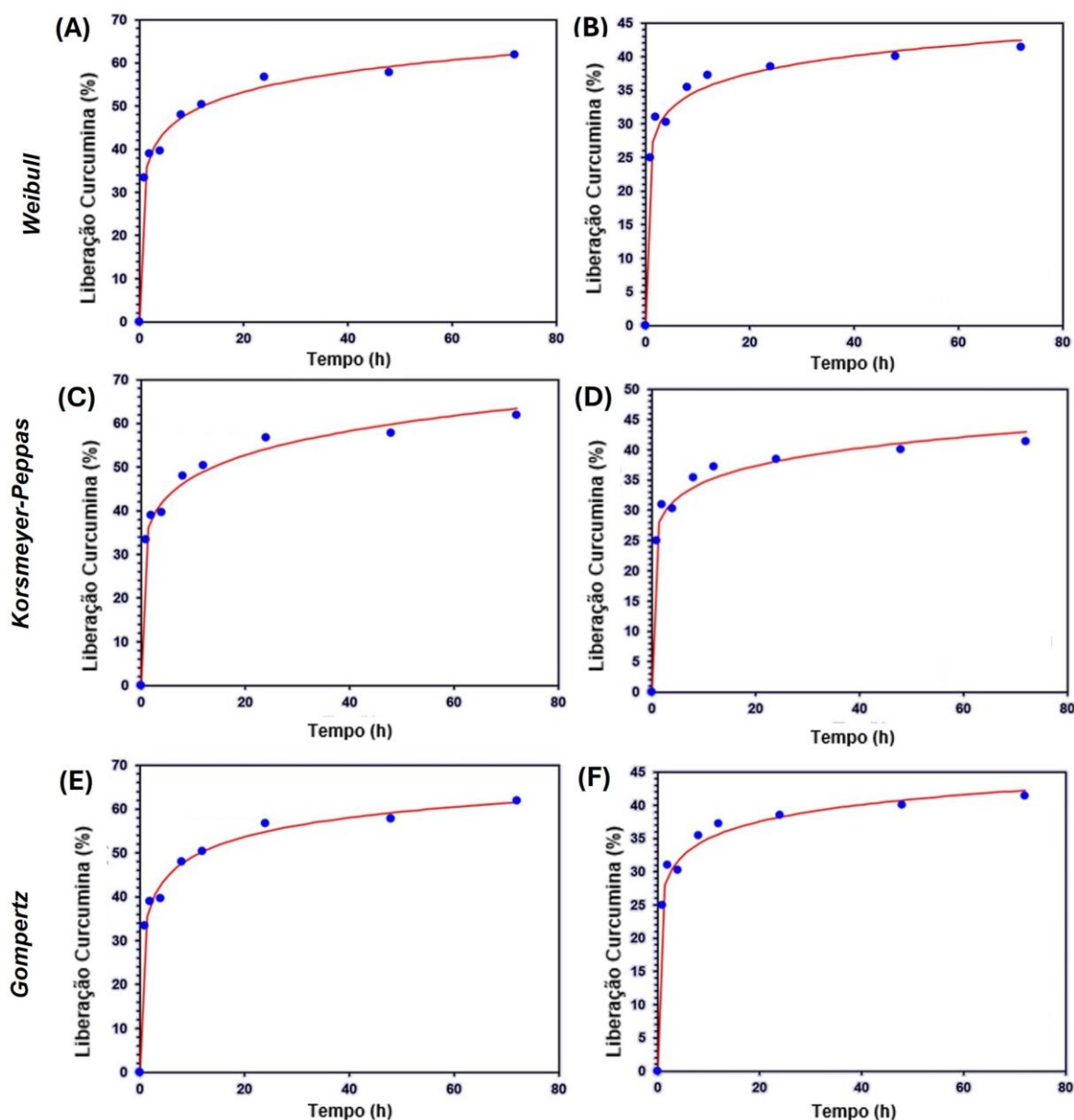


Figura 15 Ajuste dos modelos matemáticos Weibull, Korsmeyer–Peppas e Gompertz aos dados experimentais de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}, em duas condições de temperatura: 40 °C (A, C, E) e 25 °C (B, D, F).

4.5. ESTUDO *IN VITRO* DA BIOCOMPATIBILIDADE E CITOTOXICIDADE

4.5.1. ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS SF-PNVCL_{A1} E SF-PNVCL_{B2} EM CÉLULAS NORMAIS HUMANAS (MRC-5)

A avaliação da citotoxicidade basal das nanopartículas SF-PNVCL_{A1} sem curcumina foi realizada por citometria de fluxo, com o objetivo de verificar se o material híbrido apresenta toxicidade intrínseca às células, independentemente do agente encapsulado. A análise incluiu marcadores de

integridade celular, como dispersão lateral (SSC), dispersão frontal (FSC) e fluorescência (V450-A), com discriminação entre células viáveis e mortas. Os resultados estão apresentados na Figura 16.

No gráfico à esquerda, observa-se um espalhamento típico de células coradas com um marcador de viabilidade, permitindo distinguir claramente a população de células vivas (Live Cells), com baixa fluorescência, da população de células mortas (Dead Cells), com sinal mais intenso em V450-A. A maioria dos eventos se concentra na região de células vivas, o que sugere baixa toxicidade das nanopartículas híbridas sem curcumina.

O histograma central, que representa a distribuição da fluorescência (canal V450-A), mostra um único pico bem definido, com a maioria das células apresentando intensidade baixa a moderada de fluorescência, novamente compatível com alta viabilidade celular.

No gráfico à direita (FSC-A vs SSC-A), as células tratadas com SF-PNVCL_{A1} distribuem-se de forma similar à de uma população celular saudável, sem alterações significativas na morfologia ou aumento de granularidade, o que também indica ausência de indução de estresse ou morte celular pelo material em sua forma livre do agente terapêutico.

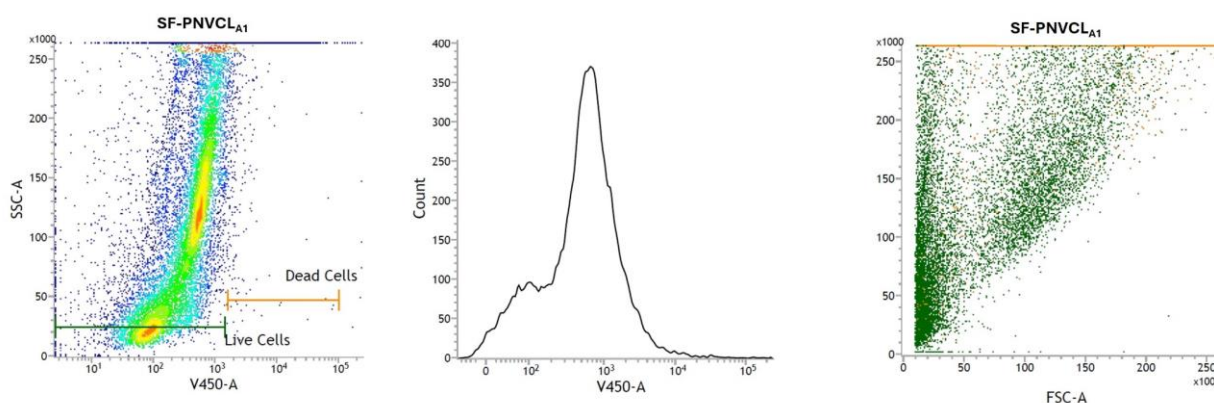


Figura 16 Análise de citotoxicidade por citometria de fluxo das nanopartículas híbridas SF-PNVCL_{A1} sem curcumina (controle em branco) em células MRC-5 (fibroblastos pulmonares humanos normais).

A avaliação da citotoxicidade do sistema SF-PNVCL_{A1} carregado com curcumina (SF-PNVCL_{A1}-Cur) foi realizada e os resultados encontram-se representados na Figura 17. O gráfico de dispersão SSC-A x V450-A (à esquerda) mostra uma concentração predominante de eventos na região correspondente às células vivas, indicando que a presença da curcumina encapsulada não induziu toxicidade significativa nas células MRC-5. O histograma central de fluorescência (V450-A) apresenta um pico estreito, centrado em baixa intensidade, característico de populações celulares viáveis e estáveis. O gráfico FSC-A x SSC-A (à direita) exibe uma distribuição celular típica de culturas saudáveis, sem evidências de alterações morfológicas, como aumento de granularidade ou fragmentação celular, o que reforça a ausência de processos de apoptose ou necrose induzidos pelo

tratamento. Esses resultados indicam que o sistema SF-PNVCL_{A1}-Cur não apresenta citotoxicidade frente à linhagem MRC-5, mesmo na presença da curcumina o que confirma sua biocompatibilidade.

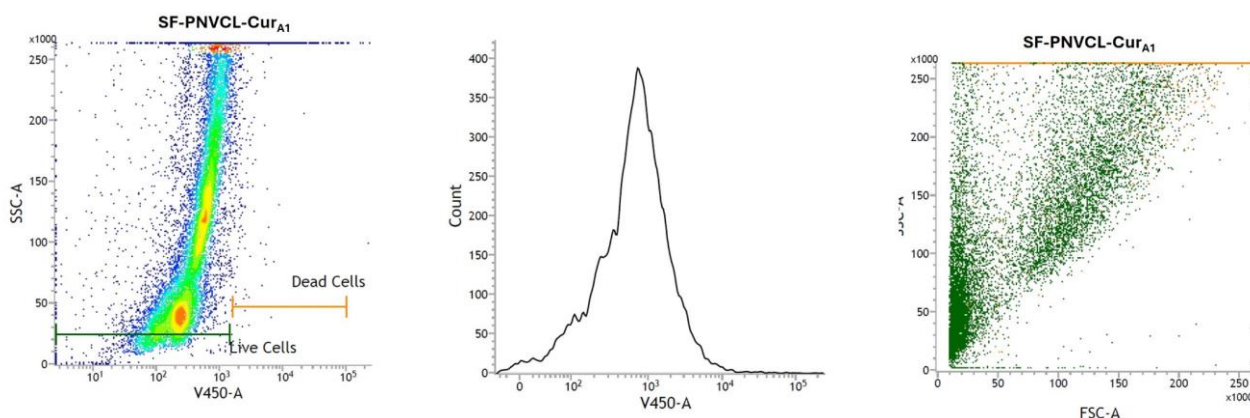


Figura 17 Análise de citotoxicidade por citometria de fluxo das nanopartículas híbridas SF-PNVCL_{A1} carregadas com curcumina (SF-PNVCL_{A1}-Cur) em células MRC-5 (fibroblastos pulmonares humanos normais).

As Figuras 18 e 19 mostram os resultados obtidos por citometria de fluxo com coloração por 7-AAD, realizados para avaliar a viabilidade celular após tratamento de células MRC-5 (fibroblastos pulmonares humanos) com o sistema híbrido SF-PNVCL_{B2} (Figura 18) e carregada com curcumina, SF-PNVCL_{B2}-Cur (Figura 19).

A análise permitiu diferenciar células viáveis (negativas para 7-AAD) das células mortas (positivas), baseando-se na integridade da membrana plasmática. Na Figura 18, observa-se que a maior parte das células MRC-5 tratadas com SF-PNVCL_{B2} permanece viável, com baixa incidência de morte celular, o que evidencia a biocompatibilidade do sistema híbrido com células normais.

Na Figura 19, referente ao sistema contendo curcumina encapsulada (SF-PNVCL_{B2}-Cur), observa-se um discreto aumento na população de células mortas, porém sem diferença significativa em relação ao grupo tratado com o sistema não carregado. Esse resultado sugere que, embora a curcumina seja um composto bioativo com reconhecido potencial terapêutico, sua presença no sistema híbrido não comprometeu a viabilidade das células MRC-5, mantendo a biocompatibilidade do material.

Ambos os sistemas mantiveram a morfologia celular intacta, como evidenciado nos gráficos FSC-A vs. SSC-A, reforçando que não há danos físicos significativos às células. Esses resultados confirmam que o sistema híbrido SF-PNVCL_{B2} apresenta excelente perfil de biocompatibilidade em células MRC-5, e que sua funcionalização com curcumina resulta em efeito modulável, adequado para futuras aplicações terapêuticas.

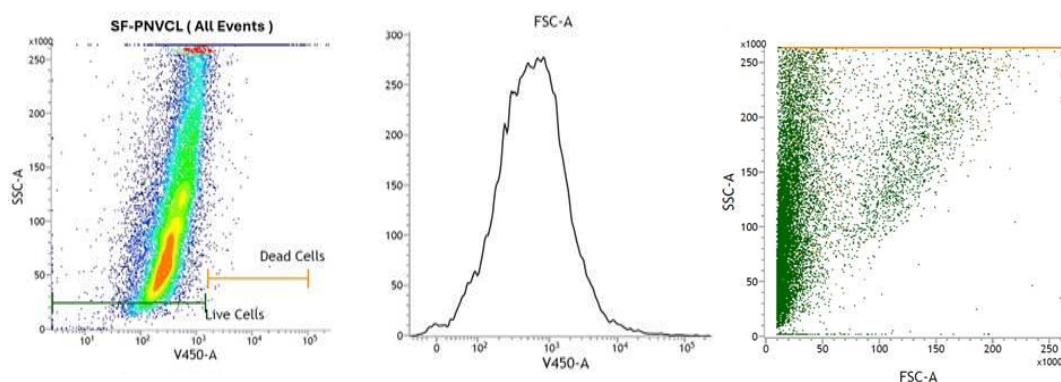


Figura 18 Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo com coloração por 7-AAD em células MRC-5 tratadas com o sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}.

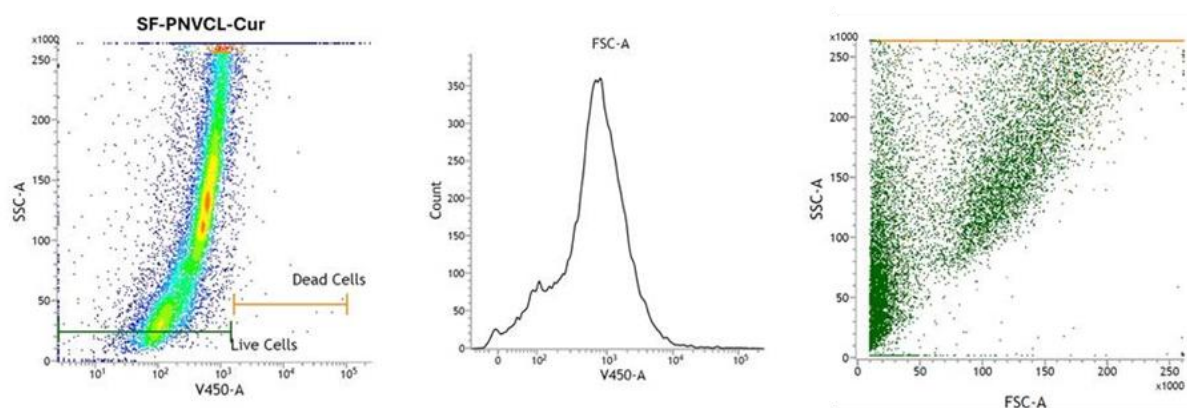


Figura 19 Análise de viabilidade celular por citometria de fluxo com coloração por 7-AAD em células MRC-5 tratadas com SF-PNVCL_{B2} com curcumina (SF-PNVCL_{B2}-Cur)

4.5.2. ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DOS SISTEMAS HÍBRIDOS SF-PNVCL_{A1} SF-PNVCL_{B2} EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA MURINO (4T1)

A Figura 20 apresenta a análise da citotoxicidade do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1} carregado com curcumina ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) em células tumorais da linhagem 4T1, por meio de citometria de fluxo utilizando os marcadores fluorescentes iodeto de propídio (PI) e 7-AAD (V450-A), os quais permitem avaliar a integridade da membrana celular e, consequentemente, a viabilidade celular após o tratamento.

O histograma apresentado na Figura 20A refere-se à fluorescência emitida pelo iodeto de propídio (PI), marcador que se intercala ao DNA de células com membranas comprometidas. Observa-se a presença de um pico acentuado à esquerda, correspondente à população de células viáveis com baixa fluorescência, e um segundo pico, menos intenso, à direita, indicando uma fração de células mortas que internalizaram o corante.

Na Figura 20B, o histograma representa a emissão de fluorescência associada ao marcador 7-AAD (canal V450-A). O perfil bimodal também revela duas populações celulares distintas: células viáveis com baixa fluorescência e células mortas com maior intensidade de fluorescência. A presença de um segundo pico evidente reforça a ocorrência de dano celular após o tratamento.

As Figuras 20C e 20D exibem gráficos de dispersão (dot plots), sendo a primeira (20C) colorida com escala de densidade e a segunda (20D) no formato de contorno, facilitando a visualização da distribuição dos eventos celulares de acordo com a fluorescência de ambos os marcadores. As células foram classificadas em quatro quadrantes com base na análise por citometria de fluxo. O quadrante LL (Lower Left – inferior esquerdo) corresponde às células viáveis, que não apresentam marcação por corantes de morte celular. O quadrante UL (Upper Left – superior esquerdo) representa células em necrose tardia ou com dano parcial de membrana. Já o quadrante LR (Lower Right – inferior direito) indica células em estágio inicial de apoptose. Por fim, o quadrante UR (Upper Right – superior direito) corresponde às células mortas.

A distribuição majoritária dos eventos nos quadrantes LL (54,68%) e UR (38,21%) evidencia que, embora uma parte considerável das células tenha mantido viabilidade após o tratamento, o sistema SF-PNVCL_{A1}-Cur promoveu morte celular significativa. O acúmulo de eventos no quadrante UR confirma o potencial citotóxico do sistema.

A Figura 20E apresenta a consolidação estatística do experimento, totalizando 30.000 eventos analisados. Com base nesses dados, observa-se que 45,32% das células se encontram nos quadrantes UR, UL e LR — regiões associadas a diferentes estágios de morte celular ou comprometimento da integridade da membrana. Essa porcentagem representa a fração da população celular que sofreu algum grau de dano após o tratamento com o sistema SF-PNVCL_{A1}-Cur.

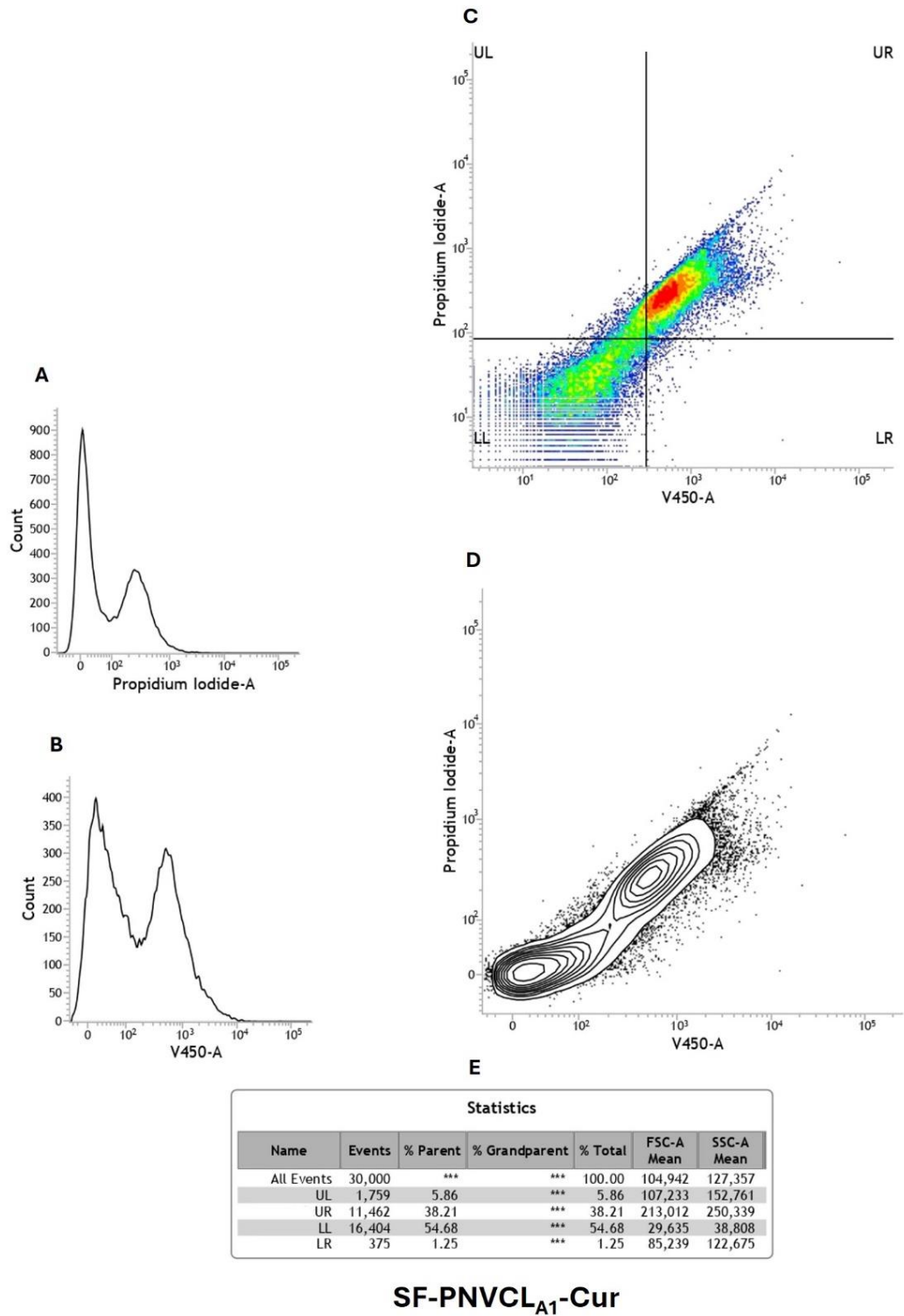


Figura 20 Análise da citotoxicidade de células 4T1 tratadas com o sistema híbrido SF-PNVCL_{A1} contendo curcumina (12,5 µg mL⁻¹) por citometria de fluxo. (A) Histograma de fluorescência para iodeto de propídio (PI). (B) Histograma de fluorescência para 7-AAD (V450-A). (C) Dot plot com distribuição dos eventos em quadrantes (UL, UR, LL, LR). (41D) Plot de contorno representando a densidade celular. (E) Estatísticas de distribuição celular.

A ação citotóxica do sistema híbrido SF-PNVCL_{B2}-Cur sobre células tumorais 4T1 foi avaliada por citometria de fluxo também. O histograma de fluorescência do PI (Figura 21A) revela duas populações distintas: uma com baixa captação do corante, indicativa de células viáveis, e outra com maior fluorescência, correspondente a células mortas. O mesmo padrão é observado na curva do 7-AAD (Figura 21B), reforçando a presença simultânea de células íntegras e comprometidas após o tratamento.

A distribuição dos eventos no gráfico de dispersão (Figura 21C) mostra que 50,52% das células permanecem viáveis (quadrante LL), enquanto os demais 49,48% apresentam comprometimento da integridade de membrana, distribuídos entre os quadrantes UR (29,22%), UL (20,17%) e LR (0,09%). O gráfico de contorno (Figura 21D) confirma visualmente essa tendência, destacando duas populações principais nos quadrantes LL e UR. Os dados estatísticos consolidados estão apresentados na tabela da Figura 21E. Esses resultados demonstram que o sistema SF-PNVCL_{B2}-Cur exerce um efeito citotóxico considerável, com quase metade da população celular afetada, mesmo em concentração moderada de curcumina (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

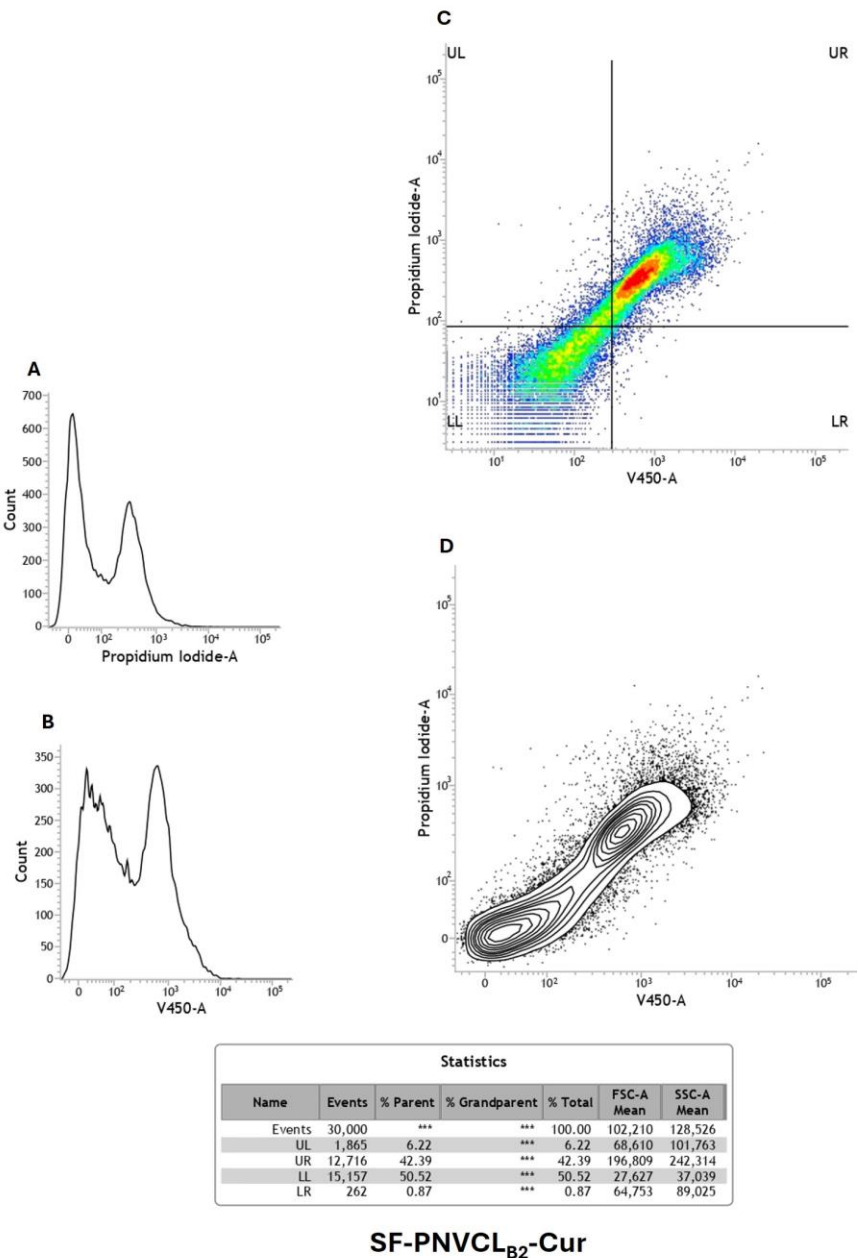


Figura 21 Análise de citotoxicidade do sistema SF-PNVCL_{B2}-Cur (12,5 µg mL⁻¹) sobre células 4T1 por citometria de fluxo com dupla marcação (iodeto de propídio – PI e 7-AAD – V450-A). (A) Histograma de fluorescência do iodeto de propídio. (B) Histograma de fluorescência do 7-AAD. (C) Gráfico de dispersão com distribuição dos eventos nos quadrantes UL (necrose tardia), UR (células mortas), LL (células viáveis) e LR (apoptose inicial). (D) Plot de contorno evidenciando a densidade celular em cada quadrante. (E) Tabela com estatísticas de distribuição celular.

A Figura 22 apresenta imagens das células antes do tratamento com os sistemas híbridos. Observa-se uma alta confluência celular, com morfologia típica de células aderentes, compatível com a linhagem tumoral utilizada (4T1).

As imagens apresentadas na Figura 22 correspondem a diferentes campos de visualização de células 4T1 cultivadas sob condições controle, ou seja, sem exposição aos sistemas híbridos SF–PNVCL. Na Figura 22A, observa-se um campo celular com confluência moderada, onde as células exibem morfologia típica da linhagem: fusiformes, alongadas e bem aderidas à superfície. O citoplasma é definido e os núcleos são visíveis, o que indica integridade celular e ausência de sinais de citotoxicidade. Na Figura 22B, o campo apresenta uma população celular mais densa, com aumento na proporção de células arredondadas, mas ainda sem perda evidente de adesão ou viabilidade. Essa imagem representa um estágio intermediário de crescimento, caracterizado por proliferação ativa e manutenção da morfologia tumoral característica da linhagem 4T1. Já a Figura 22C mostra uma área de alta confluência, com células distribuídas de forma mais compacta e uniforme. A morfologia permanece preservada, com poucos espaços intercelulares visíveis, sugerindo que o cultivo atingiu um estágio de crescimento avançado. Não se observam sinais de apoptose, lise celular ou alterações estruturais significativas, o que reforça que as culturas estavam em boas condições fisiológicas antes da aplicação dos sistemas híbridos.

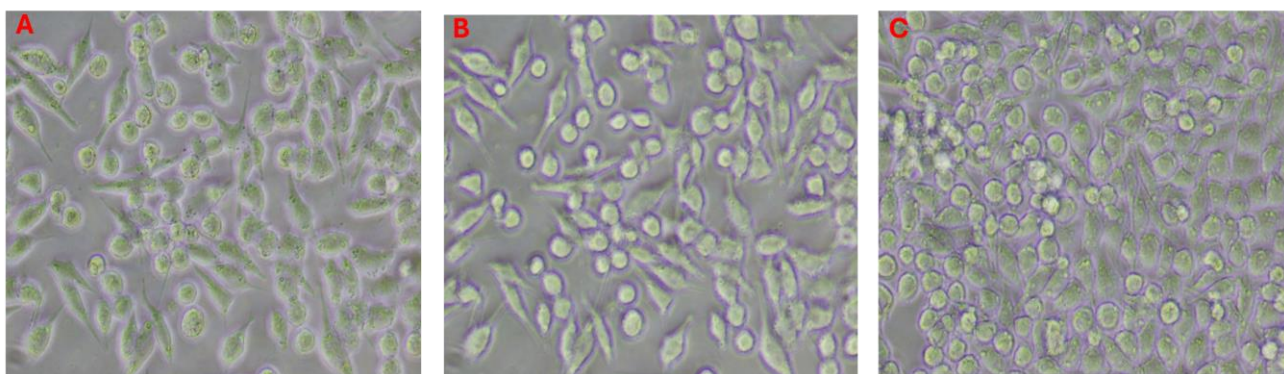


Figura 22. Imagens microscópicas das células da linhagem 4T1 antes do tratamento com os sistemas híbridos. Observa-se alta confluência celular e morfologia preservada, com células aderentes, alongadas e com citoplasma bem definido, características de um cultivo viável e saudável.

Em contraste, a Figura 23 mostra as células após o tratamento com os sistemas híbridos SF–PNVCL. Verifica-se uma redução expressiva na densidade celular, acompanhada de alterações morfológicas características de células em processo de morte.

Na Figura 23A, apesar da predominância de células arredondadas, retraídas e em processo de desintegração, ainda é possível identificar algumas células alongadas e aderidas, indicativas de sobrevivência parcial frente ao tratamento. No entanto, essas células representam uma minoria, e o campo é amplamente dominado por estruturas compatíveis com morte celular, células com morfologia

alterada. A Figura 23B exibe um campo ainda mais comprometido, com ausência de células viáveis aderidas e morfologia amplamente alterada. Na Figura 23C, mantém-se o padrão observado anteriormente, com predomínio de células arredondadas e fragmentadas. A presença de poucos núcleos intactos e a ausência de estruturas alongadas reforçam a hipótese de perda de adesão e morte celular.

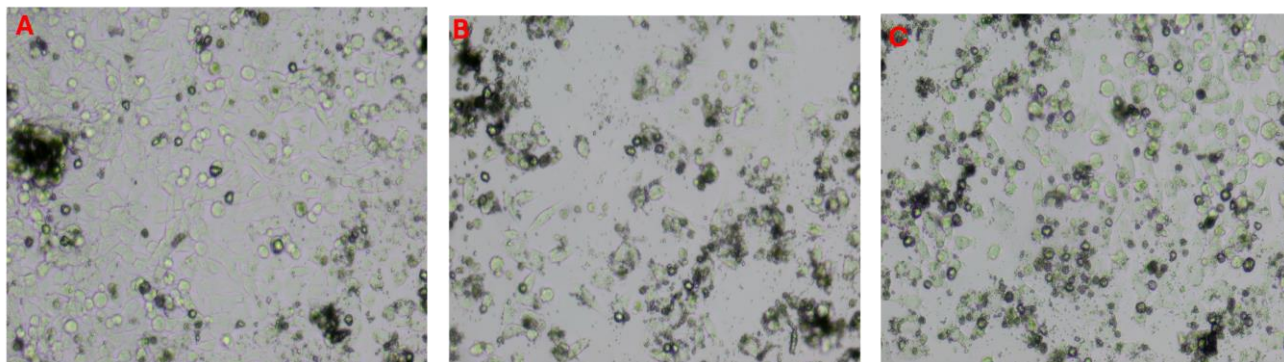


Figura 23. Imagens microscópicas das células da linhagem 4T1 após o tratamento com os sistemas híbridos SF-PNVCL. Nota-se uma redução expressiva da densidade celular, com alterações morfológicas evidentes.

5. CONCLUSÃO

A partir da síntese e caracterização do sistema híbrido SF-PNVCL_{A1}, foi possível desenvolver um sistema funcional baseado na graftização do polímero termorresponsivo PNVCL na matriz de fibroína de seda, resultando em um material com propriedades estruturais, físico-químicas e biológicas altamente promissoras para aplicações em sistemas de liberação controlada. A formação de nanopartículas homogêneas, com tamanho médio em torno de 200 nm e baixo índice de polidispersidade, aliada à responsividade térmica observada acima de 38 °C (LCST), demonstrou que o sistema é capaz de responder seletivamente a estímulos de temperatura, permitindo controle ativo sobre a liberação da curcumina.

A encapsulação da curcumina foi eficiente, com boa taxa de encapsulamento (EE%) e boa capacidade de carregamento (CC%), e os estudos de liberação mostraram que o sistema libera significativamente mais curcumina em temperaturas elevadas, comportamento compatível com aplicações terapêuticas inteligentes. Os ajustes cinéticos revelaram que modelos como Weibull e Gompertz descrevem adequadamente o perfil de liberação, reforçando a natureza multifásica e -complexa do sistema.

Ensaio de citotoxicidade por citometria de fluxo mostraram que o sistema não apresenta toxicidade significativa frente a células MRC-5, mesmo na presença da curcumina, destacando sua segurança e biocompatibilidade. Por outro lado, quando aplicado sobre células tumorais da linhagem 4T1, o sistema SF-PNVCLA₁-Cur a 12,5 µg mL⁻¹ promoveu morte celular considerável, com 45,32% da população total apresentando sinais de comprometimento ou morte, o sistema SF-PNVCLB₂-Cur induziu alterações importantes na viabilidade celular, com aproximadamente 49,48% das células apresentando dano ou morte celular. Esses resultados evidenciam a capacidade seletiva dos sistemas híbridos funcionalizados com curcumina, promovendo efeitos citotóxicos em células tumorais sem afetar significativamente células saudáveis.

Esses resultados demonstram que os sistemas híbridos constituem uma plataforma versátil, segura e eficaz para aplicações biomédicas. O presente trabalho, portanto, estabelece as bases para o uso da fibroína como matriz na síntese de materiais híbridos termorresponsivos, e abre perspectivas para o desenvolvimento de sistemas avançados de liberação com resposta modulada à temperatura, com potencial para atuação terapêutica localizada e controlada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi desenvolvido e caracterizado um conjunto de sistemas híbridos termossensíveis à base de fibroína de seda (SF) e poli(*N*-vinilcaprolactama) (PNVCL), com o objetivo de criar plataformas inovadoras para a liberação controlada de agentes terapêuticos. A conjugação entre a biocompatibilidade e versatilidade estrutural da proteína natural e o comportamento responsivo do polímero resultou em materiais promissores, cujas propriedades físico-químicas, térmicas e funcionais foram ajustadas de forma precisa às exigências de aplicações biomédicas. As análises realizadas comprovaram a formação de nanopartículas bem definidas, com tamanho médio compatível com sistemas de entrega, estabilidade coloidal satisfatória e sensibilidade térmica próxima à temperatura fisiológica.

Os sistemas desenvolvidos demonstraram notável capacidade de encapsular curcumina — um agente terapêutico com reconhecido potencial antitumoral — e promover sua liberação de maneira regulada por temperatura, simulando ambientes de hipertermia como os tecidos tumorais. A aplicação de modelos matemáticos à cinética de liberação revelou um comportamento previsível e controlado, enquanto os ensaios de citotoxicidade *in vitro* confirmaram a eficácia e seletividade dos sistemas frente à linhagem 4T1, com baixa toxicidade em células normais (MRC-5). Tais achados consolidam os sistemas SF–PNVCL como carreadores inteligentes, altamente promissores para terapias direcionadas.

No entanto, mais do que uma simples síntese de dados experimentais, esta tese representa a convergência entre ciência de fronteira, inovação e compromisso com a vida. Ao explorar o potencial de sistemas híbridos que respondem de forma inteligente ao ambiente biológico, este trabalho reafirma a Química como ciência central — aquela que une o natural ao sintético, o invisível ao funcional, e o conhecimento à esperança terapêutica. Que esta jornada científica, aqui encerrada, seja apenas o início de novas possibilidades. Recomenda-se, como continuidade, a realização de estudos *in vitro* mais amplos, ensaios *in vivo* e a aplicação do sistema a outros fármacos de interesse clínico, com vistas ao desenvolvimento de terapias mais eficazes, seguras e personalizadas.

REFERÊNCIAS - CAPÍTULO 1

1. Farokhi, M.; Mottaghitlab, F.; Reis, R.L.; Ramakrishna, S.; Kundu, S.C. Functionalized Silk Fibroin Nanofibers as Drug Carriers: Advantages and Challenges. *J. Control. Release* 2020, 321, 324–347. [CrossRef] [PubMed]
2. Yamaguchi, K.; Kikuchi, Y.; Takagi, T.; Kikuchi, A.; Oyama, F.; Shimura, K.; Mizuno, S. Primary Structure of the Silk Fibroin Light Chain Determined by CDNA Sequencing and Peptide Analysis. *J. Mol. Biol.* 1989, 210, 127–139. [CrossRef] [PubMed]
3. Neubauer, V.J.; Döbl, A.; Scheibel, T. Silk-Based Materials for Hard Tissue Engineering. *Materials* 2021, 14, 674. [CrossRef] [PubMed]
4. Xu, Z.; Gao, W.; Bai, H. Silk-Based Bioinspired Structural and Functional Materials. *iScience* 2022, 25, 103940. [CrossRef] [PubMed]
5. Tomeh, M.A.; Hadianamrei, R.; Zhao, X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Drug and Gene Delivery. *Pharmaceutics* 2019, 11, 494. [CrossRef]
6. Nguyen, T.P.; Nguyen, Q.V.; Nguyen, V.-H.; Le, T.-H.; Huynh, V.Q.N.; Vo, D.-V.N.; Trinh, Q.T.; Kim, S.Y.; Le, Q. Van Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Polymers* 2019, 11, 1933. [CrossRef]
7. Zhao, Z.; Li, Y.; Xie, M.-B. Silk Fibroin-Based Nanoparticles for Drug Delivery. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 4880–4903. [CrossRef]
8. Paladini, F.; Pollini, M. Novel Approaches and Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Focus on Silk Fibroin. *Materials* 2022, 15, 6952. [CrossRef]
9. Sun, W.; Gregory, D.A.; Tomeh, M.A.; Zhao, X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 1499. [CrossRef]
10. Li, G.; Sun, S. Silk Fibroin-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Molecules* 2022, 27, 2757. [CrossRef]
11. Vidya, M.; Rajagopal, S. Silk Fibroin: A Promising Tool for Wound Healing and Skin Regeneration. *Int. J. Polym. Sci.* 2021, 2021, 9069924. [CrossRef]
12. Mazurek, Ł.; Szudzik, M.; Rybka, M.; Konop, M. Silk Fibroin Biomaterials and Their Beneficial Role in Skin Wound Healing. *Biomolecules* 2022, 12, 1852. [CrossRef] [PubMed]
13. Bari, E.; Di Gravina, G.M.; Scocozza, F.; Perteghella, S.; Frongia, B.; Tengattini, S.; Segale, L.; Torre, M.L.; Conti, M. Silk Fibroin Bioink for 3D Printing in Tissue Regeneration: Controlled Release of MSC Extracellular Vesicles. *Pharmaceutics* 2023, 15, 383. [CrossRef]
14. Kim, S.H.; Hong, H.; Ajiteru, O.; Sultan, M.T.; Lee, Y.J.; Lee, J.S.; Lee, O.J.; Lee, H.; Park, H.S.; Choi, K.Y.; et al. 3D Bioprinted Silk Fibroin Hydrogels for Tissue Engineering. *Nat. Protoc.* 2021, 16, 5484–5532. [CrossRef]

15. Kambe, Y. Functionalization of Silk Fibroin-Based Biomaterials for Tissue Engineering. *Polym. J.* 2021, 53, 1345–1351. [CrossRef]
16. Wu, R.; Li, H.; Yang, Y.; Zheng, Q.; Li, S.; Chen, Y. Bioactive Silk Fibroin-Based Hybrid Biomaterials for Musculoskeletal Engineering: Recent Progress and Perspectives. *ACS Appl. Bio Mater.* 2021, 4, 6630–6646. [CrossRef]
17. Wang, F.; Wu, H.; Venkataraman, V.; Hu, X. Silk Fibroin-Poly(Lactic Acid) Biocomposites: Effect of Protein-Synthetic Polymer Interactions and Miscibility on Material Properties and Biological Responses. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 104, 109890. [CrossRef]
18. Maziz, A.; Leprette, O.; Boyer, L.; Blatché, C.; Bergaud, C. Tuning the Properties of Silk Fibroin Biomaterial via Chemical Cross-Linking. *Biomed. Phys. Eng. Express* 2018, 4, 065012. [CrossRef]
19. Janani, G.; Kumar, M.; Chouhan, D.; Moses, J.C.; Gangrade, A.; Bhattacharjee, S.; Mandal, B.B. Insight into Silk-Based Biomaterials: From Physicochemical Attributes to Recent Biomedical Applications. *ACS Appl. Bio Mater.* 2019, 2, 5460–5491. [CrossRef]
20. Kundu, J.; Poole-Warren, L.A.; Martens, P.; Kundu, S.C. Silk Fibroin/Poly(Vinyl Alcohol) Photocrosslinked Hydrogels for Delivery of Macromolecular Drugs. *Acta Biomater.* 2012, 8, 1720–1729. [CrossRef]
21. Xia, Y.; Lu, Y. Fabrication and Properties of Conductive Conjugated Polymers/Silk Fibroin Composite Fibers. *Compos. Sci. Technol.* 2008, 68, 1471–1479. [CrossRef]
22. Saleem, M.; Rasheed, S.; Yougen, C. Silk Fibroin/Hydroxyapatite Scaffold: A Highly Compatible Material for Bone Regeneration. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2020, 21, 242–266. [CrossRef] [PubMed]
23. Cheng, Y.; Cheng, G.; Xie, C.; Yin, C.; Dong, X.; Li, Z.; Zhou, X.; Wang, Q.; Deng, H.; Li, Z. Biomimetic Silk Fibroin Hydrogels Strengthened by Silica Nanoparticles Distributed Nanofibers Facilitate Bone Repair. *Adv. Healthc. Mater.* 2021, 10, 2001646. [CrossRef] [PubMed]
24. Maleki, H.; Shahbazi, M.-A.; Montes, S.; Hosseini, S.H.; Eskandari, M.R.; Zaunschirm, S.; Verwanger, T.; Mathur, S.; Milow, B.; Krammer, B.; et al. Mechanically Strong Silica-Silk Fibroin Bioaerogel: A Hybrid Scaffold with Ordered Honeycomb Micromorphology and Multiscale Porosity for Bone Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, 11, 17256–17269. [CrossRef]
25. Xu, Z.; Shi, L.; Yang, M.; Zhu, L. Preparation and Biomedical Applications of Silk Fibroin-Nanoparticles Composites with Enhanced Properties—A Review. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 95, 302–311. [CrossRef]
26. Guo, L.; Chen, S. Facile Synthesis of Gold Nanorod-Decorated Silk Fibroin Spheres with

- Enhanced NIR-Sensitive Photo-Thermal Activity. *Optik* 2019, 188, 193–199. [CrossRef]
27. Yu, H.; Li, Y.; Zhang, Z.; Ren, J.; Zhang, L.; Xu, Z.; Kang, Y.; Xue, P. Silk Fibroin-Capped Metal-Organic Framework for Tumor-Specific Redox Dyshomeostasis Treatment Synergized by Deoxygenation-Driven Chemotherapy. *Acta Biomater.* 2022, 138, 545–560. [CrossRef]
 28. Seib, F.P.; Jones, G.T.; Rnjak-Kovacina, J.; Lin, Y.; Kaplan, D.L. PH-Dependent Anticancer Drug Release from Silk Nanoparticles. *Adv. Healthc. Mater.* 2013, 2, 1606–1611. [CrossRef]
 29. Mane, P.C.; Shinde, M.D.; Varma, S.; Chaudhari, B.P.; Fatehmulla, A.; Shahabuddin, M.; Amalnerkar, D.P.; Aldhafiri, A.M.; Chaudhari, R.D. Highly Sensitive Label-Free Bio-Interfacial Colorimetric Sensor Based on Silk Fibroin-Gold Nanocomposite for Facile Detection of Chlorpyrifos Pesticide. *Sci. Rep.* 2020, 10, 4198. [CrossRef]
 30. Zhu, G.; Sun, Z.; Hui, P.; Chen, W.; Jiang, X. Composite Film with Antibacterial Gold Nanoparticles and Silk Fibroin for Treating Multidrug-Resistant, *E. Coli* -Infected Wounds. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2021, 7, 1827–1835. [CrossRef]
 31. Majumder, S.; Ranjan Dahiya, U.; Yadav, S.; Sharma, P.; Ghosh, D.; Rao, G.; Rawat, V.; Kumar, G.; Kumar, A.; Srivastava, C. Zinc Oxide Nanoparticles Functionalized on Hydrogel Grafted Silk Fibroin Fabrics as Efficient Composite Dressing. *Biomolecules* 2020, 10, 710. [CrossRef] [PubMed]
 32. Liu, Q.; Feng, L.; Chen, Z.; Lan, Y.; Liu, Y.; Li, D.; Yan, C.; Xu, Y. Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Labeled Silk Fibroin/Hydroxyapatite Multifunctional Scaffold Loaded with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Bone Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020, 8, 697. [CrossRef] [PubMed]
 33. Zou, X.; Jiang, Z.; Li, L.; Huang, Z. Selenium Nanoparticles Coated with PH Responsive Silk Fibroin Complex for Fingolimod Release and Enhanced Targeting in Thyroid Cancer. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2021, 49, 83–95. [CrossRef] [PubMed]
 34. Wu, P.; Liu, Q.; Wang, Q.; Qian, H.; Yu, L.; Liu, B.; Li, R. Novel Silk Fibroin Nanoparticles Incorporated Silk Fibroin Hydrogel for Inhibition of Cancer Stem Cells and Tumor Growth. *Int. J. Nanomed.* 2018, 13, 5405–5418. [CrossRef]
 35. Zhang, L.; Yang, R.; Yu, H.; Xu, Z.; Kang, Y.; Cui, H.; Xue, P. MnO₂-Capped Silk Fibroin (SF) Nanoparticles with Chlorin E6 (Ce6) Encapsulation for Augmented Photo-Driven Therapy by Modulating the Tumor Microenvironment. *J. Mater. Chem. B* 2021, 9, 3677–3688. [CrossRef]
 36. Rockwood, D.N.; Preda, R.C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M.L.; Kaplan, D.L. Materials Fabrication from Bombyx Mori Silk Fibroin. *Nat. Protoc.* 2011, 6, 1612–1631. [CrossRef]
 37. Ranjana, R.; Asha, S.; Parushuram, N.; Harisha, K.S.; Shilpa, M.; Narayana, B.; Byrappa, K.; Sangappa, Y. Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles; AIP Publishing: Melville,

NY, USA, 2018; p. 020042.

38. Braga, S.S.; Silva, A.M.S. A New Age for Iron: Antitumoral Ferrocenes. *Organometallics* 2013, 32, 5626–5639. [CrossRef]
39. Shivananda, C.S.; Asha, S.; Madhukumar, R.; Satish, S.; Narayana, B.; Byrappa, K.; Wang, Y.; Sangappa, Y. Biosynthesis of Colloidal Silver Nanoparticles: Their Characterization and Antibacterial Activity. *Biomed. Phys. Eng. Express* 2016, 2, 035004. [CrossRef]
40. Patil, S.; George, T.; Mahadik, K. Green Synthesized Nanosilver Loaded Silk Fibroin Gel for Enhanced Wound Healing. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2015, 30, 30–36. [CrossRef]
41. Chirila, T.V.; Barnard, Z.; Zainuddin; Harkin, D.G.; Schwab, I.R.; Hirst, L.W. Bombyx Mori Silk Fibroin Membranes as Potential Substrata for Epithelial Constructs Used in the Management of Ocular Surface Disorders. *Tissue Eng. Part A* 2008, 14, 1203–1211. [CrossRef]
42. Zheng, Z.; Guo, S.; Liu, Y.; Wu, J.; Li, G.; Liu, M.; Wang, X.; Kaplan, D. Lithium-Free Processing of Silk Fibroin. *J. Biomater. Appl.* 2016, 31, 450–463. [CrossRef] [PubMed]
43. Wöltje, M.; Kölbel, A.; Aibibu, D.; Cherif, C. A Fast and Reliable Process to Fabricate Regenerated Silk Fibroin Solution from Degummed Silk in 4 Hours. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 10565. [CrossRef] [PubMed]
44. Ajisawa, A. Dissolution Aqueous of Silk Fibroin with Calciumchloride / Ethanol Solution. *J. Sericultural Sci. Jpn.* 1997, 67, 91–94.
45. Grabska-Zielin'ska, S.; Sionkowska, A. How to Improve Physico-Chemical Properties of Silk Fibroin Materials for Biomedical Applications—Blending and Cross-Linking of Silk Fibroin—A Review. *Materials* 2021, 14, 1510. [CrossRef]
46. Horan, R.L.; Antle, K.; Collette, A.L.; Wang, Y.; Huang, J.; Moreau, J.E.; Volloch, V.; Kaplan, D.L.; Altman, G.H. In Vitro Degradation of Silk Fibroin. *Biomaterials* 2005, 26, 3385–3393. [CrossRef]
47. Umuhoza, D.; Yang, F.; Long, D.; Hao, Z.; Dai, J.; Zhao, A. Strategies for Tuning the Biodegradation of Silk Fibroin-Based Materials for Tissue Engineering Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020, 6, 1290–1310. [CrossRef]
48. Reizabal, A.; Costa, C.M.; Pérez-Álvarez, L.; Vilas-Vilela, J.L.; Lanceros-Méndez, S. Silk Fibroin as Sustainable Advanced Material: Material Properties and Characteristics, Processing, and Applications. *Adv. Funct. Mater.* 2023, 33, 2210764. [CrossRef]
49. Altman, G.H.; Diaz, F.; Jakuba, C.; Calabro, T.; Horan, R.L.; Chen, J.; Lu, H.; Richmond, J.; Kaplan, D.L. Silk-Based Biomaterials. *Biomaterials* 2003, 24, 401–416. [CrossRef]
50. Kundu, B.; Rajkhowa, R.; Kundu, S.C.; Wang, X. Silk Fibroin Biomaterials for Tissue Regenerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 457–470. [CrossRef]

51. Murphy, A.R.; Kaplan, D.L. Biomedical Applications of Chemically-Modified Silk Fibroin. *J. Mater. Chem.* 2009, 19, 6443–6450. [CrossRef]
52. Buga, M.-R.; Zaharia, C.; Bălan, M.; Bressy, C.; Ziarelli, F.; Margaillan, A. Surface Modification of Silk Fibroin Fibers with Poly(Methyl Methacrylate) and Poly(Tributylsilyl Methacrylate) via RAFT Polymerization for Marine Antifouling Applications. *Mater. Sci. Eng. C* 2015, 51, 233–241. [CrossRef] [PubMed]
53. Furuzono, T.; Ishihara, K.; Nakabayashi, N.; Tamada, Y. Chemical Modification of Silk Fibroin with 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine. II. Graft-Polymerization onto Fabric through 2-Methacryloyloxyethyl Isocyanate and Interaction between Fabric and Platelets. *Biomaterials* 2000, 21, 327–333. [CrossRef] [PubMed]
54. Chai, S.; Wu, H.; Peng, X.; Tan, Z.; Cao, H.; Wei, L.; Mao, X.; Zhang, Z.; Zhou, F.; Zhang, Q.; et al. Progress in Research and Application of Modified Silk Fibroin Fibers. *Adv. Mater. Technol.* 2024, 9, 2301659. [CrossRef]
55. Monti, P.; Freddi, G.; Sampaio, S.; Tsukada, M.; Taddei, P. Structure Modifications Induced in Silk Fibroin by Enzymatic Treatments. A Raman Study. *J. Mol. Struct.* 2005, 744–747, 685–690. [CrossRef]
56. Li, M.; Ogiso, M.; Minoura, N. Enzymatic Degradation Behavior of Porous Silk Fibroin Sheets. *Biomaterials* 2003, 24, 357–365. [CrossRef]
57. Wang, K.; Ma, Q.; Zhou, H.-T.; Zhao, J.-M.; Cao, M.; Wang, S.-D. Review on Fabrication and Application of Regenerated Bombyx Mori Silk Fibroin Materials. *AUTEX Res. J.* 2023, 23, 164–183. [CrossRef]
58. Gore, P.M.; Naebe, M.; Wang, X.; Kandasubramanian, B. Progress in Silk Materials for Integrated Water Treatments: Fabrication, Modification and Applications. *Chem. Eng. J.* 2019, 374, 437–470. [CrossRef]
59. King, J.A.; Hine, P.J.; Baker, D.L.; Ries, M.E. Understanding the Dissolution of Cellulose and Silk Fibroin in 1-Ethyl-3- Methylimidazolium Acetate and Dimethyl Sulphoxide for Application in Hybrid Films. *Materials* 2024, 17, 5262. [CrossRef]
60. Zhang, M.; Ding, C.; Chen, L.; Huang, L. The Preparation of Cellulose/Collagen Composite Films Using 1-Ethyl-3- Methylimidazolium Acetate as a Solvent. *BioResources* 2013, 9, 756–771. [CrossRef]
61. Romero, M.; Mombrú, D.; Pignanelli, F.; Faccio, R.; Mombrú, A.W. Hybrid Organic-Inorganic Materials and Interfaces With Mixed Ionic-Electronic Transport Properties: Advances in Experimental and Theoretical Approaches. *Front. Chem.* 2022, 10, 892013. [CrossRef]
62. Faustini, M.; Nicole, L.; Ruiz-Hitzky, E.; Sanchez, C. History of Organic–Inorganic Hybrid

- Materials: Prehistory, Art, Science, and Advanced Applications. *Adv. Funct. Mater.* 2018, 28, 1704158. [CrossRef]
63. Lu, K. Hybrid Materials—A Review on Co-Dispersion, Processing, Patterning, and Properties. *Int. Mater. Rev.* 2020, 65, 463–501. [CrossRef]
 64. Saveleva, M.S.; Eftekhari, K.; Abalymov, A.; Douglas, T.E.L.; Volodkin, D.; Parakhonskiy, B.V.; Skirtach, A.G. Hierarchy of Hybrid Materials—The Place of Inorganics-in-Organics in It, Their Composition and Applications. *Front. Chem.* 2019, 7, 179. [CrossRef]
 65. Kickelbick, G. Hybrid Materials—Past, Present and Future. *Hybrid. Mater.* 2014, 1, 39–51. [CrossRef]
 66. Soares, D.C.F.; Domingues, S.C.; Viana, D.B.; Tebaldi, M.L. Polymer-Hybrid Nanoparticles: Current Advances in Biomedical Applications. *Biomed. Pharmacother.* 2020, 131, 110695. [CrossRef]
 67. Vasile, C.; Pamfil, D.; Stoleru, E.; Baican, M. New Developments in Medical Applications of Hybrid Hydrogels Containing Natural Polymers. *Molecules* 2020, 25, 1539. [CrossRef]
 68. Chen, C.; Ng, D.Y.W.; Weil, T. Polymer Bioconjugates: Modern Design Concepts toward Precision Hybrid Materials. *Prog. Polym.Sci.* 2020, 105, 101241. [CrossRef]
 69. Abuchowski, A.; van Es, T.; Palczuk, N.C.; Davis, F.F. Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol. *J. Biol. Chem.* 1977, 252, 3578–3581. [CrossRef]
 70. Maeda, H.; Takeshita, J.; Kanamaru, R. A Lipophilic Derivative of Neocarzinostatin a Polymer Conjugation of an Antitumor Protein Antibiotic. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1979, 14, 81–87. [CrossRef]
 71. Li, J.; Cao, F.; Yin, H.; Huang, Z.; Lin, Z.; Mao, N.; Sun, B.; Wang, G. Ferroptosis: Past, Present and Future. *Cell Death Dis.* 2020, 11, 88. [CrossRef]
 72. Jiang, W.; Shang, B.; Li, L.; Zhang, S.; Zhen, Y. Construction of a Genetically Engineered Chimeric Apoprotein Consisting of Sequences Derived from Lidamycin and Neocarzinostatin. *Anticancer. Drugs* 2016, 27, 24–28. [CrossRef] [PubMed]
 73. Truong, N.P.; Jones, G.R.; Bradford, K.G.E.; Konkolewicz, D.; Anastasaki, A. A Comparison of RAFT and ATRP Methods for Controlled Radical Polymerization. *Nat. Rev. Chem.* 2021, 5, 859–869. [CrossRef] [PubMed]
 74. Pollini, M.; Paladini, F. Bioinspired Materials for Wound Healing Application: The Potential of Silk Fibroin. *Materials* 2020, 13, 3361. [CrossRef] [PubMed]
 75. Hong, H.; Seo, Y.B.; Kim, D.Y.; Lee, J.S.; Lee, Y.J.; Lee, H.; Ajiteru, O.; Sultan, M.T.; Lee, O.J.; Kim, S.H.; et al. Digital Light Processing 3D Printed Silk Fibroin Hydrogel for Cartilage

- Tissue Engineering. *Biomaterials* 2020, 232, 119679. [CrossRef]
76. Gholipourmalekabadi, M.; Sapru, S.; Samadikuchaksaraei, A.; Reis, R.L.; Kaplan, D.L.; Kundu, S.C. Silk Fibroin for Skin Injury Repair: Where Do Things Stand? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2020, 153, 28–53. [CrossRef]
 77. van Uden, S.; Vanerio, N.; Catto, V.; Bonandrini, B.; Tironi, M.; Figliuzzi, M.; Remuzzi, A.; Kock, L.; Redaelli, A.C.L.; Greco, F.G.; et al. A Novel Hybrid Silk-Fibroin/Polyurethane Three-Layered Vascular Graft: Towards in Situ Tissue-Engineered Vascular Accesses for Haemodialysis. *Biomed. Mater.* 2019, 14, 025007. [CrossRef]
 78. Kim, J.H.; Kim, D.K.; Lee, O.J.; Ju, H.W.; Lee, J.M.; Moon, B.M.; Park, H.J.; Kim, D.W.; Lee, J.H.; Park, C.H. Osteoinductive Silk Fibroin/Titanium Dioxide/Hydroxyapatite Hybrid Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016, 82, 160–167. [CrossRef]
 79. Brito-Pereira, R.; Correia, D.M.; Ribeiro, C.; Francesko, A.; Etxebarria, I.; Pérez-Álvarez, L.; Vilas, J.L.; Martins, P.; Lanceros-Mendez, S. Silk Fibroin-Magnetic Hybrid Composite Electrospun Fibers for Tissue Engineering Applications. *Compos. Part B Eng.* 2018, 141, 70–75. [CrossRef]
 80. Xing, T.L.; Wang, H.J.; Li, Z.X.; Chen, G.Q. Surface Grafting Modification of Silk Fibroin by Atom Transfer Radical Polymerization. *Key Eng. Mater.* 2008, 373–374, 629–632. [CrossRef]
 81. Radu, I.-C.; Biru, I.-E.; Damian, C.-M.; Ion, A.-C.; Iovu, H.; Tanasa, E.; Zaharia, C.; Galateanu, B. Grafting versus Crosslinking of Silk Fibroin-g-PNIPAM via Tyrosine-NIPAM Bridges. *Molecules* 2019, 24, 4096. [CrossRef]
 82. Flores-Vela, E.V.; Conejo-Dávila, A.S.; Hernández-Escobar, C.A.; Dominguez, R.B.; Chávez-Flores, D.; Tapia-Lopez, L.V.; Piñon-Balderrama, C.; Estrada-Monje, A.; Luna-Velasco, M.A.; Osuna, V.C.; et al. Silk Fibroin-g-Polyaniline Platform for the Design of Biocompatible-Electroactive Substrate. *Polymers* 2022, 14, 4653. [CrossRef] [PubMed]
 83. Kuang, D.; Wu, F.; Yin, Z.; Zhu, T.; Xing, T.; Kundu, S.; Lu, S. Silk Fibroin/Polyvinyl Pyrrolidone Interpenetrating Polymer Network Hydrogels. *Polymers* 2018, 10, 153. [CrossRef] [PubMed]
 84. Xing, T.L.; Xu, X.; Chen, G.Q. Grafting of 2-Diethylaminoethyl Methacrylate onto Silk by ATRP. *Adv. Mater. Res.* 2011, 175–176, 614–618. [CrossRef]
 85. Di Foggia, M.; Tsukada, M.; Taddei, P. Vibrational Study on Structure and Bioactivity of Protein Fibers Grafted with Phosphorylated Methacrylates. *Molecules* 2021, 26, 6487. [CrossRef]
 86. Niu, L.; Chen, G.; Feng, Y.; Liu, X.; Pan, P.; Huang, L.; Guo, Y.; Li, M. Polyethylenimine-Modified Bombyx Mori Silk Fibroin as a Delivery Carrier of the ING4-IL-24 Coexpression Plasmid. *Polymers* 2021, 13, 3592. [CrossRef]

87. Heichel, D.L.; Vy, N.C.H.; Ward, S.P.; Adamson, D.H.; Burke, K.A. Controlled Radical Polymerization of Hydrophilic and Zwitterionic Brush-like Polymers from Silk Fibroin Surfaces. *J. Mater. Chem. B* 2020, 8, 10392–10406. [CrossRef]
88. Viola, M.; Ainsworth, M.J.; Mihajlovic, M.; Cedillo-Servin, G.; van Steenberg, M.J.; van Rijen, M.; de Ruijter, M.; Castilho, M.; Malda, J.; Vermonden, T. Covalent Grafting of Functionalized MEW Fibers to Silk Fibroin Hydrogels to Obtain Reinforced Tissue Engineered Constructs. *Biomacromolecules* 2024, 25, 1563–1577. [CrossRef]
89. Mao, K.-L.; Fan, Z.-L.; Yuan, J.-D.; Chen, P.-P.; Yang, J.-J.; Xu, J.; ZhuGe, D.-L.; Jin, B.-H.; Zhu, Q.-Y.; Shen, B.-X.; et al. Skin Penetrating Polymeric Nanoparticles Incorporated in Silk Fibroin Hydrogel for Topical Delivery of Curcumin to Improve Its Therapeutic Effect on Psoriasis Mouse Model. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2017, 160, 704–714. [CrossRef]
90. Ma, C.-C.; Wang, Z.-L.; Xu, T.; He, Z.-Y.; Wei, Y.-Q. The Approved Gene Therapy Drugs Worldwide: From 1998 to 2019. *Biotechnol. Adv.* 2020, 40, 107502. [CrossRef]
91. Roma-Rodrigues, C.; Rivas-García, L.; Baptista, P.V.; Fernandes, A.R. Gene Therapy in Cancer Treatment: Why Go Nano? *Pharmaceutics* 2020, 12, 233. [CrossRef]
92. Wirth, T.; Parker, N.; Ylä-Herttuala, S. History of Gene Therapy. *Gene* 2013, 525, 162–169. [CrossRef] [PubMed]
93. Chen, J.; Guo, Z.; Tian, H.; Chen, X. Production and Clinical Development of Nanoparticles for Gene Delivery. *Mol. Ther.-Methods Clin. Dev.* 2016, 3, 16023. [CrossRef] [PubMed]
94. Liu, Y.; You, R.; Liu, G.; Li, X.; Sheng, W.; Yang, J.; Li, M. Anthraene Pernyi Silk Fibroin-Coated PEI/DNA Complexes for Targeted Gene Delivery in HEK 293 and HCT 116 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 7049–7063. [CrossRef] [PubMed]
95. Muhammad, Q.; Jang, Y.; Kang, S.H.; Moon, J.; Kim, W.J.; Park, H. Modulation of Immune Responses with Nanoparticles and Reduction of Their Immunotoxicity. *Biomater. Sci.* 2020, 8, 1490–1501. [CrossRef]
96. Numata, K.; Mieszawska-Czajkowska, A.J.; Kvenvold, L.A.; Kaplan, D.L. Silk-Based Nanocomplexes with Tumor-Homing Peptides for Tumor-Specific Gene Delivery. *Macromol. Biosci.* 2012, 12, 75–82. [CrossRef]
97. Numata, K.; Kaplan, D.L. Silk-Based Delivery Systems of Bioactive Molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, 62, 1497–1508. [CrossRef]
98. Numata, K.; Subramanian, B.; Currie, H.A.; Kaplan, D.L. Bioengineered Silk Protein-Based Gene Delivery Systems. *Biomaterials* 2009, 30, 5775–5784. [CrossRef]
99. Gong, H.; Wang, J.; Zhang, J.; Wu, J.; Zheng, Z.; Xie, X.; Kaplan, D.L.; Li, G.; Wang, X. Control of Octreotide Release from Silk Fibroin Microspheres. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 102, 820–828.

[CrossRef]

100. Hou, A.; Chen, H. Preparation and Characterization of Silk/Silica Hybrid Biomaterials by Sol–Gel Crosslinking Process. *Mater.Sci. Eng. B* 2010, 167, 124–128. [CrossRef]
101. Pereira, R.F.P.; Zehbe, K.; Günter, C.; dos Santos, T.; Nunes, S.C.; Paz, F.A.A.; Silva, M.M.; Granja, P.L.; Taubert, A.; de Zea Bermudez, V. Ionic Liquid-Assisted Synthesis of Mesoporous Silk Fibroin/Silica Hybrids for Biomedical Applications. *ACS Omega* 2018, 3, 10811–10822. [CrossRef]
102. Zhao, X.; Chen, Z.; Liu, Y.; Huang, Q.; Zhang, H.; Ji, W.; Ren, J.; Li, J.; Zhao, Y. Silk Fibroin Microparticles with Hollow Mesoporous Silica Nanocarriers Encapsulation for Abdominal Wall Repair. *Adv. Healthc. Mater.* 2018, 7, e1801005. [CrossRef]
103. Shen, L.; Guo, L.; Chen, S.; Wei, A.; Osaka, A.; Chen, W. Self-Assembly of Silica Spheres on Silk Fibroin Spheres for Synthesis of Porous Hollow Silica Spheres and Their in Vitro Biocompatibility and Drug Delivery Property. *J. Non. Cryst. Solids* 2019, 522, 119557. [CrossRef]
104. Cheng, N.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Shi, B. The Osteogenic Potential of Mesoporous Bioglasses/Silk and Non-Mesoporous Bio- glasses/Silk Scaffolds in Ovariectomized Rats: In Vitro and In Vivo Evaluation. *PLoS ONE* 2013, 8, e81014. [CrossRef] [PubMed]
105. Wu, C.; Zhang, Y.; Zhu, Y.; Friis, T.; Xiao, Y. Structure–Property Relationships of Silk-Modified Mesoporous Bioglass Scaffolds. *Biomaterials* 2010, 31, 3429–3438. [CrossRef] [PubMed]
106. Zhang, Y.; Miron, R.J.; Li, S.; Shi, B.; Sculean, A.; Cheng, X. Novel MesoPorous BioGlass/Silk Scaffold Containing AdPDGF-B and AdBMP7 for the Repair of Periodontal Defects in Beagle Dogs. *J. Clin. Periodontol.* 2015, 42, 262–271. [CrossRef]
107. Yu, Y.; Yang, B.; Tian, D.; Liu, J.; Yu, A.; Wan, Y. Thiolated Hyaluronic Acid/Silk Fibroin Dual-Network Hydrogel Incorporated with Bioglass Nanoparticles for Wound Healing. *Carbohydr. Polym.* 2022, 288, 119334. [CrossRef]
108. Zhao, Z.; Ma, X.; Zhao, B.; Tian, P.; Ma, J.; Kang, J.; Zhang, Y.; Guo, Y.; Sun, L. Naringin-inlaid Silk Fibroin/Hydroxyapatite Scaffold Enhances Human Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cell-based Bone Regeneration. *Cell Prolif.* 2021, 54, e13043. [CrossRef]
109. Coelho, F.; Cavicchioli, M.; Specian, S.S.; Cilli, E.M.; Lima Ribeiro, S.J.; Scarel-Caminaga, R.M.; de Oliveira Capote, T.S. Silk Fibroin/Hydroxyapatite Composite Membranes: Production, Characterization and Toxicity Evaluation. *Toxicol. Vitro.* 2020, 62, 104670. [CrossRef]

REFERÊNCIAS GERAIS

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249, doi:10.3322/caac.21660.
2. James, S. Global, Regional, and National Age-Sex-Specific Mortality for 282 Causes of Death in 195 Countries and Territories, 1980–2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, *392*, 1736–1788, doi:10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
3. Soerjomataram, I.; Bray, F. Planning for Tomorrow: Global Cancer Incidence and the Role of Prevention 2020–2070. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2021**, *18*, 663–672, doi:10.1038/s41571-021-00514-z.
4. WHO *WHO Report on Cancer: Setting Priorities, Investing Wisely and Providing Care for All.*; Geneva, 2020;
5. Negrini, S.; Gorgoulis, V.G.; Halazonetis, T.D. Genomic Instability — an Evolving Hallmark of Cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 220–228, doi:10.1038/nrm2858.
6. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
7. Weinberg, R.A. How Cancer Arises. *Sci. Am.* **1996**, *275*, 61–61, doi:10.1038/scientificamerican0996-61.
8. DeVita; Lawrence, T.S.; Rosenberg, S.A. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*; 10th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: USA, 2015;
9. Delahousse, J.; Skarbek, C.; Paci, A. Prodrugs as Drug Delivery System in Oncology. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2019**, *84*, 937–958, doi:10.1007/s00280-019-03906-2.
10. Oun, R.; Moussa, Y.E.; Wheate, N.J. The Side Effects of Platinum-Based Chemotherapy Drugs: A Review for Chemists. *Dalt. Trans.* **2018**, *47*, 6645–6653, doi:10.1039/C8DT00838H.
11. Sutradhar, K.B.; Amin, M.L. Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting. *ISRN Nanotechnol.* **2014**, *2014*, 1–12, doi:10.1155/2014/939378.
12. Dragojevic, S.; Ryu, J.; Raucher, D. Polymer-Based Prodrugs: Improving Tumor Targeting and the Solubility of Small Molecule Drugs in Cancer Therapy. *Molecules* **2015**, *20*, 21750–21769, doi:10.3390/molecules201219804.
13. Kudarha, R.R.; Sawant, K.K. Albumin Based Versatile Multifunctional Nanocarriers for Cancer Therapy: Fabrication, Surface Modification, Multimodal Therapeutics and Imaging Approaches. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *81*, 607–626, doi:10.1016/j.msec.2017.08.004.
14. Fathi Maroufi, N.; Rashidi, M.R.; Vahedian, V.; Akbarzadeh, M.; Fattahi, A.; Nouri, M.

- Therapeutic Potentials of Apatinib in Cancer Treatment: Possible Mechanisms and Clinical Relevance. *Life Sci.* **2020**, *241*, 117106, doi:10.1016/j.lfs.2019.117106.
15. Veisheh, O.; Kievit, F.M.; Ellenbogen, R.G.; Zhang, M. Cancer Cell Invasion: Treatment and Monitoring Opportunities in Nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, *63*, 582–596, doi:10.1016/j.addr.2011.01.010.
 16. Fuloria, S.; Mehta, J.; Chandel, A.; Sekar, M.; Rani, N.N.I.M.; Begum, M.Y.; Subramaniyan, V.; Chidambaram, K.; Thangavelu, L.; Nordin, R.; et al. A Comprehensive Review on the Therapeutic Potential of Curcuma Longa Linn. in Relation to Its Major Active Constituent Curcumin. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fphar.2022.820806.
 17. Razavi, B.M.; Ghasemzadeh Rahbardar, M.; Hosseinzadeh, H. A Review of Therapeutic Potentials of Turmeric (Curcuma Longa) and Its Active Constituent, Curcumin, on Inflammatory Disorders, Pain, and Their Related Patents. *Phyther. Res.* **2021**, *35*, 6489–6513, doi:10.1002/ptr.7224.
 18. Joshi, P.; Joshi, S.; Semwal, D.; Bisht, A.; Paliwal, S.; Dwivedi, J.; Sharma, S. Curcumin: An Insight into Molecular Pathways Involved in Anticancer Activity. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2021**, *21*, 2420–2457, doi:10.2174/1389557521666210122153823.
 19. Fu, Y.-S.; Chen, T.-H.; Weng, L.; Huang, L.; Lai, D.; Weng, C.-F. Pharmacological Properties and Underlying Mechanisms of Curcumin and Prospects in Medicinal Potential. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *141*, 111888, doi:10.1016/j.biopha.2021.111888.
 20. Wong, S.C.; Kamarudin, M.N.A.; Naidu, R. Anticancer Mechanism of Curcumin on Human Glioblastoma. *Nutrients* **2021**, *13*, 950, doi:10.3390/nu13030950.
 21. Kabir, M.T.; Rahman, M.H.; Akter, R.; Behl, T.; Kaushik, D.; Mittal, V.; Pandey, P.; Akhtar, M.F.; Saleem, A.; Albadrani, G.M.; et al. Potential Role of Curcumin and Its Nanoformulations to Treat Various Types of Cancers. *Biomolecules* **2021**, *11*, 392, doi:10.3390/biom11030392.
 22. Mansouri, K.; Rasoulpoor, S.; Daneshkhah, A.; Abolfathi, S.; Salari, N.; Mohammadi, M.; Rasoulpoor, S.; Shabani, S. Clinical Effects of Curcumin in Enhancing Cancer Therapy: A Systematic Review. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 791, doi:10.1186/s12885-020-07256-8.
 23. Zoi, V.; Galani, V.; Lianos, G.D.; Voulgaris, S.; Kyritsis, A.P.; Alexiou, G.A. The Role of Curcumin in Cancer Treatment. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1086, doi:10.3390/biomedicines9091086.
 24. Ashrafizadeh, M.; Zarrabi, A.; Hashemi, F.; Moghadam, E.R.; Hashemi, F.; Entezari, M.; Hushmandi, K.; Mohammadinejad, R.; Najafi, M. Curcumin in Cancer Therapy: A Novel Adjunct for Combination Chemotherapy with Paclitaxel and Alleviation of Its Adverse Effects. *Life Sci.* **2020**, *256*, 117984, doi:10.1016/j.lfs.2020.117984.

25. Sabet, S.; Rashidinejad, A.; Melton, L.D.; McGillivray, D.J. Recent Advances to Improve Curcumin Oral Bioavailability. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *110*, 253–266, doi:10.1016/j.tifs.2021.02.006.
26. Zheng, B.; McClements, D.J. Formulation of More Efficacious Curcumin Delivery Systems Using Colloid Science: Enhanced Solubility, Stability, and Bioavailability. *Molecules* **2020**, *25*, 2791, doi:10.3390/molecules25122791.
27. Liu, Z.; Smart, J.D.; Pannala, A.S. Recent Developments in Formulation Design for Improving Oral Bioavailability of Curcumin: A Review. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2020**, *60*, 102082, doi:10.1016/j.jddst.2020.102082.
28. Tabanelli, R.; Brogi, S.; Calderone, V. Improving Curcumin Bioavailability: Current Strategies and Future Perspectives. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1715, doi:10.3390/pharmaceutics13101715.
29. Adepu, S.; Ramakrishna, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* **2021**, *26*, 5905, doi:10.3390/molecules26195905.
30. Sung, Y.K.; Kim, S.W. Recent Advances in Polymeric Drug Delivery Systems. *Biomater. Res.* **2020**, *24*, 12, doi:10.1186/s40824-020-00190-7.
31. Karra, N.; Benita, S. The Ligand Nanoparticle Conjugation Approach for Targeted Cancer Therapy. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 22–41, doi:10.2174/138920012798356899.
32. TEIXEIRA, G.B. Nanocarreador Baseado Em Quitosana Tiolada e Nanopartícula de Ouro Como Sistema de Liberação Controlada Para o Fármaco Antineoplásico Docetaxel., Universidade Federal de Sergipe, 2018.
33. Allam, A.A.; Potter, S.J.; Bud'ko, S.L.; Shi, D.; Mohamed, D.F.; Habib, F.S.; Pauletti, G.M. Lipid-Coated Superparamagnetic Nanoparticles for Thermoresponsive Cancer Treatment. *Int. J. Pharm.* **2018**, *548*, 297–304, doi:10.1016/j.ijpharm.2018.07.022.
34. Hajba, L.; Guttman, A. The Use of Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics: Toward Handheld Diagnostic Devices. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 354–361, doi:10.1016/j.biotechadv.2016.02.001.
35. Uhrich, K.E.; Cannizzaro, S.M.; Langer, R.S.; Shakesheff, K.M. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 3181–3198, doi:10.1021/cr940351u.
36. Hoffman, A.S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23, doi:10.1016/j.addr.2012.09.010.
37. Torchilin, V.P. Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives. *Pharm. Res.* **2006**, *24*, 1–16, doi:10.1007/s11095-006-9132-0.
38. Lasic, D.D. *LIPOSOMES in GENE DELIVERY*; 1st ed.; CRC Press: London, 2019; ISBN 9780138748807.

39. Mohammadi, M.R.; Nojoomi, A.; Mozafari, M.; Dubnika, A.; Inayathullah, M.; Rajadas, J. Nanomaterials Engineering for Drug Delivery: A Hybridization Approach. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 3995–4018, doi:10.1039/C6TB03247H.
40. Pinto, L.; Bonifacio, M.A.; De Giglio, E.; Santovito, E.; Cometa, S.; Bevilacqua, A.; Baruzzi, F. Biopolymer Hybrid Materials: Development, Characterization, and Food Packaging Applications. *Food Packag. Shelf Life* **2021**, *28*, 100676, doi:10.1016/j.fpsl.2021.100676.
41. Soares, D.C.F.; Domingues, S.C.; Viana, D.B.; Tebaldi, M.L. Polymer-Hybrid Nanoparticles: Current Advances in Biomedical Applications. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110695, doi:10.1016/j.biopha.2020.110695.
42. Chen, C.; Ng, D.Y.W.; Weil, T. Polymer Bioconjugates: Modern Design Concepts toward Precision Hybrid Materials. *Prog. Polym. Sci.* **2020**, *105*, 101241, doi:10.1016/j.progpolymsci.2020.101241.
43. Rockwood, D.N.; Preda, R.C.; Yücel, T.; Wang, X.; Lovett, M.L.; Kaplan, D.L. Materials Fabrication from Bombyx Mori Silk Fibroin. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 1612–1631, doi:10.1038/nprot.2011.379.
44. Feng, Y.; Li, X.; Li, M.; Ye, D.; Zhang, Q.; You, R.; Xu, W. Facile Preparation of Biocompatible Silk Fibroin/Cellulose Nanocomposite Films with High Mechanical Performance. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2017**, *5*, 6227–6236, doi:10.1021/acssuschemeng.7b01161.
45. Kundu, B.; Kurland, N.E.; Yadavalli, V.K.; Kundu, S.C. Isolation and Processing of Silk Proteins for Biomedical Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *70*, 70–77, doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.06.022.
46. Maia, M.V.; Egito, E.S.T. do; Sapin-Minet, A.; Viana, D.B.; Kakkar, A.; Soares, D.C.F. Fibroin-Hybrid Systems: Current Advances in Biomedical Applications. *Molecules* **2025**, *30*, 328, doi:10.3390/molecules30020328.
47. Vaithanomsat, P.; Punyasawon, C. Production of Water-Soluble Silk Powder from Bombyx Mori Linn. *Nat. Sci* **2006**, *40*, 152:158.
48. Okahisa, Y.; Narita, C.; Aoki, T. Surface Analysis of Novel Fibroin Films Based on Well-Preserved Crystalline Structures. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *191*, 1017–1025, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.09.125.
49. *Fibrous Proteins*; Ling, S., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2021; Vol. 2347; ISBN 978-1-0716-1573-7.
50. Shao, J.; Zheng, J.; Liu, J.; Carr, C.M. Fourier Transform Raman and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Studies of Silk Fibroin. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *96*, 1999–2004,

doi:10.1002/app.21346.

51. Hu, Y.; Zhang, Q.; You, R.; Wang, L.; Li, M. The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds. *Adv. Mater. Sci. Eng.* **2012**, *2012*, 1–5, doi:10.1155/2012/185905.
52. Amiralıyan, N.; Nouri, M.; Haghighat Kish, M. Structural Characterization and Mechanical Properties of Electrospun Silk Fibroin Nanofiber Mats. *Polym. Sci. Ser. A* **2010**, *52*, 407–412, doi:10.1134/S0965545X10040097.
53. Lu, Q.; Hu, X.; Wang, X.; Kluge, J.A.; Lu, S.; Cebe, P.; Kaplan, D.L. Water-Insoluble Silk Films with Silk I Structure. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 1380–1387, doi:10.1016/j.actbio.2009.10.041.
54. Liu, J.; Sun, H.; Peng, Y.; Chen, L.; Xu, W.; Shao, R. Preparation and Characterization of Natural Silk Fibroin Hydrogel for Protein Drug Delivery. *Molecules* **2022**, *27*, 3418, doi:10.3390/molecules27113418.
55. Yoshimizu, H.; Asakura, T. Preparation and Characterization of Silk Fibroin Powder and Its Application to Enzyme Immobilization. *J. Appl. Polym. Sci.* **1990**, *40*, 127–134, doi:10.1002/app.1990.070400111.
56. Sionkowska, A.; Planecka, A. Preparation and Characterization of Silk Fibroin/Chitosan Composite Sponges for Tissue Engineering. *J. Mol. Liq.* **2013**, *178*, 5–14, doi:10.1016/j.molliq.2012.10.042.
57. Zhang, H.; Li, L.; Dai, F.; Zhang, H.; Ni, B.; Zhou, W.; Yang, X.; Wu, Y. Preparation and Characterization of Silk Fibroin as a Biomaterial with Potential for Drug Delivery. *J. Transl. Med.* **2012**, *10*, 117, doi:10.1186/1479-5876-10-117.
58. Zhong, J.; Zhou, X.; Ye, C.; Yu, W.; Tang, Y. Using FTIR Imaging to Investigate Silk Fibroin-Based Materials. In; 2021; pp. 207–219.
59. Eftink, M.R. The Use of Fluorescence Methods to Monitor Unfolding Transitions in Proteins. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 482–501, doi:10.1016/S0006-3495(94)80799-4.
60. Pace, C.N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. How to Measure and Predict the Molar Absorption Coefficient of a Protein. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2411–2423, doi:10.1002/pro.5560041120.
61. Kong, J.; Yu, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2007**, *39*, 549–559, doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x.
62. Numata, K.; Subramanian, B.; Currie, H.A.; Kaplan, D.L. Bioengineered Silk Protein-Based Gene Delivery Systems. *Biomaterials* **2009**, *30*, 5775–5784,

doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.028.

63. Parushuram, N.; Ranjana, R.; Narayana, B.; Mahendra, M.; Sangappa, Y. Facile Fabrication of Silk Fibroin Microparticles: Their Characterization and Potential Adsorption Study. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2020**, 1–19, doi:10.1080/01932691.2020.1774383.
64. Nashchekina, Y.A.; Konygina, V.S.; Popova, E.N.; Kodolova-Chukhontseva, V. V.; Nashchekin, A. V.; Yudin, V.E. Preparation of Water-Insoluble Silk Fibroin Films. Study of Their Structure and Properties. *Tech. Phys.* **2022**, 67, 297–303, doi:10.1134/S1063784222050073.
65. Fu, Z.; Li, W.; Wei, J.; Yao, K.; Wang, Y.; Yang, P.; Li, G.; Yang, Y.; Zhang, L. Construction and Biocompatibility Evaluation of Fibroin/Sericin-Based Scaffolds. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2022**, 8, 1494–1505, doi:10.1021/acsbiomaterials.1c01426.
66. Rajesha Shetty, G.; Lakshmeesha Rao, B. Preparation and Characterization of Silk Fibroin-Polyvinyl Alcohol (PVA) Blend Films for Food Packaging Materials. *Mater. Today Proc.* **2022**, 55, 194–200, doi:10.1016/j.matpr.2022.02.034.
67. Matsumoto, A.; Lindsay, A.; Abedian, B.; Kaplan, D.L. Silk Fibroin Solution Properties Related to Assembly and Structure. *Macromol. Biosci.* **2008**, 8, 1006–1018, doi:10.1002/mabi.200800020.
68. Xiang, Y.; Li, L.; Zheng, S. Morphologies and Dielectric Properties of Epoxy Thermosets Containing Poly(N-Vinylcarbazole), Fullerene-C60 and Their Charge Transfer Complex Nanophases. *Polymer (Guildf).* **2018**, 138, 113–123, doi:10.1016/j.polymer.2018.01.057.
69. Vanparijs, N.; Maji, S.; Louage, B.; Voorhaar, L.; Laplace, D.; Zhang, Q.; Shi, Y.; Hennink, W.E.; Hoogenboom, R.; De Geest, B.G. Polymer-Protein Conjugation via a ‘Grafting to’ Approach – a Comparative Study of the Performance of Protein-Reactive RAFT Chain Transfer Agents. *Polym. Chem.* **2015**, 6, 5602–5614, doi:10.1039/C4PY01224K.
70. Gonzalez-Urias, A.; Licea-Claverie, A.; Sañudo-Barajas, J.A.; González-Ayón, M.A. NVCL-Based Hydrogels and Composites for Biomedical Applications: Progress in the Last Ten Years. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 4722, doi:10.3390/ijms23094722.
71. Van Nieuwenhove, I.; Maji, S.; Dash, M.; Van Vlierberghe, S.; Hoogenboom, R.; Dubruel, P. RAFT/MADIX Polymerization of N-Vinylcaprolactam in Water–Ethanol Solvent Mixtures. *Polym. Chem.* **2017**, 8, 2433–2437, doi:10.1039/C6PY02224C.
72. Chu, S.; Joma, N.; Yong, H.W.; Maysinger, D.; Kakkar, A.; Stochaj, U. Curcumin and Butyrate Induce Fibroblast Senescence without the Emergence of Fibrosis Biomarkers. *Asp. Mol. Med.* **2023**, 2, 100021, doi:10.1016/j.amolm.2023.100021.
73. Lotocki, V.; Yazdani, H.; Zhang, Q.; Gran, E.R.; Nyrko, A.; Maysinger, D.; Kakkar, A.

- Miktoarm Star Polymers with Environment-Selective ROS/GSH Responsive Locations: From Modular Synthesis to Tuned Drug Release through Micellar Partial Corona Shedding and/or Core Disassembly. *Macromol. Biosci.* **2021**, *21*, doi:10.1002/mabi.202000305.
74. Baghbanbashi, M.; Yong, H.W.; Zhang, I.; Lotocki, V.; Yuan, Z.; Pazuki, G.; Maysinger, D.; Kakkar, A. Stimuli-Responsive Miktoarm Polymer-Based Formulations for Fisetin Delivery and Regulatory Effects in Hyperactive Human Microglia. *Macromol. Biosci.* **2022**, *22*, doi:10.1002/mabi.202200174.
 75. Aliabadi, H.M.; Mahmud, A.; Sharifabadi, A.D.; Lavasanifar, A. Micelles of Methoxy Poly(Ethylene Oxide)-b-Poly(ϵ -Caprolactone) as Vehicles for the Solubilization and Controlled Delivery of Cyclosporine A. *J. Control. Release* **2005**, *104*, 301–311, doi:10.1016/j.jconrel.2005.02.015.
 76. Viana, D.B.; Mathieu-Gaedke, M.; Leão, N.M.; Böker, A.; Ferreira Soares, D.C.; Glebe, U.; Tebaldi, M.L. Hybrid Protein-Polymer Nanoparticles Based on P(NVCL-Co-DMAEMA) Loaded with Cisplatin as a Potential Anti-Cancer Agent. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2023**, *79*, 103995, doi:10.1016/j.jddst.2022.103995.
 77. Chu, S.; Joma, N.; Yong, H.W.; Maysinger, D.; Kakkar, A.; Stochaj, U. Curcumin and Butyrate Induce Fibroblast Senescence without the Emergence of Fibrosis Biomarkers. *Asp. Mol. Med.* **2023**, *2*, 100021, doi:10.1016/j.amolm.2023.100021.
 78. Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Zou, A.; Li, W.; Yao, C.; Xie, S. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J.* **2010**, *12*, 263–271, doi:10.1208/s12248-010-9185-1.
 79. Gupta, A. Sen Role of Particle Size , Shape , and Stiffness in Design of Intravascular Drug Delivery Systems : Insights from Computations , Experiments ,. **2016**, *8*, 255–270, doi:10.1002/wnan.1362.
 80. Ferreira Soares, D.C.; Domingues, S.C.; Viana, D.B.; Tebaldi, M.L. Polymer-Hybrid Nanoparticles: Current Advances in Biomedical Applications. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *131*, 110695, doi:10.1016/j.biopha.2020.110695.

APÊNDICE A – HOMOPOLIMERIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PNVCL

As Figuras A1 e A2 apresentam os espectros de RMN de ^1H que confirmam a estrutura do monômero NVCL e a formação do polímero PNVCL após homopolimerização. O espectro do monômero (Figura A1) mostra sinais característicos da dupla ligação vinílica ($\delta \approx 6,2\text{--}6,6$ ppm), ausentes no espectro do polímero o que confirma o consumo completo da insaturação e a ocorrência da polimerização. A presença de múltiplos sinais alifáticos entre $\delta \approx 1,0\text{--}4,0$ ppm nos espectros do PNVCL é compatível com a formação da cadeia polimérica saturada.

A Figura A3 mostra o espectro de massa obtido por MALDI-TOF, confirmando a formação do polímero com repetição de unidades de massa correspondente ao monômero (139 g/mol), evidenciado pelos picos regulares ao longo da série. Esses dados, em conjunto, comprovam a eficácia da homopolimerização e a estrutura do material obtido.

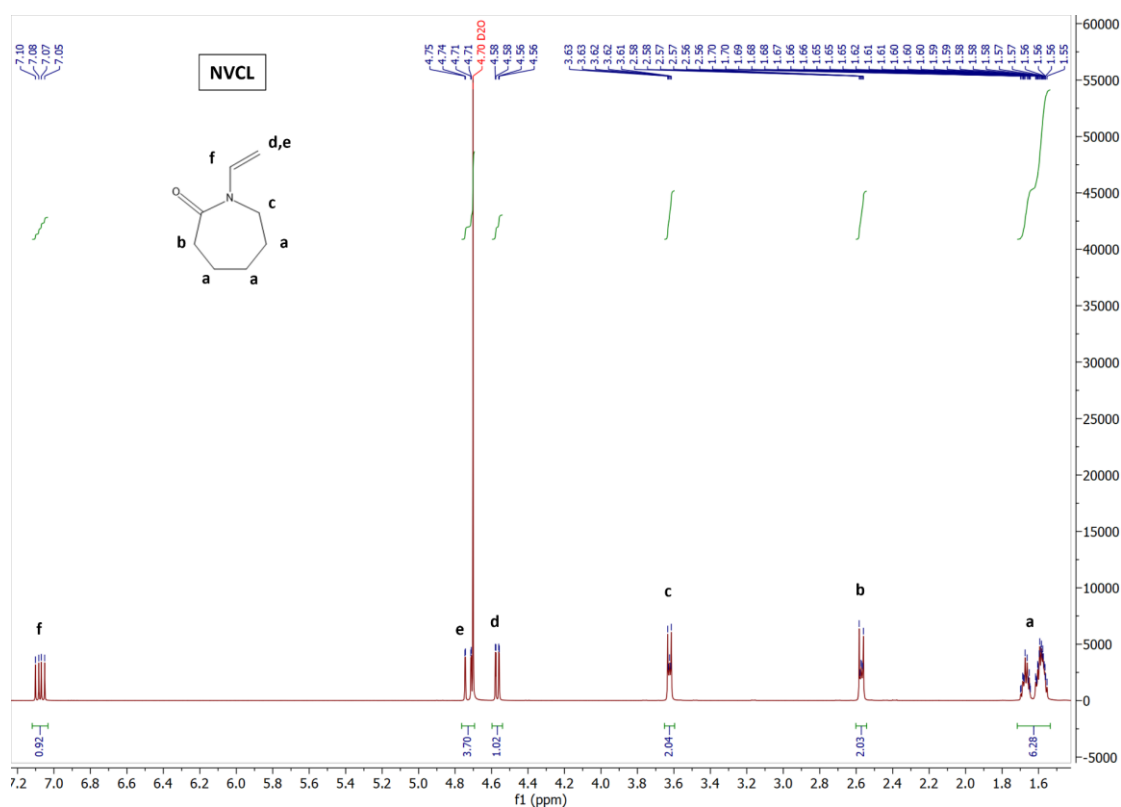


Figura A1 Espectro de RMN de ^1H do monômero *N*-vinilcaprolactama (NVCL) em CDCl_3

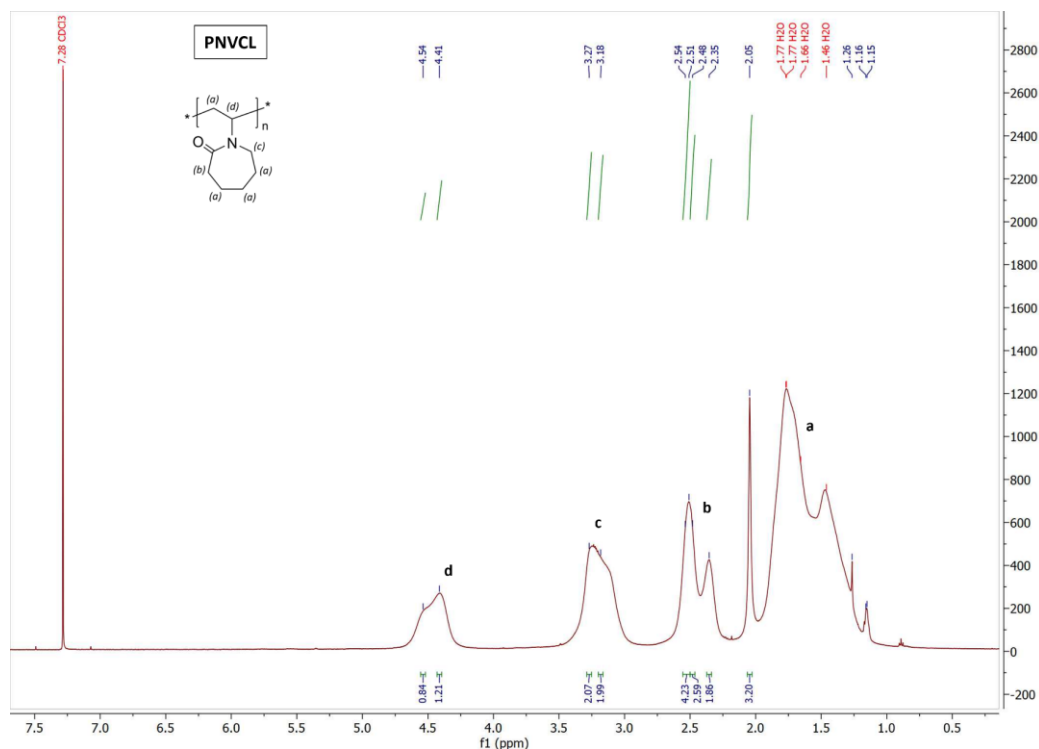


Figura A2 Espectro de RMN de ^1H do polímero PNVL obtido por homopolimerização via RAFT.

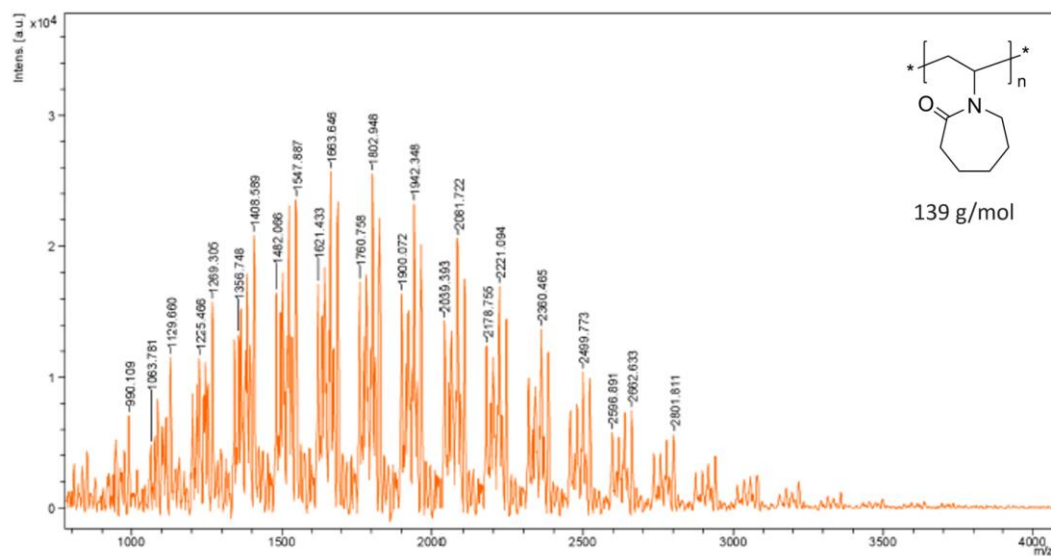


Figura C Espectro de massas obtido por MALDI-TOF do polímero PNVL.

APÊNDICE B - DIFRAÇÃO DE RAIOS X (PXRD) DO MONÔMERO NVCL

A Figura B1 apresenta o difratograma de raios X do monômero *N*-vinilcaprolactama (NVCL) na forma sólida. Observa-se um padrão com picos estreitos e intensos, característicos de materiais com

alto grau de cristalinidade. A presença desses picos bem definidos confirma que o NVCL, antes do processo de polimerização, apresenta uma estrutura molecular altamente ordenada no estado sólido, o que é típico de monômeros puros. Esses dados servem como referência para comparação com o polímero correspondente (PNVCL), que geralmente exibe um padrão amorfo devido à perda de organização supramolecular após a polimerização.

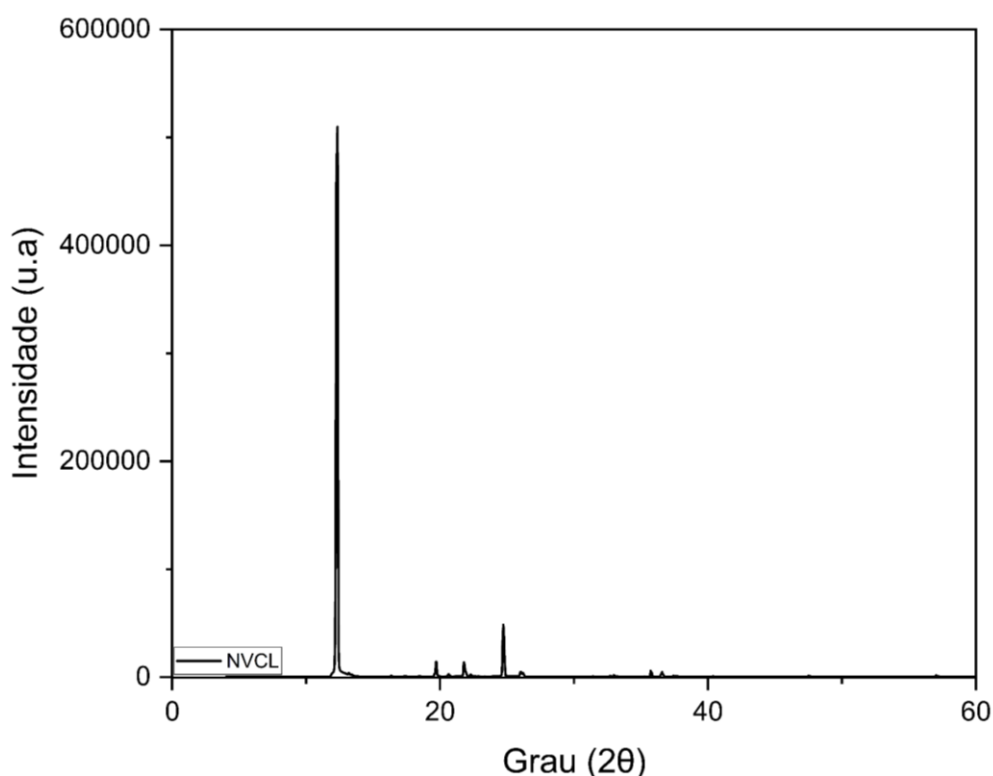


Figura B1 Difratograma de raios X por pó (PXRD) do monômero *N*-vinilcaprolactama (NVCL).

APÊNDICE C - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (NVCL E PNVCL)

A Figura C1 apresenta os espectros de FTIR do monômero *N*-vinilcaprolactama (NVCL) e do polímero correspondente PNVCL, permitindo observar as principais alterações estruturais resultantes da reação de polimerização. No espectro do NVCL, destacam-se bandas na região de $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$, atribuídas à ligação dupla C=C vinílica, além de uma banda intensa próxima de 1680 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo carbonila (C=O) da lactama. Também são observadas bandas associadas às ligações C–H de estiramento na região entre $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$. Após a polimerização, no espectro do PNVCL, observa-se a atenuação da banda em $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$, indicando o consumo da insaturação vinílica, enquanto a banda do grupo carbonila (C=O) permanece visível, refletindo a preservação do anel lactâmico durante a formação do polímero.

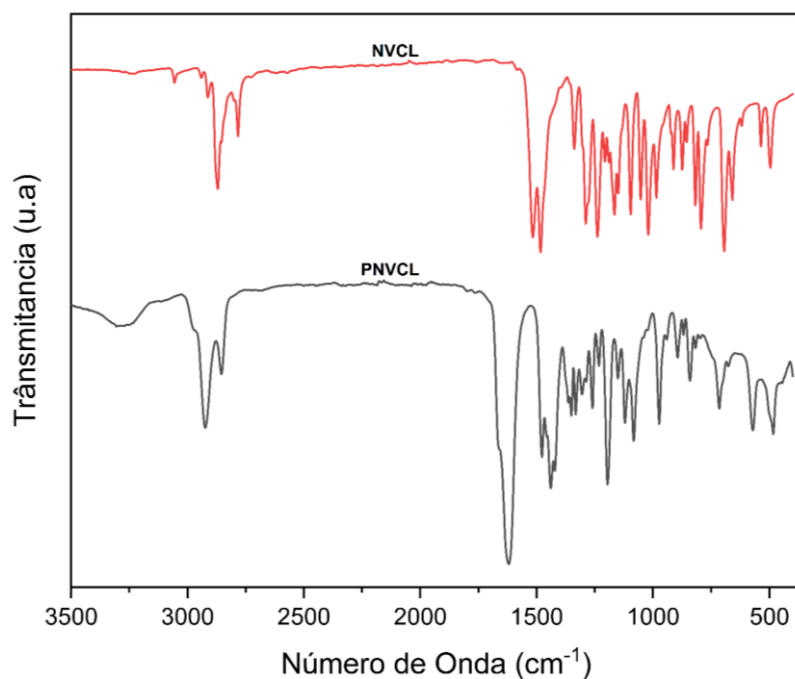


Figura C1 Espectros de FTIR do monômero NVCL (vermelho) e do polímero PNVCL (preto).

APÊNDICE D - PERFIL DE LIBERAÇÃO DA CURCUMINA LIVRE

A Figura D1 apresenta o perfil de liberação da curcumina livre (não encapsulada) em meio aquoso, monitorado ao longo de 72 horas nas temperaturas de 25 °C e 40 °C. Observa-se uma liberação rápida e quase completa nas primeiras 2 horas, independentemente da temperatura, atingindo valores próximos de 100% em ambas as condições. A partir desse ponto, a curva mantém-se estável, indicando que a curcumina se encontra totalmente dissolvida no meio. A ausência de variação significativa entre os perfis a 25 °C e 40 °C evidencia que a curcumina livre não apresenta comportamento termorresponsivo.

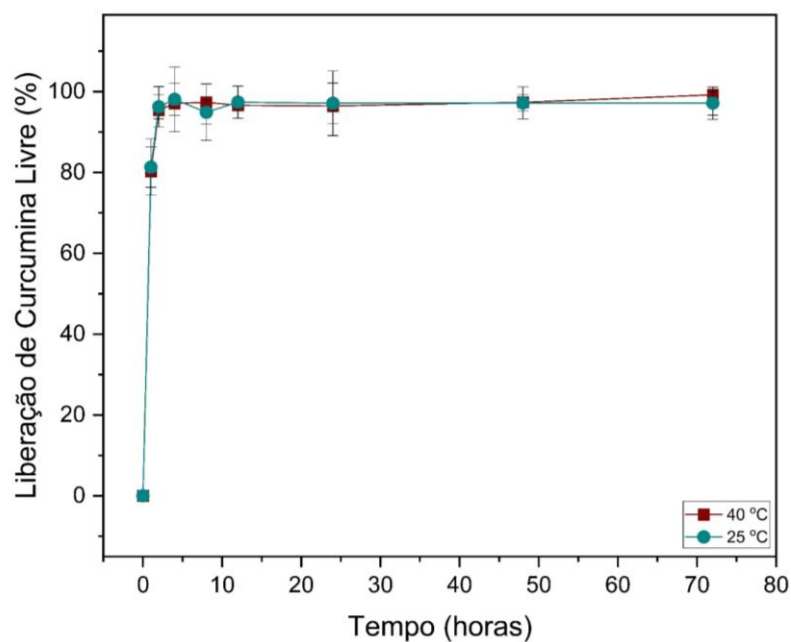


Figura D1 Perfil de liberação da curcumina livre (não encapsulada) em meios aquosos a 25 °C e 40 °C, ao longo de 72 horas.

APÊNDICE E – ANÁLISE DA FIBROÍNA DE SEDA POR SDS-PAGE

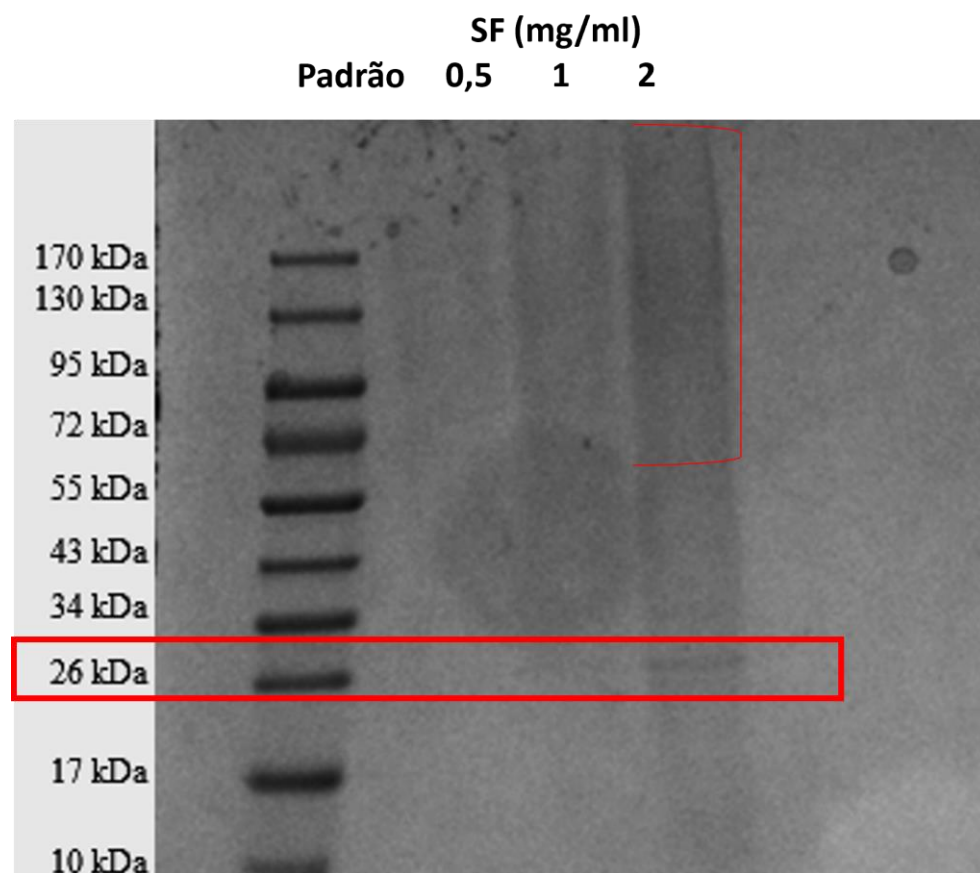


Figura E1. Análise eletroforética da fibroína de seda por SDS-PAGE. O perfil proteico obtido demonstra a presença de bandas características na faixa de aproximadamente 26 kDa, atribuídas à cadeia leve da fibroína, e uma região difusa de alta massa molecular correspondente à cadeia pesada e possíveis agregados proteicos. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida com marcador de peso molecular padrão (à esquerda).

APÊNDICE F – SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL_{A2}

O sistema híbrido SF-PNVCL_(A2) foi obtido a partir da mesma metodologia (A) empregada anteriormente, com a diferença de que utilizou-se o CTA₂, um agente de transferência de cadeia não comercial, sintetizado em laboratório. Esse agente foi incorporado à estrutura da fibroína por meio de uma reação de esterificação com os grupos hidroxila presentes em sua superfície, originando um macroagente de transferência de cadeia (MCTA). A partir dessa superfície funcionalizada, foi realizada a polimerização controlada do monômero NVCL.

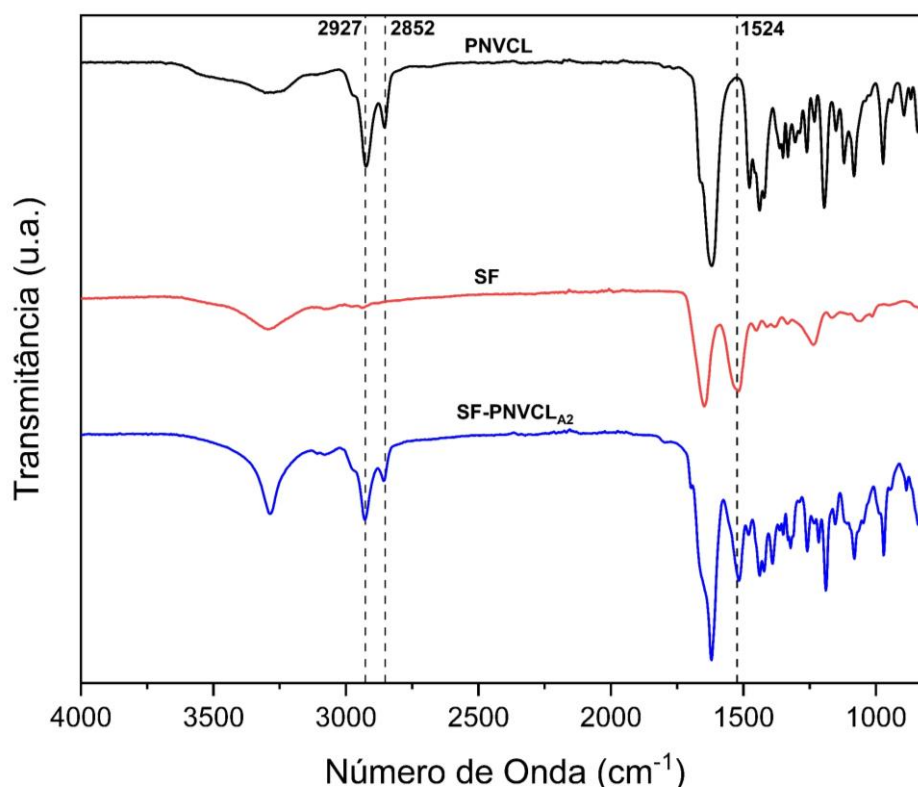


Figura F1. Espectros de FTIR das amostras de PNVCL, (SF) e do sistema híbrido SF-PNVCL_{A2}

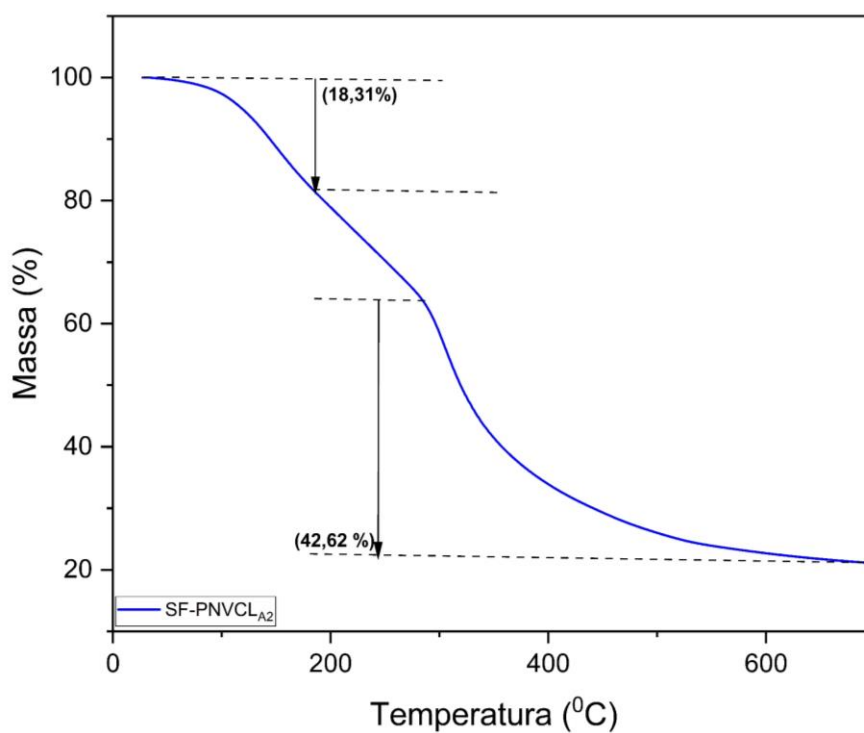


Figura F2. Curva termogravimétrica (TGA) sistema híbrido SF-PNVCL_{A2}.

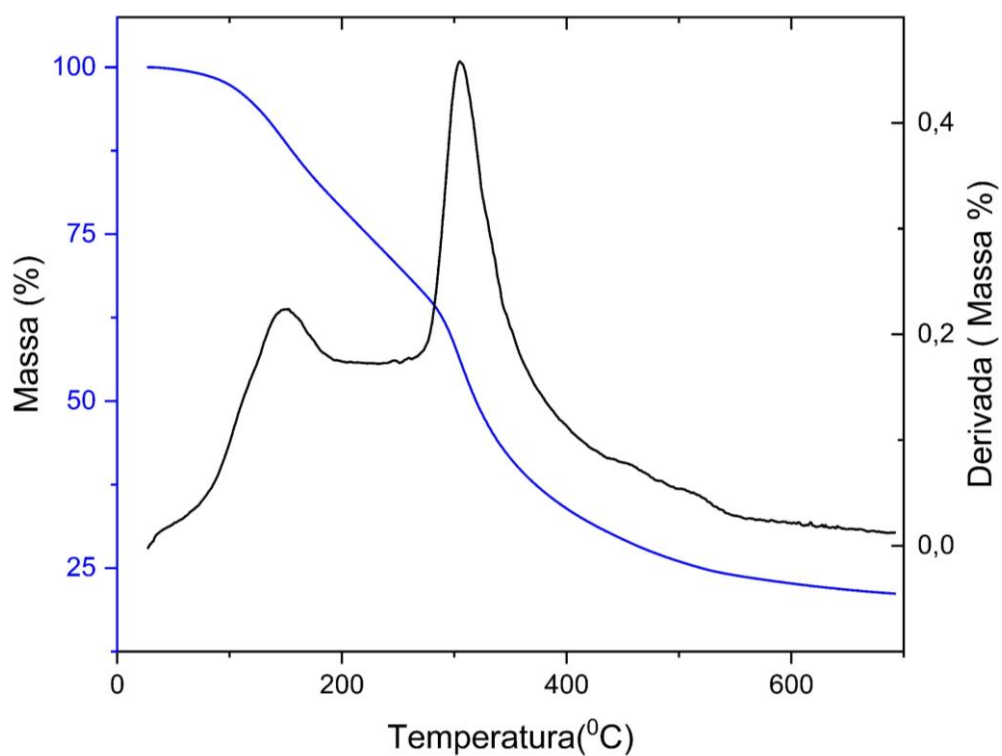


Figura F3. Curvas de TGA (azul) e DTG (preto) do sistema híbrido SF-PNVCL_{A2}.

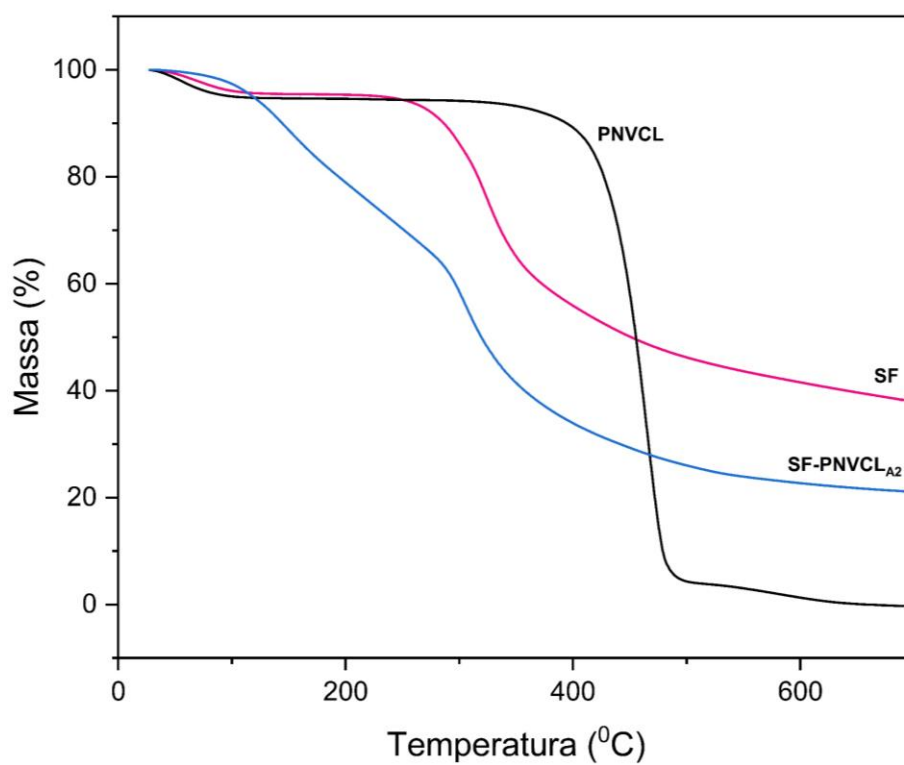


Figura F4. Curvas termogravimétricas (TGA) PNVCL , SF e do sistema híbrido SF-PNVCL_{A2}.

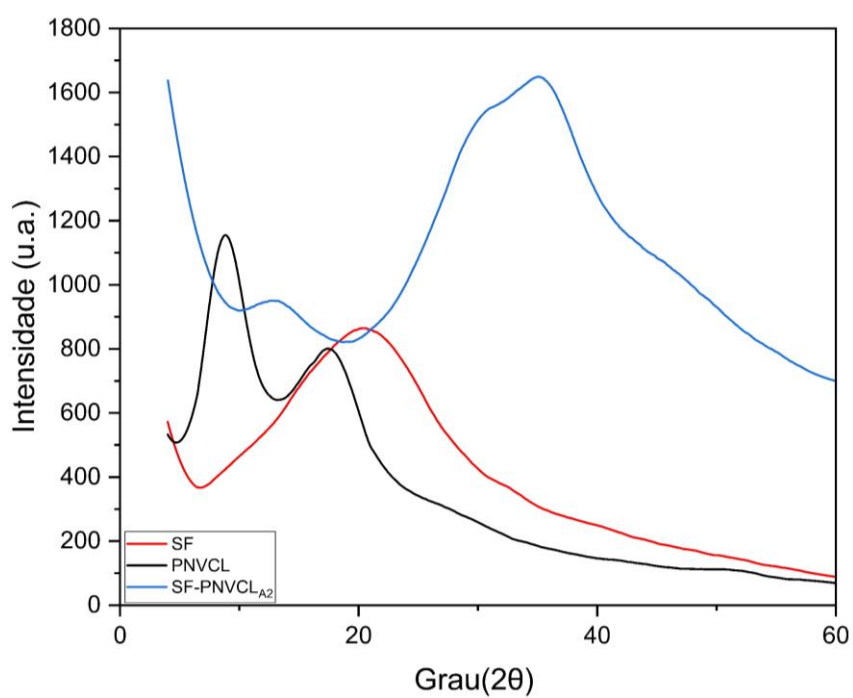


Figura F5. Difrátogramas de raios X (PXRD) das amostras de fibroína de seda (SF), PNVCL e do sistema híbrido SF-PNVCL_{A2}.

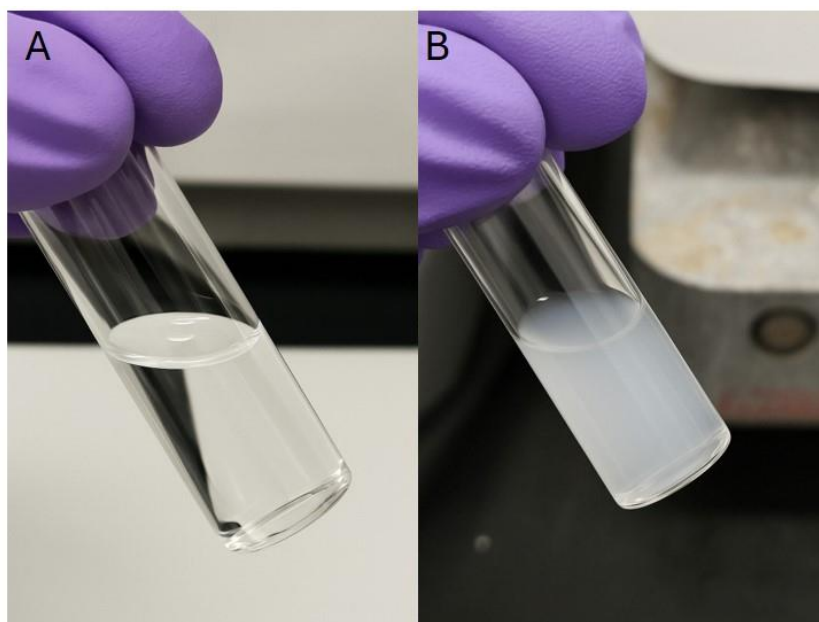


Figura F6. Transição de fase do sistema híbrido SF-PNVCL_{A2} em meio aquoso a 5 mg/mL. (A) Solução à temperatura ambiente (~25 °C), (B) Solução após aquecimento acima de 40 °C.

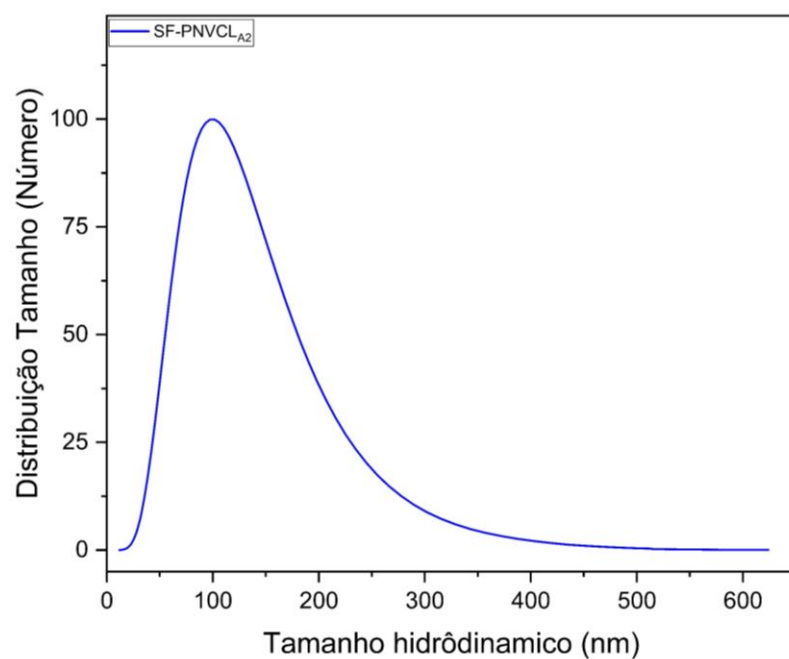


Figura F7. Distribuição do tamanho hidrodinâmico das nanopartículas do híbrido SF-PNVCL_{A2}

Tabela F1 Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta, PDI para (SF) , SF-PNVCL_{A2}, SF + PNVCL e PNVCL e parâmetros de encapsulamento da curcumina no sistema híbrido SF-PNVCL_{A2}

Amostra	Tamanho hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	EE%	CC%
SF	83,16	0,198	-39,48	-	-
SF-PNVCL _{A2}	209,86	0,288	-20,83	44,27	4,02
SF + PNVCL	-	-	-35,00	-	-
PNVCL	-	-	-44,23	-	-

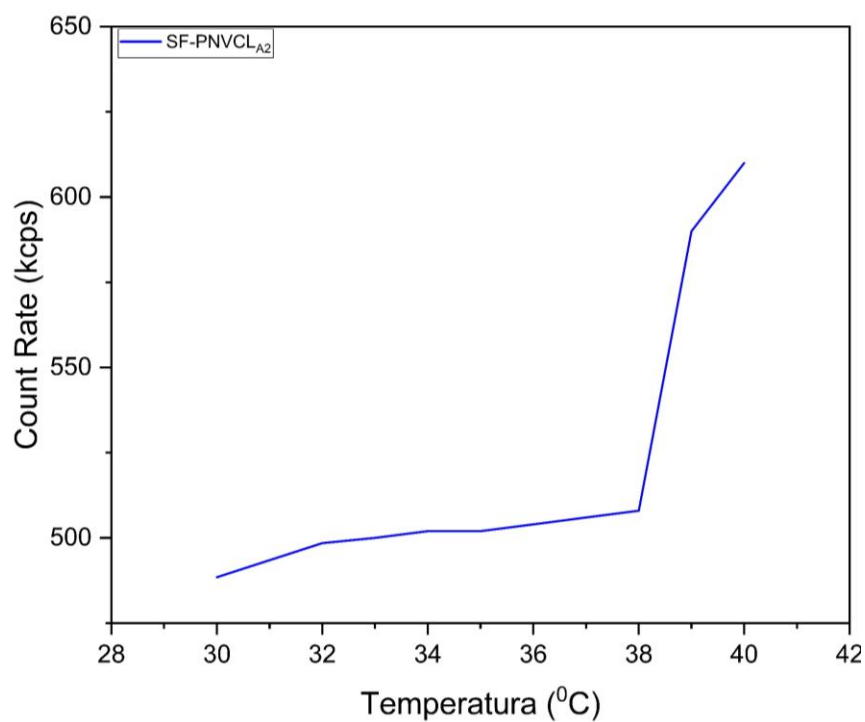


Figura F8. Avaliação da termorresponsividade do sistema híbrido SF-PNVCL_{a2} por Dispersão Dinâmica de Luz (DLS).

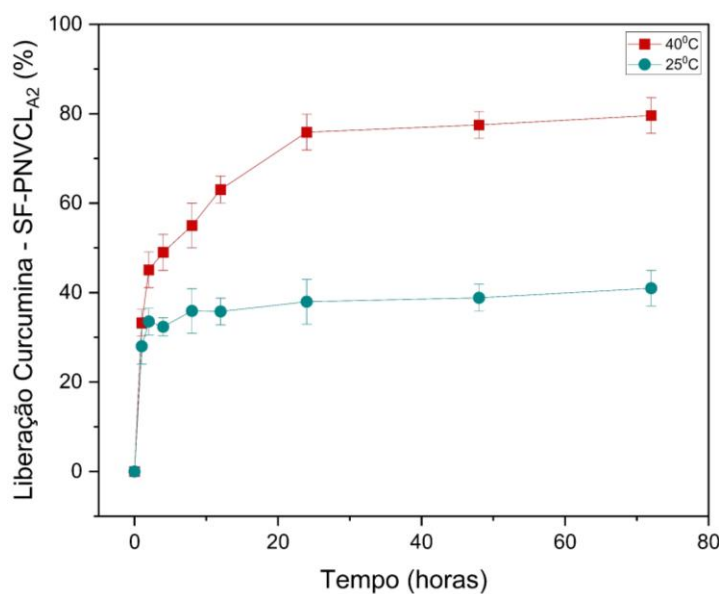


Figura F9. Perfil de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{A2}, 25 °C e 40 °C.

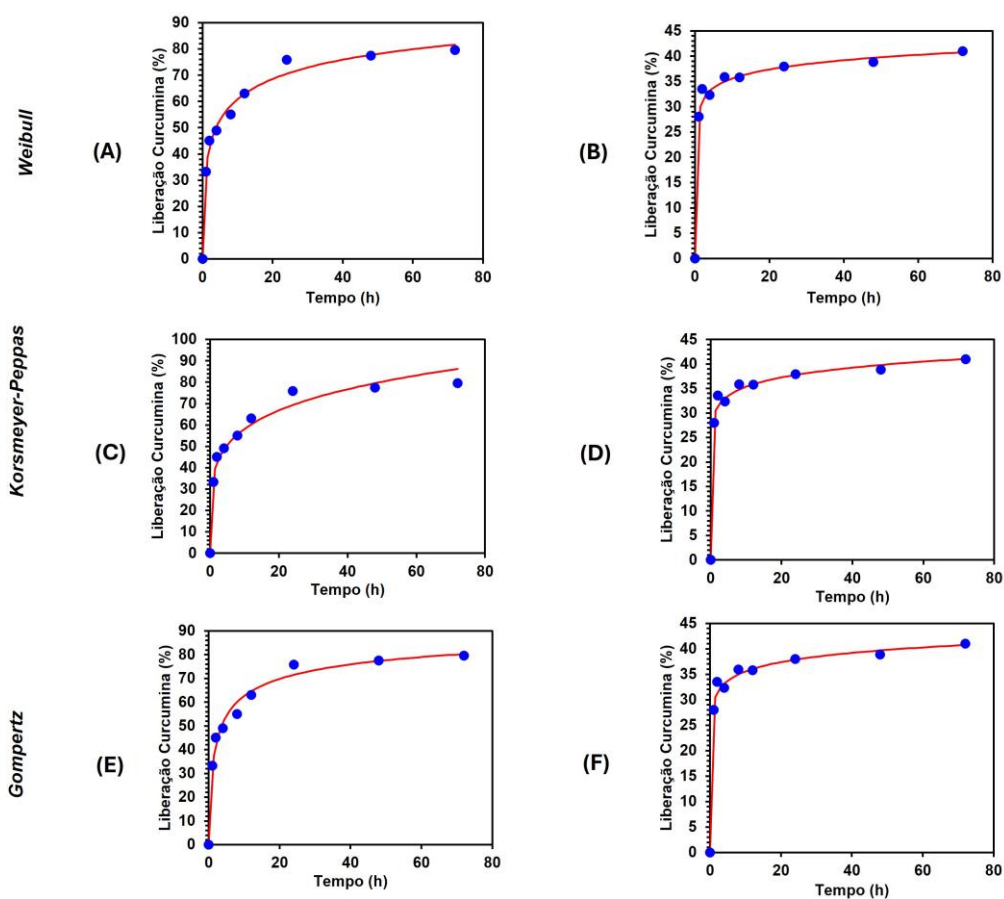


Figura F10. Curvas de ajuste dos modelos matemáticos Weibull (A, B), Korsmeyer–Peppas (C, D) e Gompertz (E, F) para os dados de liberação da curcumina pelo sistema SF-PNVCL_{A2}–Cur.

APÊNDICE G – SISTEMA HÍBRIDO SF-PNVCL_{B1}

Nesta seção, são apresentados os resultados obtidos para o sistema híbrido SF-PNVCL_{B1}, desenvolvido a partir da ativação do agente de transferência de cadeia CTA₁ com pentafluorofenol (PFP).

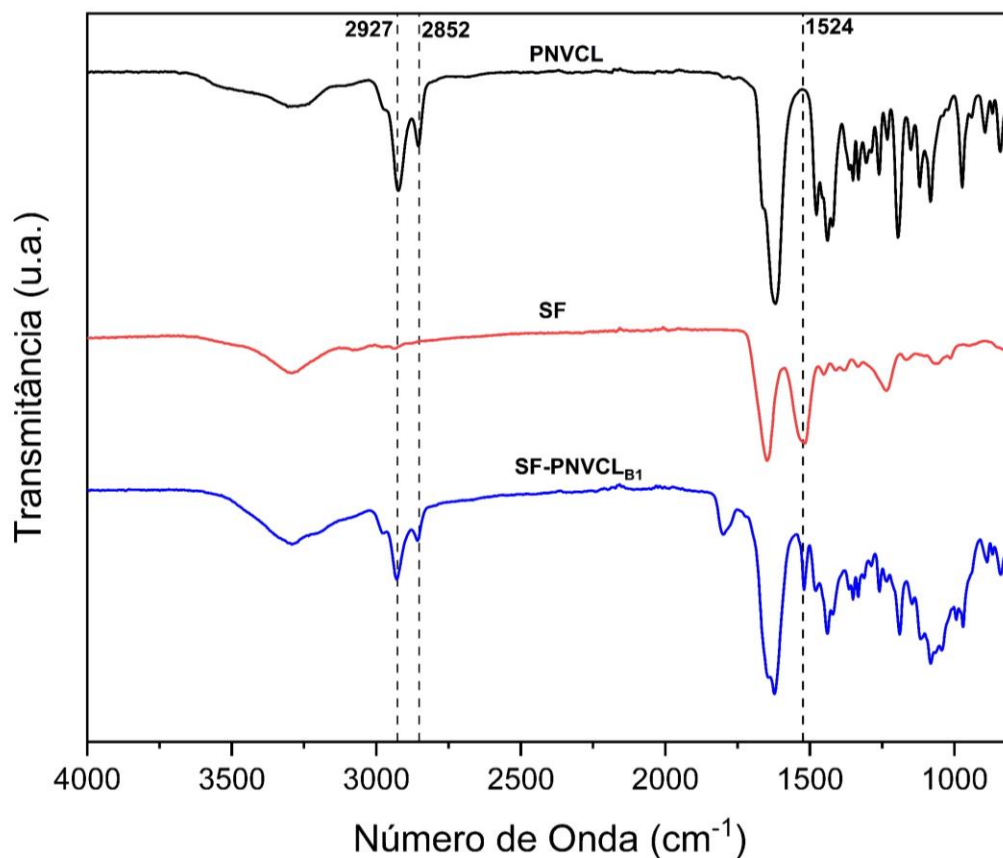


Figura G1. Espectros de FTIR das amostras de fibroína de seda (SF), do polímero PNVCL e do sistema híbrido SF-PNVCL_{B1}.

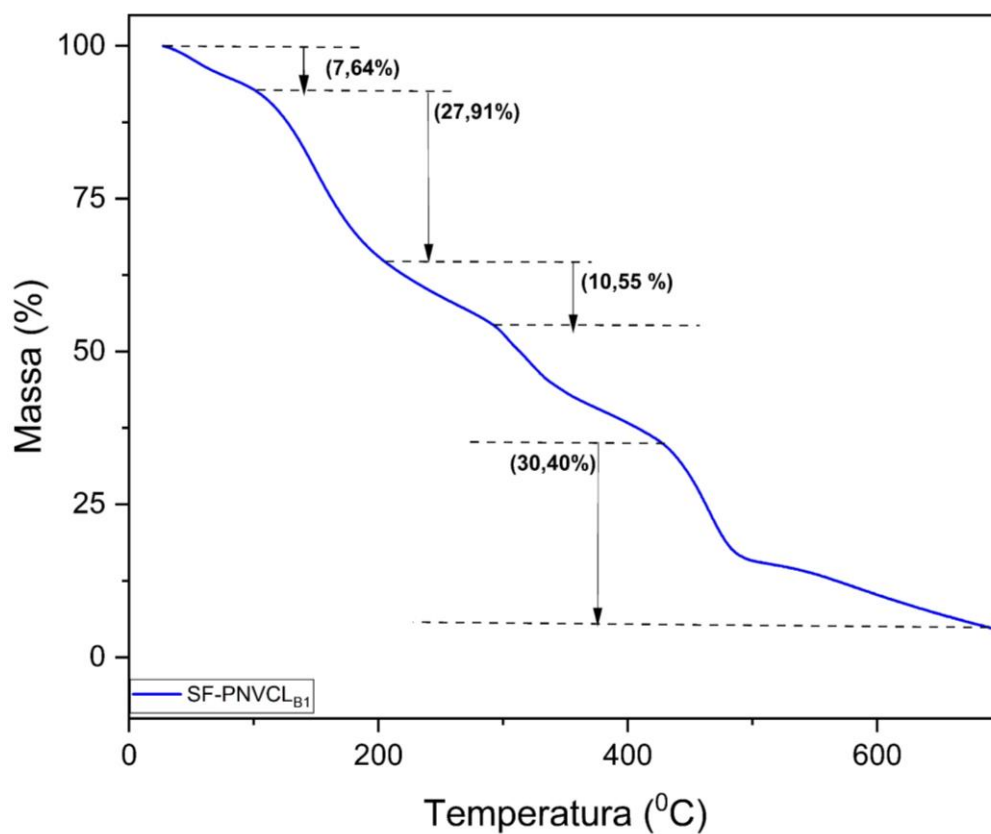


Figura G2. Curva de TGA do sistema híbrido SF-PNVCL_{B1}

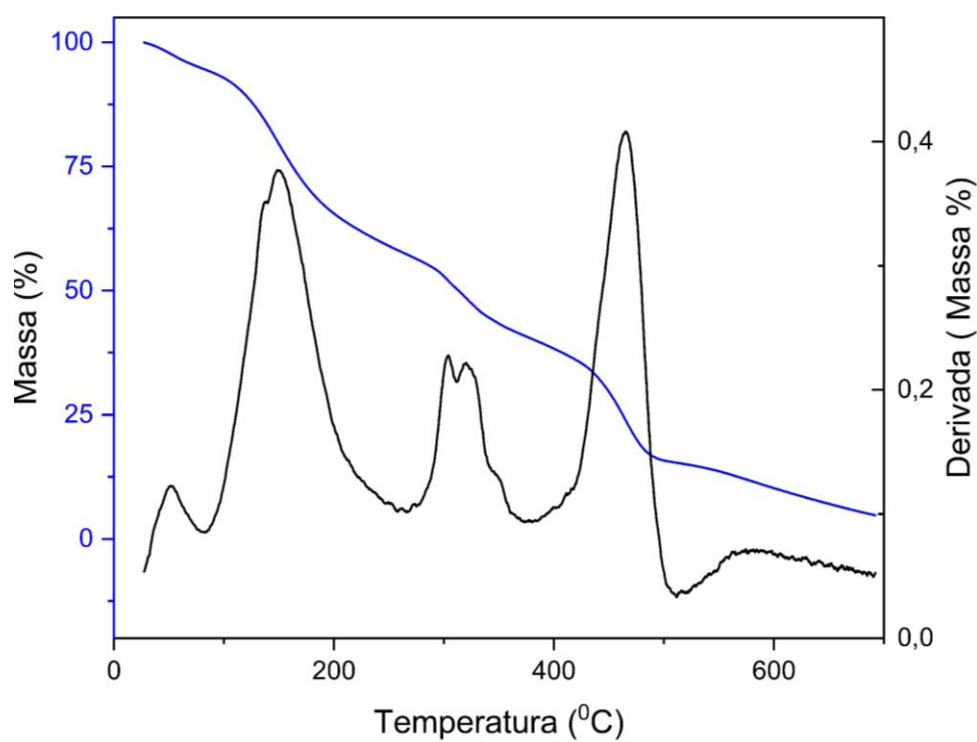


Figura G3. Curva DTG do sistema SF-PNVCL_{B1}

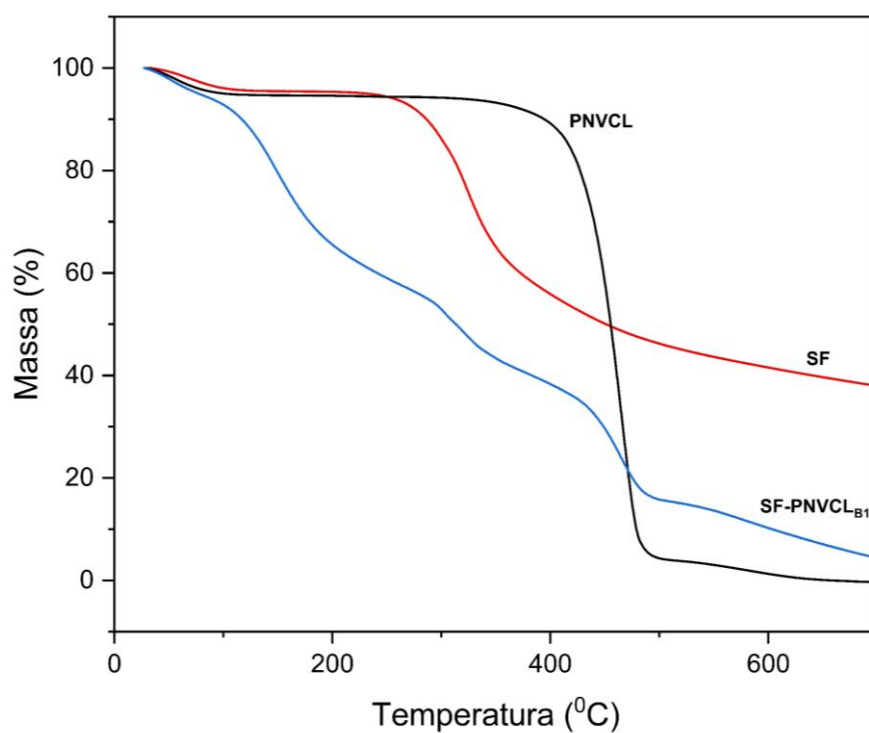


Figura G4. Comparação das curvas de TGA de SF-PNVCL_{B1}, fibroína (SF) e PNVL

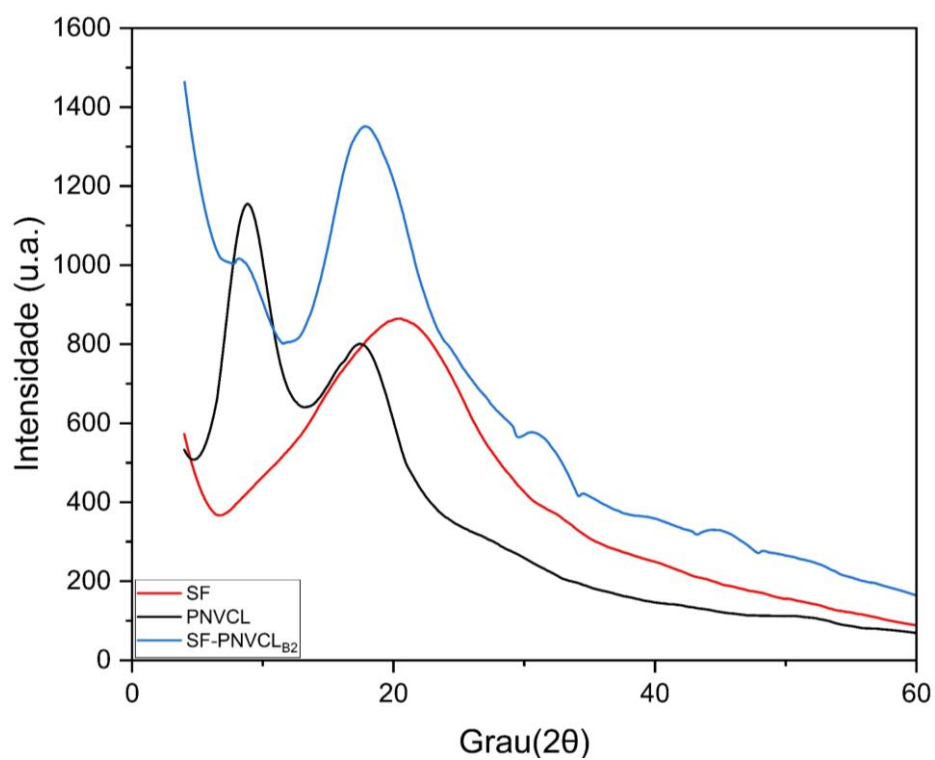


Figura G5. Difratomogramas de raios X das amostras de fibroína de seda (SF), PNVL e do sistema híbrido SF-PNVCL_{B1}

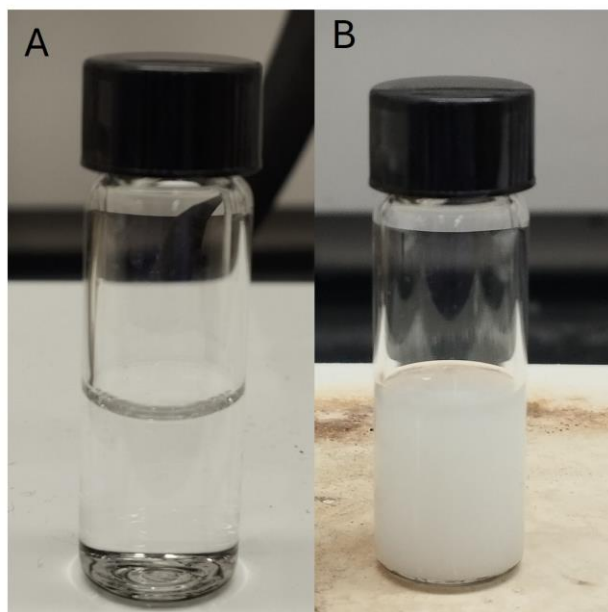


Figura G6. Análise visual do sistema híbrido SF-PNVCL_{B1} a 5 mg/mL em duas condições de temperatura, evidenciando seu comportamento termorresponsivo. (A) Solução à temperatura ambiente (~25 °C), (B) Solução à acima de 40 °C.

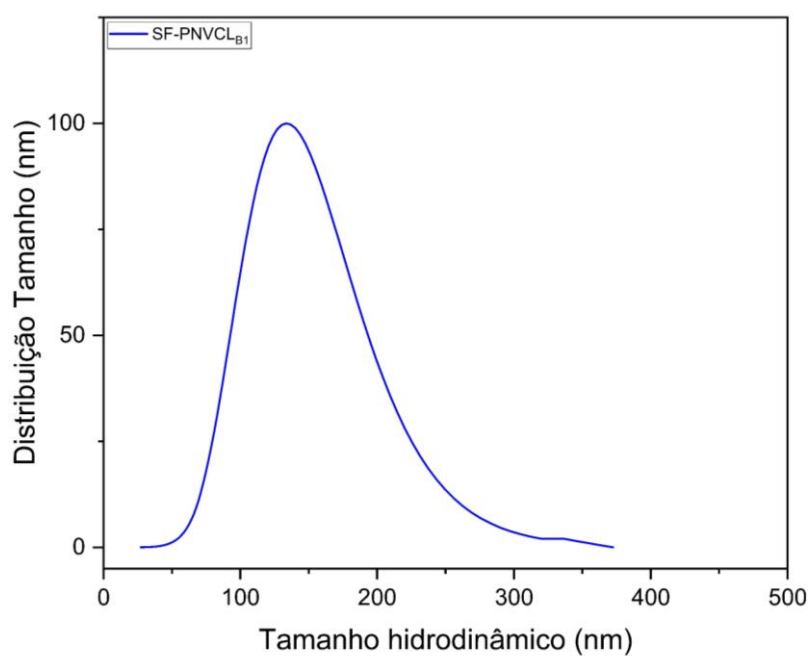


Figura G7. Distribuição de tamanho hidrodinâmico das nanopartículas SF-PNVCL_{B1}

Tabela G1 Tamanho hidrodinâmico, potencial zeta, PDI para (SF) , SF-PNVCL_{B1} , SF + PNVCL e PNVCL e parâmetros de encapsulamento da curcumina no sistema híbrido SF-PNVCL_{B1}

Amostra	Tamanho hidrodinâmico médio (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	EE%	CC%
SF	83,16	0,198	-39,48	-	-
SF-PNVCL _{B1}	178,84	0,191	-9,28	45,95	4,01
SF + PNVCL	-	-	-35,00	-	-
PNVCL	-	-	-44,23	-	-

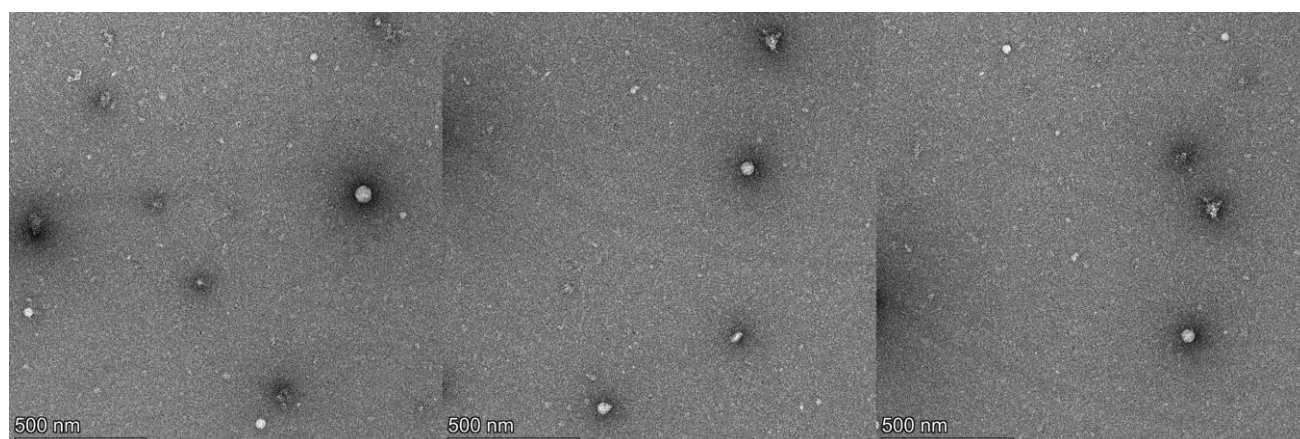


Figura G8. Micrografias de TEM das nanopartículas do sistema híbrido SF-PNVCL_{B1}.

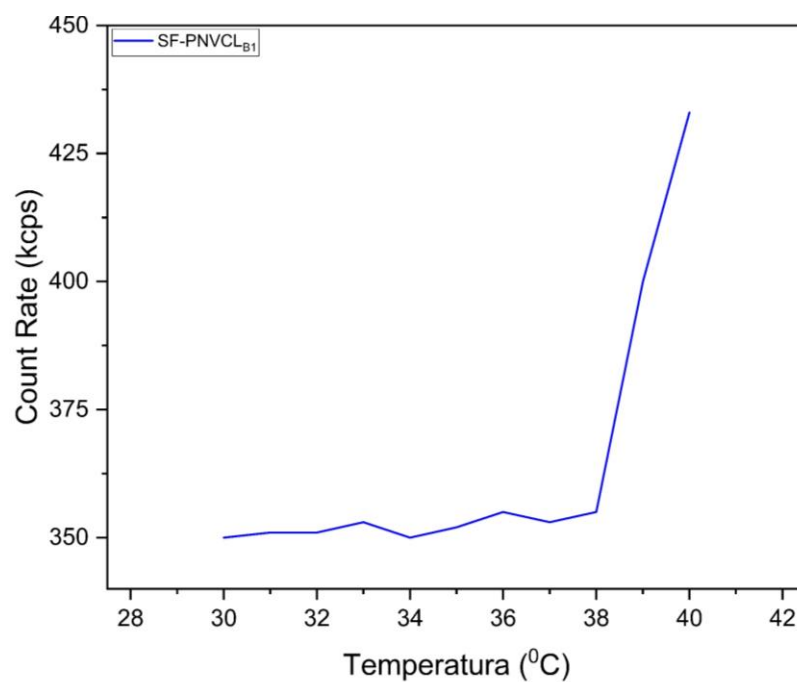


Figura G9. Perfil termorresponsivo do sistema híbrido SF-PNVCL_{B1}

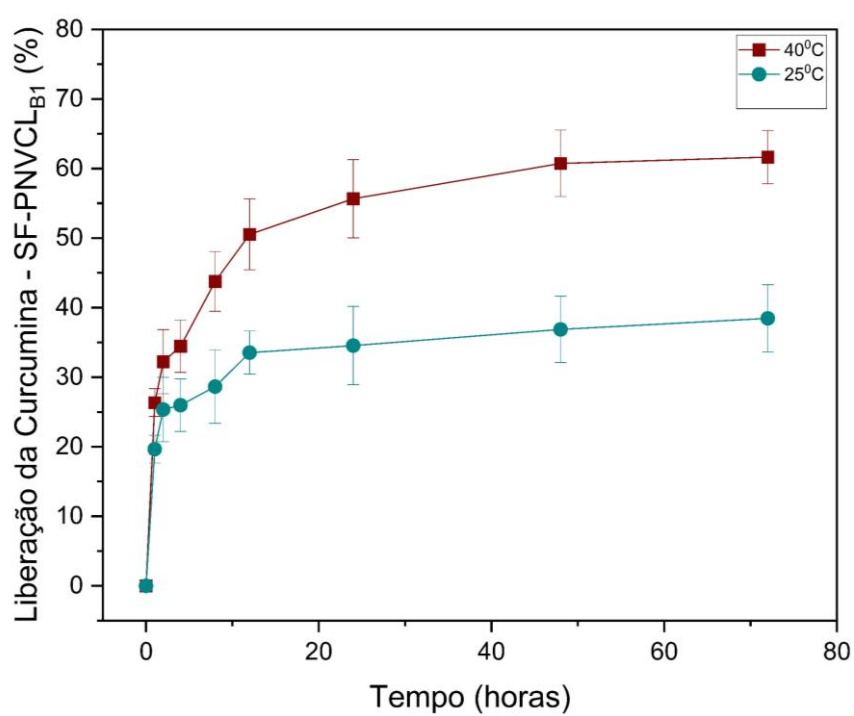


Figura G10. Perfil de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{B1}

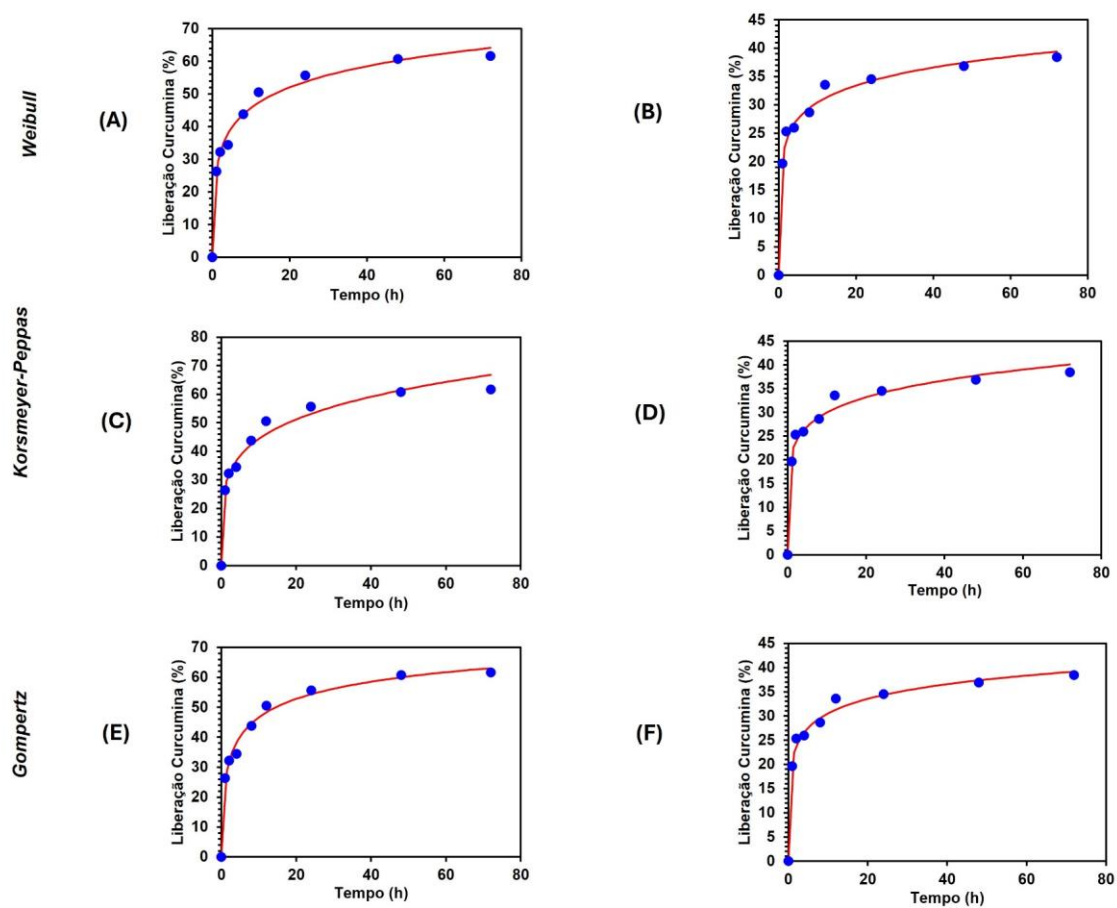


Figura G11. Curvas dos dados experimentais de liberação da curcumina a partir do sistema híbrido SF-PNVCL_{B1}

PRODUÇÃO CIENTÍFICA PRODUZIDA DURANTE O DOUTORAMENTO

ARTIGOS PUBLICADOS

- **Maia, M.V.**; Egito, E.S.T.d.; Sapin-Minet, A.; Viana, D.B.; Kakkar, A.; Soares, D.C.F. Fibroin-Hybrid Systems: Current Advances in Biomedical Applications. *Molecules* 2025, 30, 328. doi.org/10.3390/molecules30020328
- dos Santos, D.M.M.; de Oliveira, G.L.; Soares, D.C.F.; **Maia, M. V.**; Heyraud, A.; Tallia, F.; Jones, J.R.; Houmard, M.; Nunes, E.H.M. One-Step Room Temperature Fabrication of Freeze-Cast 58S Bioactive Glass / Polyvinyl Alcohol Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Ceram. Int.* 2025, doi:10.1016/j.ceramint.2025.02.299.
- Carvalho, J. do C.L.; do Amaral, G.G.M.; Soares, D.C.F.; **Maia, M.V.**; Oliveira, C.A. de S.; Oliveira, C.E.M.; da Silva, E.E.; de Moraes, E.A.; Silva, G.J.B.; Geraldo, V. Synthesis of Carbon Nanotube-Based Nanocement: Application in Biocompatible Mortar with Reduced Environmental Impact. *Carbon N. Y.* 2025, 234, 119932, doi:10.1016/j.carbon.2024.119932.
- dos Santos, D.M.M.; de Oliveira, G.L.; Soares, D.C.F.; **Maia, M. V.**; Tallia, F.; Heyraud, A.; Jones, J.; Houmard, M.; Nunes, E.H.M. Preparation of Freeze-Cast Scaffolds from 58S and 13–93 Sol-Gel Bioactive Glasses for Bone Tissue Engineering Applications. *Mater. Chem. Phys.* 2025, 332, 130308, doi:10.1016/j.matchemphys.2024.130308.

TRABALHOS APRESENTADOS

- **MAIA, M. V.**; KAKKAR, A.; SOARES, D. C. F. *Nanopartículas híbridas termossensíveis de BSA-PNVCL como potencial sistema carreador de agentes terapêuticos*. Apresentado no Encontro de Química Medicinal – 2024, Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), Itajubá, MG.
- **MAIA, M. V.**; KAKKAR, A.; SOARES, D. C. F. *Thermo-responsive protein-polymer hybrid nanoparticles for drug delivery*. Apresentado no 26th Chemistry and Biochemistry Graduate Research Conference – 2024, Concordia University, Loyola Campus, Montreal, Canadá.

- **MAIA, M. V.** *Nanopartículas híbridas para o tratamento de câncer*. Apresentado na Mostra de Projetos de Pesquisa da Pós-Graduação – 2021, Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), campus Itabira, MG, Brasil.

PATENTE

- **SOARES, D. C. F.; MAIA, M. V.; VIANA, D. B.** *Processo para detecção e análise de Cisplatina e substâncias correlatas por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*. Patente: Privilégio de Inovação. Número de registro: BR10202401773. Instituição de registro: INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Data de depósito: 28 de agosto de 2024. País: Brasil.