

HIDROGEL DE QUITOSANA/GELATINA COMO BIOCOMPÓSITO PARA VEICULAÇÃO DE AZUL DE METILENO

Letícia Gabriela Machado Pinto, Janicy Arantes Carvalho, Jéssica Aparecida Ribeiro Ambrósio, Milton Beltrame Junior, Andreza Ribeiro Simioni.

¹Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, leticiagmp2005@gmail.com, janicyjun@gmail.com, jessicaacdc.ja@gmail.com, beltrame@univap.br, simioni@univap.br

Resumo

O trabalho aborda a síntese e caracterização de um hidrogel de quitosana/gelatina incorporado com o princípio ativo azul de metileno como fotossensibilizador (FS) para aplicação futura em terapia fotodinâmica (TFD). O hidrogel foi sintetizado por meio da reticulação química, realizando a mistura dos biopolímeros, seguida da incorporação do corante e a adição do agente reticulante formando o sistema biocompósito (BC). Como caracterização do BC foram realizadas as seguintes análises: microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no UV-Visível e grau de intumescimento (GI). As imagens de MEV apresentaram redes tridimensionais. As análises feitas no UV-Visível não apresentaram anormalidades nas propriedades do hidrogel. O teste de intumescimento mostrou boa capacidade absorviva. A caracterização do sistema demonstrou eficiência na encapsulação do princípio ativo, apresentando potencial para aplicação em TFD.

Palavras-chave: Hidrogel. Azul de metileno. Quitosana. Gelatina. Terapia fotodinâmica.

Área do Conhecimento: Engenharias - Engenharia Química.

Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) oferece um tratamento minimamente invasivo para condições como cânceres e infecções resistentes à antibiótico. A TFD combina três componentes para o tratamento, sendo eles: um fotossensibilizador (FS), luz em um comprimento de onda específico e oxigênio molecular, sendo capaz de gerar uma resposta citotóxica em tecidos comprometidos devido a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O método apresenta vantagens aos tratamentos tradicionais por ter a capacidade de preservar o tecido saudável em volta do tecido danificado, tornando-se mais atrativo comparado a outros métodos, como cirurgia e quimioterapia, especialmente em casos onde estas abordagens são limitadas ou contraindicadas (Suzuki, 2015; Neves, 2019).

Um FS é um composto sensível a luz capaz de irradiar tecidos infectados e resultar em morte celular de uma área delimitada. O azul de metileno é um corante orgânico sensível a luz amplamente utilizado como FS em diversas aplicações. O corante age de forma versátil, podendo ser utilizado em técnicas de diagnóstico, imagem e terapia fotodinâmica, além de apresentar propriedades farmacêuticas como sua ação antimicrobiana (Mendes, 2023; Schaeffer *et al.*, 2019).

Os sistemas hidrogéis são compostos por redes tridimensionais poliméricas e podem ser constituídos de polímeros naturais, polímeros sintéticos ou a combinação dos dois materiais. Esses sistemas apresentam capacidade de responder estímulos externos e capacidade de intumescimento de água, tornando-os versáteis para sistemas de liberação modificada (*drug delivery systems – DDS*) (Carvalho, 2017; Lorenzoni, 2017).

Polímeros são macromoléculas formadas pela repetição de unidades menores chamadas monômeros. A quitosana é um biopolímero com ação antibacteriana originado da desacetilação da quitina. Devido a sua estrutura, o material pode sofrer diversas modificações sem perder suas propriedades, tornando-a opção viável para síntese de hidrogéis. A gelatina é um polímero derivado do colágeno que possui propriedades biocompatíveis que permitem que o corpo a absorva gradualmente sem causar efeitos colaterais, por isso o material é comumente utilizado em sínteses de hidrogéis para DDS (Oliveira, 2013; Yang *et al.*, 2024; Vo *et al.*, 2021).

Visando os tópicos abordados, este trabalho teve como objetivo sintetizar um sistema hidrogel utilizando como base os biopolímeros gelatina e quitosana a fim de realizar o encapsulamento eficiente do corante azul de metileno visando futura aplicação com protocolos de TFD.

Metodologia

A síntese do hidrogel foi baseada na metodologia descrita por Lam *et al.* (2021) e Moreira (2018) com modificações. Primeiramente é realizada a dissolução da quitosana em solução de ácido acético 1%. Em seguida, adiciona-se a gelatina ao meio reacional, mantendo o sistema sob agitação constante e aquecimento (40 °C). Na última etapa, adiciona-se o glutaraldeído como agente reticulante para formação do sistema biocompósito (BC). A reação se procede pelo processo de gelificação sob temperatura ambiente, com lavagens aquosas consecutivas, a fim de retirar impurezas.

Para a síntese do hidrogel encapsulado com azul de metileno, após o processo de adição da gelatina na solução inicial de quitosana foi adicionado o azul de metileno 1 mg.mL⁻¹ (dissolvido em solução alcoólica de DMSO 10%). O sistema é mantido em agitação constante até se tornar homogêneo, para garantir uma distribuição eficiente do corante no BC. Posteriormente, é adicionado o glutaraldeído e o sistema hidrogel formado segue para o processo de gelificação e lavagem conforme o descrito acima.

Para caracterizar o sistema foram feitas as seguintes análises: microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no UV-Vis e grau de intumescimento (GI).

A morfologia do sistema hidrogel foi caracterizada por meio do MEV utilizando equipamento EVO-MA10 (Zeiss, Alemanha), IP&D-UNIVAP. Esta técnica permite avaliar a morfologia do hidrogel, uma vez que a mesma tem relação com a capacidade ou não da liberação de medicamentos no alvo do tratamento.

Os estudos no UV-Vis foram realizados no equipamento CARY 50 (Bio, VARIAN). Este estudo permite a comparação dos espectros do azul de metileno (na ausência dos sistemas sintetizados e encapsulada), permitindo a avaliação da ocorrência ou não de alteração espectral devida ao processo de encapsulamento. A concentração do azul de metileno no hidrogel foi quantificada por curva de calibração e Lei de Lambert-Beer que relaciona a absorção de luz do composto com suas propriedades específicas (Siqueira-Moura *et al.*, 2010).

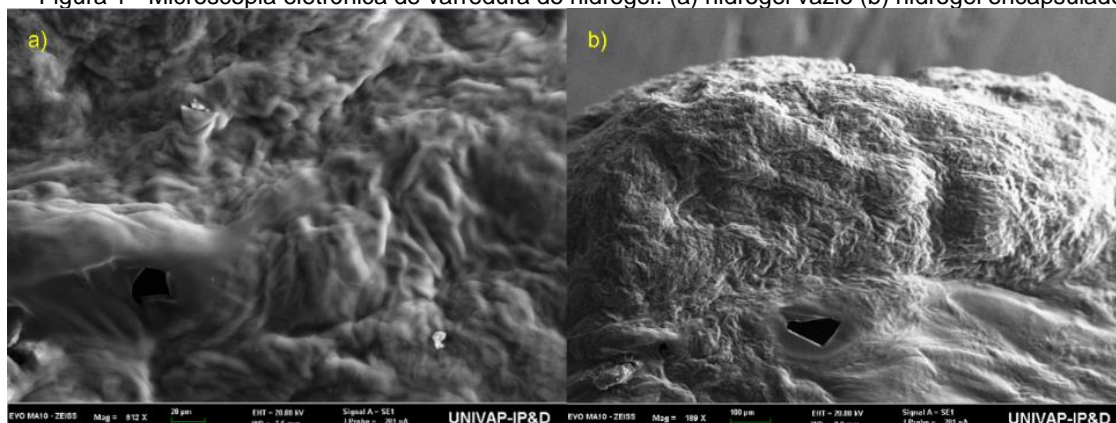
Por apresentarem redes tridimensionais os sistemas hidrogel tem a capacidade de absorver e reter solventes sem perder as suas propriedades químicas e estruturais. O tratamento das amostras para o ensaio do grau de intumescimento (GI) foi feito com base na metodologia descrita por Saidi *et al.* (2020). Inicialmente as amostras são liofilizadas, pesadas, imersas em água deionizada por um período pré-estabelecido, secas a partir da prensagem em papel absorvente e pesadas novamente. Todos os testes foram feitos em triplicata (Equação 1).

$$GI = (\text{Massa do sistema intumescido} - \text{Massa inicial}) / (\text{Massa inicial}) \times 100 \quad (1)$$

Resultados

A análise da morfologia do sistema (Figura 1) foi feita a partir da técnica de MEV e revelaram uma estrutura porosa característica, com poros distribuídos ao longo da estrutura. A superfície do hidrogel encapsulado exibiu uma textura mais rugosa e irregular, sugerindo a presença do azul de metileno aderido à matriz polimérica.

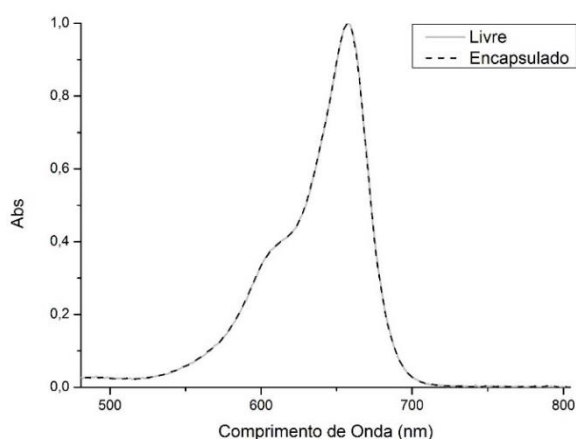
Figura 1 - Microscopia eletrônica de varredura do hidrogel: (a) hidrogel vazio (b) hidrogel encapsulado.



Fonte: os autores (2024)

A partir da espectroscopia no UV-Visível (Figura 2) foi realizada a caracterização do hidrogel encapsulado com azul de metileno e a sua comparação com uma amostra de azul de metileno dissolvida em DMSO 10 % ($0,5\mu\text{mol.L}^{-1}$).

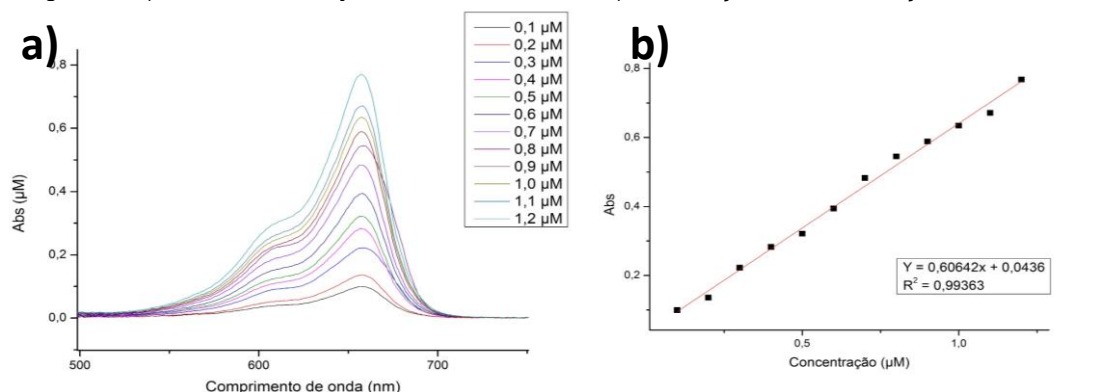
Figura 2 - Curva comparativa de azul de metileno livre e incorporada no hidrogel



Fonte: os autores (2024)

Para a avaliação do comportamento do azul de metileno em diferentes concentrações foi realizada uma curva de calibração (Figura 3). As diluições foram feitas com base em uma solução estoque de concentração $1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ do FS, diluído em solução alcoólica de DMSO 10%.

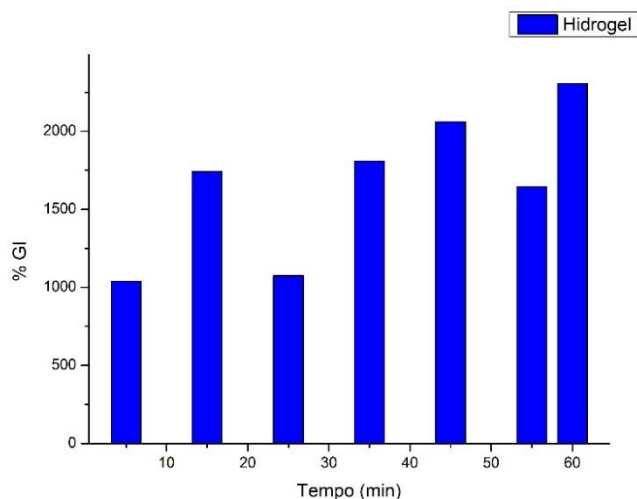
Figura 3 - a) Curva de calibração do azul de metileno, b) linearização da concentração x absorvância.



Fonte: os autores (2024)

A Figura 4 e Tabela 1 apresentam o GI do hidrogel em função do tempo de imersão em minutos. A média de intumescimento do hidrogel observada foi de 1667,6%.

Figura 4 - Grau de Intumescimento.



Fonte: os autores (2024)

Tabela 1 – Média do Grau de Intumescimento.

Tempo (minutos)	GI (%)
5	1038,4
15	1740,9
25	1074,2
35	1808,4
45	2061,0
55	1646,3
60	2304,4

Fonte: Os autores (2024)

Discussão

As imagens obtidas por meio de MEV mostram que a matriz do hidrogel possui uma estrutura porosa, com poros de tamanho variado e uma rede tridimensional interconectada, segundo Maiti *et al.* (2021). Esta estrutura é fundamental para a capacidade de intumescimento do hidrogel, permitindo a absorção de grandes quantidades de água através da matriz.

De acordo com Ambrosio (2019) o azul de metileno apresenta absorção máxima na região entre 550-700 nm. O hidrogel sintetizado apresentou absorção máxima em 658 nm, região conhecida como janela terapêutica (que apresenta maior penetração da luz no tecido).

A fim de utilizar os valores da absorbância para quantificar o azul de metileno foi realizada a curva de calibração, a partir da qual obteve-se a equação de concentração do FS na formulação do hidrogel e a linearidade do método, que demonstra relação direta entre absorbância e concentração.

Foi encontrado um valor satisfatório na faixa de concentração entre 0,1 e 1,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($R^2 = 0,99363$ – coeficiente de determinação), apresentando a seguinte correlação linear: $Y = 0,60642 \times [\text{Concentração de azul de metileno } (\mu\text{mol.L}^{-1})] + 0,0346$. A concentração encontrada de azul de metileno no hidrogel foi de 1,87 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

O grau de intumescimento é a capacidade de um polímero reter água sem danificar sua estrutura e sem perder suas propriedades. Como observado na Figura 4, os resultados do grau de intumescimento (GI) mostraram uma variação significativa quando exposto a um meio aquoso em diferentes períodos de imersão. Magli *et al.* (2020) obteve grau de intumescimento médio de aproximadamente 1700% para amostras liofilizadas em um período de estudo entre 2 e 24h, em meio de pH 7,4.

Conclusão

Devidos suas propriedades favoráveis a engenharia biomédica, engenharia de tecidos e nanociência, o sistema hidrogel tem sido alvo de estudos para sistema de liberação modificada, especialmente para encapsulamento de FS para TFD. Os resultados dos estudos realizados no hidrogel quitosana/gelatina e hidrogel quitosana/gelatina-azul de metileno apontaram características relevantes para sua eficiência e aplicação em DDS.

As imagens do MEV confirmaram a configuração em rede das cadeias do hidrogel. As análises do UV-Visível mostraram que o processo de encapsulamento não alterou as propriedades espectrais do azul de metileno. Além disso após a realização da curva de calibração foi possível determinar a sua concentração no hidrogel. Os testes de intumescimento demonstraram eficiência na retenção de solventes.

Com base dos resultados obtidos, o hidrogel de quitosana/gelatina se mostra um candidato promissor para utilização em DDS.

Referências

AMBROSIO, J. A. R.; PINTO, B. C. S.; GODOY, D. S.; CARVALHO, J. A.; ABREU, A. S.; DA SILVA, B. G. M.; LEONEL, L. C.; COSTA, M. S.; BELTRAME JUNIOR, M.; SIMIONI, A. R. Gelatin nanoparticles loaded methylene blue as a candidate for photodynamic antimicrobial chemotherapy applications in *Candida albicans* growth. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, v. 31, p. 1-15, 2019.

CARVALHO, I. C. **Hidrogéis Híbridos Poliméricos de Quitosana Funcionalizada e Gelatina Fotoreticulados como Matrizes Porosas Tridimensionais para Potencial Reparo de Tecido Epitelial**. 2017. 168 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Metalúrgica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

LAM, A. X.; TEOW, Y. H.; HO, K. C. Effect of Monomers for the Synthesis of ChitosanBased Hydrogel. *International Journal of Nanoelectronics and Materials*, v. 2, n. 14, p. 113-126, abr. 2021.

LORENZONI, R. **Hidrogel de quitosana contendo capsaicinóides nanoencapsulados: produção, caracterização, dermatofarmacocinética e avaliação farmacodinâmica em modelo animal de dor neuropática periférica**. 2017. 179 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

MAGLI, S.; ROSSI, G. B.; RISI, G.; BERTINI, S.; COSENTINO, C.; CRIPPA, L.; BALLARINI, E.; CAVALETTI, G.; PIAZZA, L.; MASSERONI, E.; NICOTRA, F.; RUSSO, L. Design and Synthesis of Chitosan-Gelatin Hybrid Hydrogels for 3D Printable *in vitro* Models. **Front Chem.** v.8, 2020.

MAITI, S.; KHILLAR, P. S.; MISHRA, D.; NAMBIKAR, N. A.; JAISWAL, A. K. Physical and self-crosslinking mechanism and characterization of chitosan-gelatin-oxidized guar gum hydrogel. **Polymer Testing**. v.97, n.107155, 2021.

MENDES, Gabriela Vieira. **DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA CARREADOR DE AZUL DE METILENO EM GELLAN GUM PARA APLICAÇÃO NA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA CONTRA *Candida albicans***. 2023. 58 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Ciências Aplicadas À Saúde Bucal, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2023.

MOREIRA, C. D. F. **Hidrogéis injetáveis a base de quitosana/gelatina/nanopartículas de vidro bioativo com potencial para regeneração óssea: estudo in vitro e in vivo**. 2018. 153 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Metalúrgica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018

NEVES, R. C. S. **Plataforma multifuncional a base de gel aplicada a terapia fotodinâmica e fototérmica para câncer de pele**. 2019. 161 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

OLIVEIRA, A. P. R. **Desenvolvimento de membranas de gelatina/quitosana e o processo de reticulação.** 2023. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Interunidades em Bioengenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

SAIDI, M.; DABBAGHI, A.; RAHMANI, S. Swelling and drug delivery kinetics of click-synthesized hydrogels based on various combinations of PEG and star-shaped PCL: influence of network parameters on swelling and release behavior. **Polymer Bulletin**, v.77, p. 3989–4010, 2020.

SCHAEFFER, Bárbara; D'AVIZ, Fernando Soveral; GHIGGI, Paula Cristine; KLASSMANN, Larissa Magnus. Terapia fotodinâmica na endodontia: revisão de literatura. **Journal Of Oral Investigations**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 86, 17 abr. 2019.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminumphthalocyanine in nanocarriers. **Pharmazie**, v. 65, n. 1, p.1-6, 2010.

SUZUKI, I. L. **Viabilização da curcumina natural nanoencapsulada para inativação fotodinâmica.** 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

VO, T. S.; VO, T. T. B. C.; NGUYEN, T. S.; TIEN, T. T. Fabrication and Characterization of Gelatin/Chitosan Hydrogel Membranes. **J. Turkish Chem. Soc. Sect. A**, v. 4, n. 8, p. 1045-1056, set. 2021.

YANG, J.; DUAN, A.; SHEN, L.; LIU, Q.; WANG, F.; LIU, Y. Preparation and application of curcumin loaded with citric acid crosslinked chitosan-gelatin hydrogels. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 264, p. 130801, abr. 2024.