

Estudo do Efeito da Concentração de Gelatina na Morfologia e no Grau de Intumescimento do Hidrogel

Jéssica A. R. Ambrosio, Bruna C. dos S. Pinto, Vitor L. M. Marmo & Andreza R. Simioni

Os sistemas hidrogel vem ganhando cada vez mais espaço em aplicações conjuntas com a engenharia biomédica. A Terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento que se baseia na combinação de um fotossensibilizador (FS), luz e o oxigênio molecular levando a formação de espécies reativas (ROS), como o oxigênio singleto, responsável pela morte celular do alvo. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da concentração de gelatina e da reticulação em três grupos de hidrogel. Os resultados foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e quanto a capacidade de intumescimento (% GI).

Palavras-chave: *hidrogel; terapia fotodinâmica; cloro alumínio ftalocianina.*

Hydrogel systems have been gaining more and more space in joint applications with biomedical engineering. Photodynamic Therapy (PDT) is a treatment modality that is based on the combination of a photosensitizer (PS), light and molecular oxygen leading to the formation of reactive species (ROS), such as singlet oxygen, responsible for target cell death. The objective of this work was to evaluate the influence of gelatin concentration and cross-linking in three hydrogel groups. The results were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and for swelling capacity (% GI).

Keywords: *hydrogel; photodynamic therapy; chlorine aluminum phthalocyanine.*

Introdução

Mesmo com todos os avanços da medicina nos últimos anos e as mudanças que os tratamentos apresentaram em decorrência dos avanços tecnológicos, a maioria dos casos que apresentam o câncer como diagnóstico tem como principal alternativa de tratamento a cirurgia, que pode trazer inúmeros problemas ao paciente. Na contramão desta tendência está o crescente de novas técnicas menos invasivas e danosas ao paciente, como a Terapia Fotodinâmica.¹

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento baseada em três principais pilares: Luz em comprimento de onda adequado, oxigênio e um fotossensibilizador (FS). A técnica apresenta vantagens quando comparada as técnicas convencionais como a cirurgia, como por exemplo a diminuição da frequência de aplicação e a não – invasividade. Na atualidade a TFD é usada em conjunto com a cirurgia, de modo a trazer mais segurança e a erradicação total do tumor. Na técnica o FS é preferencialmente acumulado no tecido doente, trazendo maior seletividade a técnica.^{1,2}

O princípio de funcionamento da TFD se inicia com a administração do FS, seguida pela irradiação do local após um período pré-determinado de espera. As reações provenientes do contato dos fótons presentes na luz e os elétrons do FS levam a liberação de energia, que em contato com o oxigênio molecular levam a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o oxigênio singlete, que é o principal responsável pela erradicação do tumor.³

A Cloro Alumínio Ftalocianina (ClAlPc) é um fotossensibilizador recomendado para uso combinado com a Terapia Fotodinâmica (TFD), uma vez que apresenta atividade antimicrobiana conhecida na literatura em ensaios *in vitro* e *in vivo*, além de não sofrer alteração de propriedades quando em contato com um sistema de liberação e a alta capacidade de geração do oxigênio singlete.^{2,4,5}

O avanço da nanotecnologia e o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada permitiu que muitos

tratamentos tópicos fossem desenvolvidos, dentre eles pode-se destacar o uso de sistemas hidrogel. O câncer de pele é uma das variações mais comuns da doença e pode ser tratado por cirurgia apenas em alguns casos, tornando ainda maior a necessidade do desenvolvimento de outras técnicas de tratamento tópico.^{6,7}

Um sistema hidrogel é formado por uma estrutura em rede disposta em formato tridimensional por toda a sua extensão, tendo como sua principal característica a propriedade de intumescimento, que permite a absorção e retenção de ao menos 10% do peso do sistema.⁸

A propriedade de intumescimento aliada ao encapsulamento de um fotossensibilizador pode contribuir para o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada (*Drug Delivery System* – DDS). Um DDS atua como carreador do princípio ativo, atuando de forma direcionada e direta no alvo do tratamento^{8,9}. A gelatina é um polímero derivado do colágeno, portanto pertencente a classe dos polímeros naturais, que apresenta propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade, além do baixo custo.¹⁰

Além da preocupação com as trocas que acontecem devido ao contato do sistema hidrogel com a pele durante o tratamento e a influência deste fenômeno na cicatrização, deve-se atentar também ao modelo e as características do sistema em questão, uma vez que se tratando de um hidrogel existe o processo de gelificação, já no caso das nanopartículas sabe-se também que o tamanho das mesmas pode exercer influência neste processo.^{11,12}

Com o objetivo de comparar e investigar a influência que a gelatina e a reticulação exercem na morfologia e na capacidade de intumescimento do sistema o estudo propõe a análise por microscopia eletrônica de varredura e a avaliação da capacidade de intumescimento de três formulações de hidrogel.

Materiais e Métodos

A síntese do hidrogel foi feita com base na metodologia descrita por BAKRAVI, A et.al (2018) com

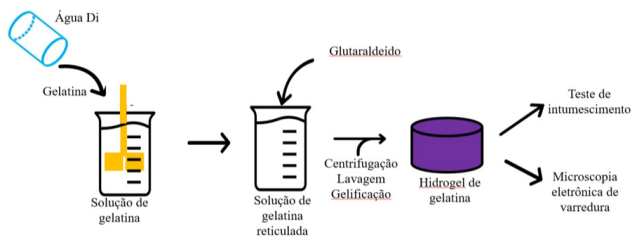
pequenas alterações baseadas em FRACHINI, E.C.G (2019). As proporções de gelatina em cada grupo e o grau de reticulação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Especificações dos grupos sintetizados.

Formulação	Quantidade de gelatina / água Di	Agente Reticulante
Menos concentrado	2,5g/100mL (2,5%)	1µL
Formulação padrão	5,0g/100mL (5%)	1µL
Mais concentrado	7,5g/100mL (7,5%)	1µL

Em todas as sínteses utilizou-se o glutaraldeído como agente reticulante, os testes de intumescimento foram realizados com água deionizada a temperatura ambiente, as amostras utilizadas na microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em parte dos estudos de intumescimento passaram previamente pelo processo de liofilização. O Fluxograma de síntese e testes é representado na Figura 1.

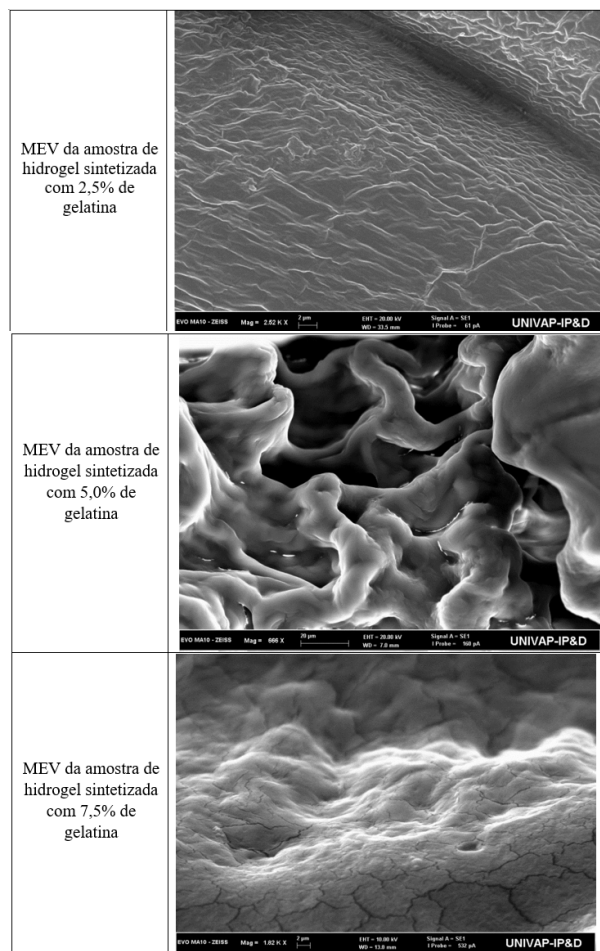
Figura 1: Fluxograma de síntese e caracterização. Fonte: O Autor.



Resultados e Discussão

A síntese das três amostras de hidrogel que formam o estudo foi feita com base no método de reticulação química. O Quadro 1 mostra os resultados das análises de MEV das três amostras.

Quadro 1: Resultado das análises da MEV. Fonte: O Autor



A literatura cita que a relação entre o tamanho dos poros do sistema hidrogel e o seu potencial de intumescimento como sendo diretamente proporcional, fato que pode ser comprovado a partir da observação do Quadro 1, uma vez que os maiores tamanhos de poro foram encontrados nas amostras de 5% presentes no grupo liofilizado, que apresenta melhores capacidades de intumescimento no período estudado.¹³

A morfologia em rede tridimensional, bem como a capacidade de intumescimento são características

primordiais para que um sistema possa ser classificado como hidrogel. O processo de fabricação e a composição do sistema podem interferir em parâmetros espaciais e biológicos do mesmo, facilitando os processos de avaliação e aplicação destes sistemas. Sabe-se também que o modelo de gelificação usado na fabricação pode interferir nos resultados do MEV.^{14,15}

Na comparação das imagens de MEV em cada uma das condições utilizadas no estudo observa-se que a imagem referente a amostra sintetizada com 5% de gelatina apresenta estrutura mais densa, característica que juntamente com a homogeneidade é um indicativo de que o processo de *crosslinking* ocorreu de forma correta.¹⁶

Todos os grupos sintetizados apresentaram os poros em estrutura micrométrica, escala que exerce influência no comportamento das células com as quais entra em contato, melhorando a adesão e o crescimento celular.^{17,18}

A natureza do polímero base para o desenvolvimento de um sistema hidrogel pode determinar algumas características futuras do sistema. BANG, S et.al, 2017 cita que a escolha de um polímero natural traz ao sistema as características de biocompatibilidade, enquanto um polímero sintético pode apresentar melhor formação das redes tridimensionais.¹⁷

A gelatina é um polímero natural derivado do colágeno que apresenta boas características de adesão e temperatura de transição sol-gel em torno de 30°C. Altas temperaturas levam a formação de hidrogéis de maneira mais rápida. TREESUPPHARAT, W et.al, 2017 fabricou compósitos de gelatina e celulose bacteriana e a partir das análises dos espectros de MEV observou a relação da quantidade de gelatina na formulação e o tamanho dos poros, e a classificou como diretamente proporcional.^{17,19}

Para a realização dos estudos de intumescimento (Quadro 2) das amostras, cada formulação de hidrogel sintetizado foi dividida em dois grupos: o hidratado (não sofreu tratamento posterior) e o liofilizado (após a síntese passou pelo processo de liofilização).

Em seguida as amostras foram dimensionadas, pesadas e imersas em água deionizada, os resultados e os períodos das avaliações estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

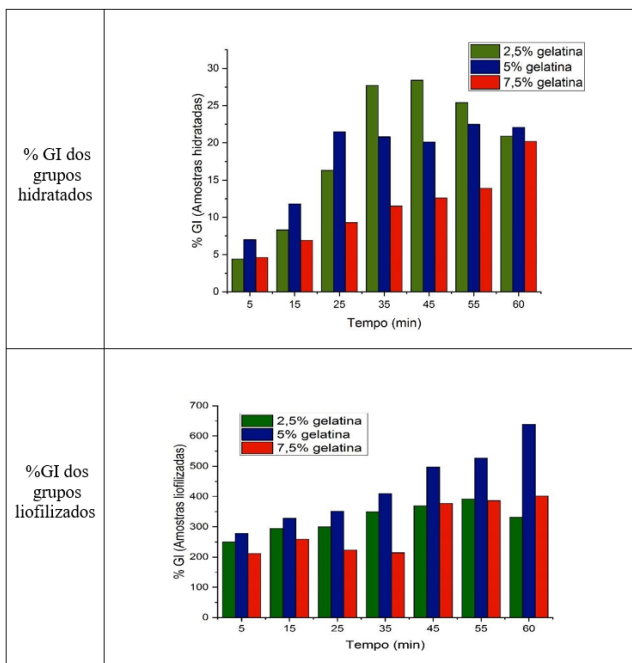
Tabela 2: Análises de intumescimento (Amostras hidratadas). Fonte: O Autor.

Tempo (min)	% GI 2,5g gelatina	% GI 5,0g gelatina	% GI 7,5g gelatina
05	4,4	7,0	4,6
15	8,3	11,8	6,9
25	16,3	21,5	9,3
35	27,7	20,8	11,5
45	28,4	22,1	12,6
55	25,4	22,5	13,9
60	20,9	22,1	20,2

Tabela 3: Análises de intumescimento (Amostras liofilizadas). Fonte: O Autor.

Tempo (min)	% GI 2,5g gelatina	% GI 5,0g gelatina	% GI 7,5g gelatina
05	249,9	277,8	211,5
15	294,3	328,0	258,5
25	300,2	351,1	223,1
35	249,0	409,6	213,9
45	369,6	497,8	377,4
55	391,7	527,2	386,4
60	331,1	638,5	401,9

Quadro 2: Resultados análises de intumescimento. Fonte: O Autor.



De acordo com CLAUS J et.al (2020) altas taxas de intumescimento podem refletir negativamente na adesão celular de uma formulação, sendo mais adequado escolher formulações com taxas medianas de intumescimento, que apresentam boa adesão celular devida à razão volume – superfície.²⁰

Zhao, Y; Sun, Z. (2017) afirmaram a relação inversamente proporcional entre a reticulação e o grau de intumescimento de uma formulação. Sabe-se também que a propriedade de intumescimento é afetada pelo processo de reticulação e outros fatores, como os solventes e reagentes utilizados na síntese, sua proporção e estabilidade, que podem afetar diretamente na força do sistema.^{13, 21-23} EL-HALAH, A et.al (2020) atribuiu um maior intervalo da penetração da água nas redes a dificuldade de relaxamento das mesmas, uma vez que já apresentam grande teor de água. O que pode ser observado nos dois gráficos, uma vez que a proporção de água na formulação do estudo chega a mais de 90% em um de seus grupos, justificando por exemplo, os

valores semelhantes apresentados pelos três grupos que passaram pelo processo de liofilização.¹³

Quando um sistema hidrogel atinge seu equilíbrio nos níveis de intumescimento, isso significa que o mesmo já alcançou a máxima expansão de sua cadeia. A alta densidade de cadeia gera um sistema que apresenta tamanho de poro menor, conseqüentemente mais difícil de ser expandido e apresentar altos índices de intumescimento. O processo também é afetado pelo grau de reticulação do sistema.^{23,24}

O grau de reticulação tem influência direta na capacidade de degradação um sistema hidrogel. O fenômeno também interfere na capacidade de intumescimento do sistema, que representa a capacidade de troca entre as partes relacionadas por contato, no caso o sistema hidrogel e a pele^{25,26}. De acordo com MOUSAVI, S et.al (2019) um sistema hidrogel adequado para uso como curativo deve apresentar porosidade e permitir a passagem de nutrientes, bem como outras características adequadas para aplicação conjunta com tecido vivo. A capacidade de absorção e retenção de água é fundamental para manter as boas condições no local da ferida e não interferir negativamente no processo de cicatrização da mesma.²⁷

Conclusão

As proporções de polímero e agente reticulante exercem grande influência no comportamento do sistema hidrogel, em características como estabilidade mecânica, adesão e intumescimento. Não é possível especificar uma formulação ideal, visto que cada polímero tem suas particularidades e possibilidades de aplicação, sendo necessária a experimentação de diferentes proporções até que as quantidades de intumescimento sejam satisfatórias e condizentes com a aplicação desejada. Com base no estudo pode – se dizer que a síntese realizada com 5% de gelatina em sua formulação apresentou resultados satisfatórios de intumescimento e configura um bom candidato para uso como DDS para aplicações envolvendo a TFD.

Referências

- CHEN, T; YAO, T; PENG, H; WHITTAKER, A. K; LI, Y; ZHU, S; WANG, Z. An Injectable Hydrogel for Simultaneous Photothermal Therapy and Photodynamic Therapy with Ultrahigh Efficiency Based on Carbon Dots and Modified Cellulose Nanocrystal. *Adv. Funct. Mater.* v.31, n.45, p.1-12, **2021**. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adfm.202106079>.
- CASTILHO-FERNANDES, A; LOPES, T.G; PRIMO, F.L; PINTO, M.R; TEDESCO, A.C. Photodynamic process induced by chloro-aluminum phthalocyanine nanoemulsion in glioblastoma. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* v.19, p. 221-228, **2017**. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100017301953>.
- SANTOS, A.F; ALMEIDA, D.R.Q; TERRA, L.F, BAPTISTA, M.S, LABRIOLA, L. Photodynamic therapy in cancer treatment – an update review. *J Cancer Metastasis Treat.* v.5, n.25, p.1-20, **2019**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209659/>.
- SILVA, D.N.A; SILVA, N.T; SENA, I.A.A; AZEVEDO, M.L.S; SILVA JÚNIOR, F.L; SILVA, R.C.M; VASCONCELOS, R.C; MORAES, M.M; LONGO, J.P.F; ARAÚJO, A.A; MARTINS, A.R.L.A. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy with chloro-aluminumphthalocyanine on periodontal clinical parameters and salivary GSH and MDA levels in patients with periodontitis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* v.31, p.1-6, **2020**. www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100020301976.
- MOHAMMED, I; OLUWOLE, D.O; NEMAKAL, M; SANNEGOWDA, L.K; NYOKONG, T. Investigation of novel substituted zinc and aluminium phthalocyanines for photodynamic therapy of epithelial breast cancer. *Dyes and Pigments.* v.170, p.1-11, **2019**. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0143720819305455>.
- ALGAHTANI, M. S; AHMAD, M.Z; AHMAD, J. Nanoemulsion loaded polymeric hydrogel for topical delivery of curcumin in psoriasis. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* v.59, p.1-12, **2020**. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1773224720311369>.
- CAPANEMA, N.S.V; MANSUR, A.A.P; CARVALHO, S.M; CARVALHO, I.C; CHAGAS, P; OLIVEIRA, L.C.A; MANSUR, H.S. Bioengineered carboxymethyl cellulose-doxorubicin prodrug hydrogels for topical chemotherapy of melanoma skin cancer. *Carbohydr. Polym.* v.195, p.401-412, **2018**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29804993/>.
- LIU, H; WANG, C; LI, C; QIN, Y; WANG, Z; YANG, F; LI, Z; WANG, J. A functional chitosan-based hydrogel as a wound dressing and drug delivery system in the treatment of wound healing. *RSC Adv.* v.8, p.7533-7549, **2018**. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2018/ra/c7ra13510f>.
- HOSSEN, S; HOSSAIN, M.K; BASHER, M.K; MIA, M.N.H; RAHMAN, M.T; UDDIN, M.J. Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *J. Adv. Res.* v.15, p.1-18, **2019**. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123218300791>.
- ZHAO, X; LANG, Q; YILDIRIMER, L; LIN, Z. Y; CUI, W; ANNABI, N; WOENIG, K; DOKMECI, M.R; GHAEMMAGHAMI, A.M; KHADEMOSSEINI, K. Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Adv. Healthcare Mater.* v.5, n.1, p.108-118, **2015**. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4608855/>.
- YU, W; LIU, R; ZHOU, Y; GAO, H. Size-Tunable Strategies for a Tumor Targeted Drug Delivery System. *ACS Cent. Sci.* v.6, p.100-116, **2020**. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscentsci.9b01139>.
- FRACHINI, E.C.G; PETRI, D.F.S. Magneto-Responsive Hydrogels: Preparation, Characterization, Biotechnological and Environmental Applications. *J. Braz. Chem. Soc.* v.30, n.10, p.2010-2028, **2019**. <https://www.scielo.br/j/bchs/a/Dxhb6fPz9JZCF9m5HjRRP9L/?lang=en>.
- EL-HALAH, A; GONZÁLEZ, N; CONTRERAS, J; LÓPEZ-CARRASQUERO, F. Effect of the synthesis solvent in swelling ability of polyacrylamide hydrogels. *J Polym Res.* v.27, n.21, p.1-10, **2020**. <https://www.springerprofessional.de/en/effect-of-the-synthesis-solvent-in-swelling-ability-of-polyacryl/17519826>.
- UNAGOLLA, J.M; JAYASURIYA, A.C. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Applied Materials Today.* v.18, n.100479, p.1-22, **2020**. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352940719305980>.
- ZHOU, X; ZHAO, F; GUO, Y; ROSENBERGER, B; YU, G. Architecting highly hydratable polymer networks to tune the water state for solar water purification. *Sci. Adv.* v.5, n.6, p.1-7, **2019**. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aaw5484>.
- EFE, H; BICEN, M; KAHRAMAN, M.V; KAYAMAN-APOHAN, N. Synthesis of 4-Acryloylmorpholine-based Hydrogels and Investigation of their Drug Release Behaviors. *J. Braz. Chem. Soc.* v.24, n.5, p. 814-820, **2013**. <https://www.scielo.br/j/bchs/a/HzJKLRg547K4TvyhZQnsNkj/?lang=en>.
- BANG, S; JUNG, U; NOH, I. Synthesis and Biocompatibility Characterizations of in Situ Chondroitin Sulfate-Gelatin Hydrogel for Tissue Engineering. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* v.15, p.25-35, **2018**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30603532/>.
- POELLMANN, M.J; HARRELL, P.A; KING, W.P; JOHNSON, A.J.W. Geometric microenvironment directs cell morphology on topographically patterned hydrogel substrates. *Acta Biomaterialia.* v.6, n.9, p.3514-3523, **2010**. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1742706110001765>.
- TREESUPPHARAT, W; ROJANAPANTHU, P; SIANGSANOH, C; MANUSPIYA, H; UMMARTYOTIN, S. Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems. *Biotechnology Reports.* v.15, p.84-91, **2017**. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28736723/>.
- CLAUS J, BRIETZKE A, LEHNERT C, OSCHATZ S, GRABOW N, KRAGL U. Swelling characteristics and biocompatibility of ionic liquid based hydrogels for biomedical applications. *PLoS One.*

v.15, n.4, 2020. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0231421>.

21. ZHAO, Y; SUN, Z. Effects of gelatin-polyphenol and gelatin–genipin cross-linking on the structure of gelatin hydrogels. *Int J Food Prop.* v.20, n.S3, p.S2822–S2832, 2017. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2017.1381111#:~:text=Scanning%20electron%20microscopy%20showed%20that,thermal%20stability%20than%20gelatin%E2%80%93genipin>.
22. XING, Q; YATES, K; VOGT, C; QIAN, Z; FROST, M.C; ZHAO, F. Increasing Mechanical Strength of Gelatin Hydrogels by Divalent Metal Ion Removal. *Sci. Rep.*v.4, n.4706, p. 1-10, 2014. <https://www.nature.com/articles/srep04706>.
23. YACOB, N; HASHIM, K. Morphological Effect on Swelling Behaviour of Hydrogel. *AIP Conference Proceedings* . v.1584, n.153, p.1-8, 2014. <https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.4866123>.
24. NOH, I; KIM, N; TRAN, H.N; LEE, J; LEE, C.3D printable hyaluronic acid-based hydrogel for its potential application as a bioink in tissue engineering. *Biomater Res.* v.23, n.3, p.1-9, 2019 <https://biomaterialsres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40824-018-0152-8>.
25. MAITRA, J; SHUKLA, V. K. Cross-linking in Hydrogels - A Review. *American Journal of Polymer Science.* v.4, n.2, p.25-31, 2014. https://www.researchgate.net/publication/303025587_Cross-linking_in_hydrogels__a_review
26. NAGHIEH, S; SARKER, M.D; SHARMA, N.K; BARHOUMI, Z; CHEN, X. Printability of 3D Printed Hydrogel Scaffolds: Influence of Hydrogel Composition and Printing Parameters. *Appl. Sci.* v.10, n.292, p.1-18, 2020. <https://www.mdpi.com/20763417/10/1/292/htm>.
27. MOUSAVI, S; KHOSHFETRAT, A. B; KHATAMI, N; AHMADIAN, M; RAHBARGHAZI, R. Comparative study of collagen and gelatin in chitosan-based hydrogels for effective wound dressing: Physical properties and fibroblastic cellbehavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*v.518, p.625-631, 2019. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X19316250>.

Jéssica A. R. Ambrosio*, **Bruna C. dos S. Pinto**, **Vitor L. M. Marmo**, **Andreza R. Simioni**

Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Av. Shishima Hifumi, nº2911, CEP 12244000, Brasil.

*E-mail:jessicaacdc.ja@gmail.com