

## Desenvolvimento e avaliação da estabilidade *in vitro* de plataformas poliméricas tridimensionais para a liberação de nanoestruturas

**Palavras-Chave:** hidrogel de quitosana; biomaterial; estabilidade *in vitro*; degradação hidrolítica; liberação controlada de fármacos.

Mariana Akemi Noronha<sup>1</sup>; Priscila Gava Mazzola (orientadora)<sup>1</sup>; André Moreni Lopes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual de Campinas (FCF/UNICAMP).

### INTRODUÇÃO

A pele tem uma função crucial como barreira contra fatores externos. Também mantém o equilíbrio água-eletrólito e protege contra infecções e micro-organismos. Feridas e queimaduras danificam a integridade da pele e a tornam suscetível a fatores prejudiciais. O pH da área ferida tende a se alterar de ácido para alcalino, logo, micro-organismos invadem e proliferam rapidamente o local em razão deste efeito. Para evitar essas complicações indesejadas, o tratamento necessário deve ser aplicado. A cicatrização de feridas é um processo biológico regular que inclui fatores de crescimento, enzimas e diferentes tipos celulares, tais como: queratinócitos; fibroblastos e células endoteliais (GAINZA et al., 2015). Esse processo também consiste em homeostase, inflamação, proliferação celular, produção de matriz extracelular e, conseqüentemente, o fechamento da ferida (DREIFKE et al., 2015). Nesse sentido, é crucial pesquisar e desenvolver uma formulação apropriada em termos de facilidade de aplicação e de adesão do paciente.

Dentro destes aspectos, hidrogéis podem ser empregados em formulações farmacêuticas biologicamente ativas no processo de cicatrização e proteção da pele. Mais especificamente, hidrogéis de quitosana - HQ (*i.e.*, polissacarídeo catiônico produzido através da desacetilação da quitina) são redes poliméricas hidrofílicas tridimensionais (3-D) que absorvem de 10 até 1.000% de água em relação à sua massa seca. Essas estruturas 3-D têm demonstrado uma vantagem adicional como biomateriais, em razão de suas características de mucoadesividade (bioadesividade), biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, fácil aplicação na pele, alta permeabilidade ao O<sub>2</sub>, propriedades mecânicas adequadas, e por se assemelharem aos tecidos fisiológicos (FENG et al., 2021). Além disso, devido ao caráter policatiônico e presença de grupos aminoprímarios em sua estrutura, os HQ são potencialmente interessantes para a incorporação de nanoestruturas (BHATTARAI et al., 2010) e liberação de fármacos (CHOI et al., 2012). Essa estrutura pode melhorar a permeação de fármacos por via tópica, devido

à interação das cargas positivas com a membrana celular epitelial, o que resulta em uma reorganização estrutural da queratina no estrato córneo (HE et al., 2008) e permite o transporte paracelular de compostos hidrofílicos (SHIN et al., 2012) e de fármacos (HAMMAN, 2010).

Neste trabalho, nosso grupo de pesquisa estudou o desenvolvimento e obtenção de HQ, avaliando sua estabilidade *in vitro* (i.e., degradação hidrolítica, razão de absorção e perda de massa) ao longo do tempo.

## METODOLOGIA

### Obtenção dos hidrogéis de quitosana

A obtenção dos HQ foi adaptada conforme metodologia descrita por Ruel-Gariépy et al. (2004). Resumidamente, uma solução de quitosana foi preparada em H<sub>2</sub>O deionizada, em paralelo, foi preparada uma solução com β-glicerofosfato (β-GF) também em H<sub>2</sub>O deionizada. As duas soluções foram resfriadas em geladeira (~8°C), durante 20 min. A solução de β-GF foi adicionada gota a gota à solução de quitosana sob agitação (~25 rpm) durante 15 min. Para a obtenção da estrutura 3-D, a “pasta” obtida foi gelificada na presença de sacarose (com diâmetro de ~50 μm), na proporção de hidrogel/sacarose = 15/85 (m/m). Em seguida, o hidrogel formado foi estocado em moldes de Teflon (diâmetro: 10 mm e altura: 2 mm). Posteriormente, os hidrogéis foram lavados 5x com H<sub>2</sub>O deionizada e 3x com 10 mM de tampão PBS (pH 7,4) estéril.

### Estudos de estabilidade *in vitro*

Os HQ foram estocados em microtubos com 1 mL de tampão PBS (10 mM, pH 7,4); os microtubos foram incubados à 37°C. Em períodos de tempo previamente estabelecidos (1, 15, 30 e 60 d), amostras foram coletadas e colocadas em contato com papel Kimwipes® macio (Kimberly Clark, Fullerton, CA), para remoção de líquido superficial e quantificação da massa úmida ( $m_{\text{PBS}}$ ). Em seguida, a mesma amostra foi seca à 25°C (*overnight*) e, então, a massa seca ( $m_{\text{seca}}$ ) determinada e comparada com a massa seca inicial, isto é, antes do contato com tampão ( $m_{\text{inicial}}$ ). A razão de absorção ou intumescimento ( $RA$ ) de água e perda de massa ( $PM$ ) dos HQ foram calculadas de acordo com as Equações 1 e 2:

$$RA = \left( \frac{m_{\text{PBS}} - m_{\text{seca}}}{m_{\text{inicial}}} \right) \quad (1)$$

$$PM (\%) = \left( \frac{m_{\text{seca}}}{m_{\text{inicial}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

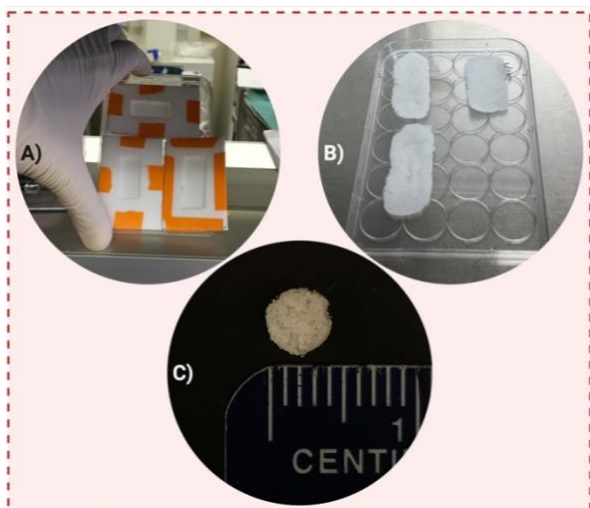
Para os estudos de degradação hidrolítica, diferentes imagens dos HQ foram tomadas em diferentes períodos de tempo (1, 15, 30 e 60 d) em tampão PBS (10 mM, pH 7,4) por microscopia de campo claro e campo escuro (EVOS FL Imaging System).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A taxa de degradação de biomateriais derivados de alginato e quitosana é considerado um fator crucial que determina a quantidade e qualidade da formação de tecido quando empregado como matrizes/suportes na engenharia de tecidos após lesão *in vivo* (ERICKSON et al., 2020). Por isso, nesta primeira etapa do projeto, estudamos a estabilidade *in vitro* dos HQ. Os

estudos de estabilidade dos HQ, aqui apresentados, englobaram: degradação hidrolítica; razão de absorção de água e porcentagem da perda de massa.

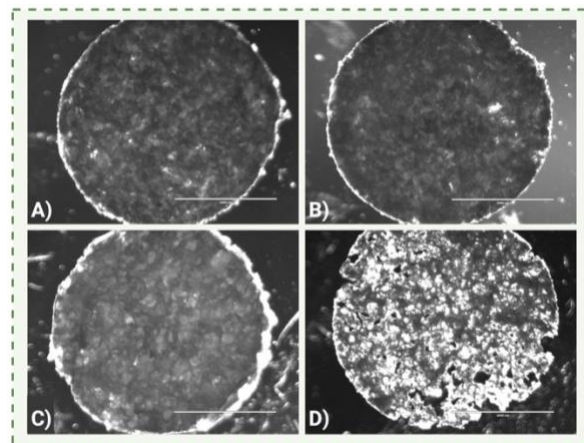
Os moldes empregados no preparo dos HQ, assim como os próprios HQ produzidos podem ser observados, conforme as Figuras 1A e 1B, respectivamente. Em seguida, as matrizes de HQ foram cortadas com um molde metálico estéril em pequenos discos cilíndricos de 4 mm de diâmetro, conforme destacado na Figura 1C.



**Figura 1.** Moldes para obtenção dos hidrogéis de quitosana (HQ) com espessura de 1 mm (A), matrizes brutas dos HQ obtidos a partir dos moldes de Teflon (B) amostras de HQ previamente cortadas com 4 mm de diâmetro (C).

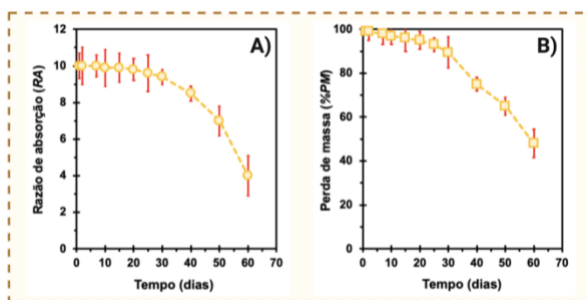
Para auxiliar na visualização do processo de degradação, as amostras foram analisadas por meio de imagens de microscopia de campo escuro e claro, conforme Figura 2. Com relação às imagens entre os dias 1, 15 e 30 d, em termos gerais, não foi observada uma alteração significativa na estrutura dos HQ com base nas microscopias obtidas (Fig. 2A, 2B e 2C, respectivamente).

Por outro lado, uma degradação significativa foi observada, principalmente, a partir de 60 d de armazenamento, como pode ser observado através do aparecimento de regiões mais claras no interior e na periferia das amostras (Fig. 2D). Essas regiões correspondem às regiões onde a matriz do polímero não está mais presente.



**Figura 2.** Degradação *in vitro* dos hidrogéis de quitosana (HQ) em diferentes períodos de tempo armazenados em 10 mM de tampão PBS (pH 7,4). Os períodos de tempo avaliados foram 1 (A), 15 (B), 30 (C) e 60 dias (D). Os HQ foram analisados por microscopia de campo escuro e claro, com barras de escala = 2000  $\mu$ m e objetiva = 2 $\times$ .

Os HQ também foram analisados em termos de razão de absorção de água (RA) em função do tempo (1, 2, 7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 d), conforme Figura 3A. Durante os primeiros 30 d de hidratação em tampão PBS, os HQ absorveram água cerca de 10 vezes em relação à sua massa inicial, estes valores permaneceram constantes (RA entre 9,4 e 10) no período destacado. Para os demais períodos de tempo analisados, é possível observar uma diminuição significativa de RA, principalmente, a partir do 40º d (RA = 8,5), essa queda se intensificou com 50 e 60 d, com valores de RA de 7 e 4, respectivamente.



**Figura 3.** Razão de absorção (*RA*) de água (10 mM de tampão PBS, pH 7,4), dos hidrogéis de quitosana (HQ) em diferentes períodos de tempo (A). Porcentagem de perda de massa (*PM*) dos HQ em diferentes períodos de tempo (B). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% dos valores obtidos.

A diminuição nos valores de *RA* pode ser atribuída à perda de massa (*PM*) das amostras de HQ (Figura 3B). A porcentagem de *PM* dos HQ mostrou uma pequena tendência de queda, no entanto, sem diferença estatística significativa entre os valores obtidos até o 30º d (valores entre 89,5 e 99%). Após o 30º d, mais precisamente, nos dias 40, 50 e 60 foi possível observar uma *PM* significativa, com valores de 25, 35 e 52%, respectivamente. Por isso, o processo de degradação a partir do 30º d, parece refletir não apenas nos valores de *PM* dos HQ, mas também na diminuição dos valores de *RA*. Em outras palavras, a perda de massa não apenas reforça os dados obtidos com a absorção de água dos HQ, mas também pode refletir em importantes informações sobre sua aplicação como plataformas 3-D inteligentes para a liberação controlada e sustentada de fármacos.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os HQ apresentaram boa capacidade de absorção de água (10x sua massa), boa estabilidade e baixa degradação hidrolítica nas condições avaliadas (*i.e.*, até 30 d à

37°C). Por isso, seu desenvolvimento e compreensão do seu comportamento *in vitro* se tornam primordiais para as próximas etapas da proposta de pesquisa. Dentro do escopo central do projeto, os HQ deverão ser avaliados como potenciais plataformas 3-D (*patches*) para a liberação de micelas poliméricas contendo curcumina, por exemplo, para uso tópico.

## Referências

- GAINZA, Garazi; VILLULLAS, Silvia; PEDRAZ, José Luis; HERNANDEZ, Rosa Maria; IGARTUA, Manoli. Advances in drug delivery systems (DDSs) to release growth factors for wound healing and skin regeneration. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 6, p. 1551-1573, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.03.002>.
- DREIFKE, Michael B.; JAYASURIYA, Amil A.; JAYASURIYA, Ambalangodage C. Current wound healing procedures and potential care. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 651-662, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.12.068>.
- FENG, Peipei; LUO, Yang; KE, Chunhai; QIU, Haofeng; WANG, Wei; ZHU, Yabin; HOU, Ruixia; XU, Long; WU, Songze. Chitosan-based functional materials for skin wound repair: mechanisms and applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 9:650598, 2021. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.650598>.
- BHATTARAI, Narayan; GUNN, Jonathan; ZHANG, Miqin. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>.
- CHOI, Won Il; LEE, Jong Hyun; KIM, Ja-Young; KIM, Jin-Chul; KIM, Young Ha; TAE, Giyoong. Efficient skin permeation of soluble proteins via flexible and functional nano-carrier. **Journal Of Controlled Release**, v. 157, n. 2, p. 272-278, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.013>.
- HE, Wen; GUO, Xianxi; ZHANG, Mian. Transdermal permeation enhancement of N-trimethyl chitosan for testosterone. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1-2, p. 82-87, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.12.050>.
- SHIN, Jinseob; SHIN, Kyomin; LEE, Hanna; SUH, Kyung-Do; KIM, Hyojung; KIM, Jin Woong. Enhanced transdermal delivery by using

electrostatically interactive chitosan nanocapsules. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 6, p. 553-559, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-011-2580-z>.

HAMMAN, Josias H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1305-1322, 2010. <http://dx.doi.org/10.3390/md8041305>.

RUEL-GARIÉPY, Eve; SHIVE, Matthew; BICHARA, Ali; BERRADA, Mohammed; GARREC, Dorothée Le; CHENITE, Abdellatif; LEROUX, Jean-Christophe. A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 53-63, 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00095-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00095-x).

ERICKSON, Christopher B.; NEWSOM, Jake P.; FLETCHER, Nathan A.; FEUER, Zachary M.; YU, Yangyi; RODRIGUEZ-FONTAN, Francisco; MILLER, Nancy Hadley; KREBS, Melissa D.; PAYNE, Karin A. *In vivo* degradation rate of alginate–chitosan hydrogels influences tissue repair following physeal injury. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 108, n. 6, p. 2484-2494, 2020. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.34580>.

## Agradecimentos

PIBIC/CNPq (#1234183/2020-4) e FAPESP (#2017/10789-1 e #2018/10799-0).