

## Efeitos do grau de reticulação com genipina em hidrogéis à base de quitosana para possível uso como biomaterial

G. Dias<sup>1\*</sup>; S. B. F. Santos<sup>2</sup>; E. Leal<sup>1</sup>; A. C. F. M. Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Aprígio Veloso, 882, Bodocongó, Campina Grande – PB, CEP 58429-900

<sup>2</sup>Graduação em Engenharia Química, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Av. Aprígio Veloso, 882 - Bodocongó, Campina Grande – PB, 58429-900.

\*gd.dias@yahoo.com.br

(Recebido em 25/03/2020; revisado em 22/04/2020; aceito em 06/08/2020)  
(Todas as informações contidas neste artigo são de responsabilidade dos autores)

### Resumo:

Os hidrogéis poliméricos apresentam propriedades que proporcionam alto desempenho em sistemas carreadores, no entanto, o conhecimento quanto ao efeito causado pelo grau de reticulação e a interação entre as matérias-primas para formação da rede polimérica ainda é limitado. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar hidrogéis à base de quitosana reticulados com diferentes teores de genipina para efeito de comparação. Os hidrogéis foram preparados através da dissolução da quitosana em ácido láctico (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica de 1,5% m/v, seguida da incorporação do agente reticulante genipina em três composições distintas: S1G, S2G, S3G com 0,08%, 0,06% e 0,012% m/v, respectivamente. Para a solubilização das soluções foi utilizado o agitador magnético, as quais foram submetidas a 12 horas de agitação. As matérias-primas e os hidrogéis foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX) e Análise Termogravimétrica (TG). Com base nos resultados foi possível observar que os espectros de FTIR apresentaram as bandas características dos materiais estudados e a interação da molécula de genipina com os grupamentos hidroxila e amina da quitosana. Os espectros de DRX confirmaram a formação das fases semicristalinas da quitosana e cristalinas da genipina e que a incorporação do reticulante na solução de quitosana possibilitou a redução da cristalinidade do hidrogel. Os dados das análises termogravimétricas revelaram comportamentos térmicos característicos dos materiais estudados, cujos eventos são característicos de alterações mássicas do material após submetidos ao tratamento térmico. Diante do exposto conclui-se que os hidrogéis (S1G, S2G, S3G), apresentam um comportamento térmico e interações químicas similares, não apresentando diferença significativa quanto à diferença de concentração da genipina adicionada à solução de quitosana.

**Palavras-chave:** Quitosana, genipina, hidrogel

### Abstract:

Polymeric hydrogels have properties that provide high performance in carrier systems, however, the knowledge about the effect caused by the degree of crosslinking and the interaction between the raw materials for forming the network is still limited. Thus, the present work aimed to synthesize crosslinked chitosan-based hydrogels with different levels of genipin for comparison purposes. The hydrogels were prepared by dissolving chitosan in lactic acid (1% v/v), for a final concentration of the polymeric solution (1.5% w/v), followed by the incorporation of the crosslinking agent genipin in three different compositions: S1G, S2G, S3G with 0.08%, 0.06% and 0.012% w/v, respectively. For the solubilization of the solutions, a magnetic stirrer was used, which was subjected to 12 hours of stirring. The raw materials and hydrogels were characterized by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (DRX) and Thermogravimetric Analysis (TG). Based on the results, it was possible to observe that the FTIR spectra showed the characteristic bands of the studied materials and the interaction of the genipin molecule with the chitosan hydroxyl and amine groups. The XRD spectra confirmed the formation of the semi-crystalline chitosan and crystalline phases of the genipin and that the incorporation of the crosslinker in the chitosan solution enabled the reduction of the crystallinity of the hydrogel. The data from the thermogravimetric analyzes revealed thermal behaviors characteristic of the studied materials, whose events are characteristic of mass changes in the material after undergoing heat treatment. In view of the above, it is concluded that hydrogels (S1G, S2G, S3G), have similar thermal behavior and chemical interactions, with no significant difference in terms of the difference in concentration of genipin added to the chitosan solution.

**Keywords:** Chitosan, genipin, hydrogel

## 1. Introdução

Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos de origem natural ou sintética que podem ser produzidos a partir de uma reação envolvendo um ou mais monômeros, classificados como homopolímero ou copolímero, respectivamente, interligados por ligações covalentes ou interações físicas, processo comumente denominado de reticulação, no qual esses entrelaçamentos afetam o grau de insolubilidade do mesmo, pelo fato das reações químicas existentes [1].

Tendo como base o tipo de reticulação, os hidrogéis podem ser classificados em duas categorias: físicos e químicos [1, 2]. A estabilidade entre as cadeias do polímero alcançada pelo processo de reticulação é altamente necessária para atingir as propriedades desejadas, por exemplo, em sistemas carreadores de fármacos. Os agentes reticulantes são os responsáveis por estas interações químicas ou físicas.

A reticulação consiste na estabilidade entre as cadeias da rede polimérica para formação dos hidrogéis a fim de melhorar suas propriedades mecânicas e obter um material com potencial aplicação na liberação controlada de fármacos.

A reticulação química de hidrogéis envolve a utilização de agentes reticulantes como glutaraldeído, formaldeído ou compostos epóxi, mas devido ao fato de apresentarem citotoxicidade, outras alternativas menos danosas vêm sendo utilizadas como a genipina, por exemplo [3, 4], que é obtida a partir do seu composto geniposide, via hidrólise enzimática com  $\beta$ -glucosidase.

O geniposide é isolado dos frutos da *Genipa americana* e da *Gardenia jasminoides* J. Ellise, o qual constitui cerca de 4-6% de frutos secos [5].

A genipina americana é encontrada na América tropical, do México e do Caribe à Argentina. Já as *Gardenias jasminoides* são cultivadas no Extremo Oriente e seus frutos são usados há muito tempo na medicina chinesa por apresentarem propriedades diuréticas e anti-inflamatórias [5, 6].

Novos estudos têm sido desenvolvidos aplicando biopolímeros reticulados com genipina para o desenvolvimento de hidrogéis para serem utilizados em sistemas carreadores de fármacos [1].

E dentre o grupo dos polissacarídeos, a quitosana tem sido bastante estudada por conta de variedades de composições, características físico-químicas, o que permite maiores possibilidades de adequação em termos de propriedades a cada aplicação específica, a sua biocompatibilidade [7], por serem biologicamente ativos [8], apresentarem atividade antibacteriana [9-11], baixo custo [1] e facilidade de processamento nas mais variadas formas, como géis [8], membranas [12], nanopartículas (NPs) [13], scaffolds [14], dentre outros.

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da quitina, é catiônico na presença de soluções diluídas de ácidos, obtido principalmente da N-desacetilação parcial da quitina, a partir dos exoesqueletos dos crustáceos,

como camarões e caranguejos, como também de algumas algas e da parede celular de certos fungos [4, 8, 15].

Tendo em vista o efeito reticulante ser um requisito importante na eficácia da estabilidade entre as cadeias do polímero para formação da rede reticulada dos hidrogéis, o estudo do efeito do grau de reticulação em um sistema à base de quitosana é de suma importância, pois possibilita um melhor entendimento quanto à influência das matérias-primas para formação da rede polimérica.

No entanto, o conhecimento quanto ao efeito causado pelo grau de reticulação na interação entre as matérias-primas na rede polimérica ainda é limitado.

Buscando melhor entender a influência do agente reticulante no sistema hidrogel, este estudo teve como objetivo, sintetizar hidrogéis à base de quitosana e avaliar o grau de reticulação para diferentes teores de genipina.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

- Quitosana 90% desacetilada (CERTIBIO);
- Genipina P.A. 98% (Sigma Aldrich®);
- Ácido láctico com pureza  $\geq 98\%$  (Sigma Aldrich®);
- Água destilada.

### 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Obtenção dos hidrogéis à base de quitosana reticulados com genipina

Para a produção do hidrogel, primeiramente três soluções bases foram preparadas por meio da dissolução do polímero em ácido láctico (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica de 1,5% m/v, sob agitação magnética (modelo Fisatom) a 840 rpm/1h, a 25 °C e, posteriormente, mantidas em repouso por 30 min. Após esse procedimento, conduziu-se a etapa de incorporação do agente reticulante genipina em três composições distintas: S1G, S2G, S3G com 0,08%, 0,06% e 0,012% m/v, respectivamente, sob agitação por 12 horas. Posteriormente, os hidrogéis foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX) e Análise Termogravimétrica (TG).

Na Tabela 1 encontra-se a codificação das amostras obtidas.

Tabela 1 – Codificação das amostras.

Codificação	Amostras
S1G	Hidrogel com 0,08% m/v de genipina
S2G	Hidrogel com 0,06% m/v de genipina
S3G	Hidrogel com 0,012% m/v de genipina

A Figura 1 ilustra o fluxograma simplificado da elaboração dos hidrogéis.

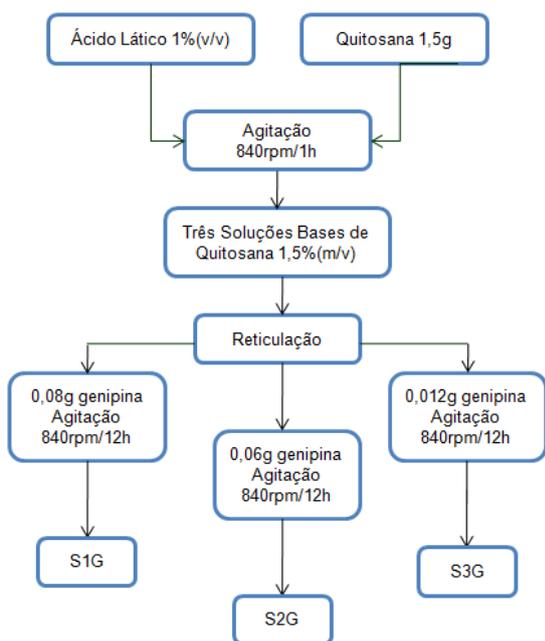


Figura 1– Fluxograma simplificado com as etapas para obtenção dos hidrogéis.

### 2.3 Caracterização

As matérias-primas e os hidrogéis foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX) e Análise Termogravimétrica (TG).

#### 2.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram submetidas à técnica de FTIR à temperatura ambiente, utilizando um equipamento modelo Vertex 70 da marca Bruker. Para identificação das bandas características dos grupos funcionais presentes nas amostras, a faixa de varredura utilizada foi de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.3.2 Difração de raios X (DRX)

A análise por DRX foi conduzida à temperatura ambiente utilizando um difratômetro de raios X, modelo D2 Phaser, marca BRUKER com radiação  $K\alpha$  do cobre (1,5418 Å), tensão de 40 kV e corrente de 30 mA. As amostras foram submetidas à análise com uma varredura em  $2\theta$  variando de 5 a 50° com incremento de 0,016°. O objetivo deste ensaio foi estudar o comportamento cristalográfico do material.

#### 2.3.3 Análise Termogravimétrica (TG)

As amostras foram submetidas à análise térmica em modelo DTG-60H, marca SHIMADZU, em atmosfera de nitrogênio com uma vazão de 50  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , razão de aquecimento de 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , da temperatura ambiente até

800  $^{\circ}\text{C}$ . Para esta finalidade utilizou-se um cadinho de alumina

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 2 encontra-se os espectros de infravermelho das matérias-primas quitosana (Qs) e genipina (Gp).

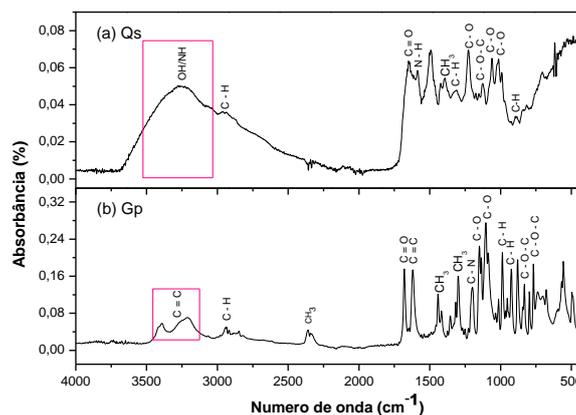


Figura 2 – Espectro de FTIR: (a) quitosana (Qs) e (b) genipina (Gp).

Pode-se observar no espectro referente à quitosana (Qs) (Figura 2 (a)) uma larga banda na faixa de 3000 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  com intensidade máxima em 3255  $\text{cm}^{-1}$ , que pode ser atribuída às vibrações de alongamento axial dos grupos OH que aparece sobreposta à banda de alongamento dos grupos N-H, assim como as ligações de hidrogênio intermoleculares das cadeias do polissacarídeo.

A banda em 1649  $\text{cm}^{-1}$  está associada à vibração de alongamento do grupo carbonilo C=O dos grupos amida (amida I), presentes nas unidades acetiladas da quitosana e a banda de absorção em torno de 1581  $\text{cm}^{-1}$  é referente à sobreposição das vibrações do grupo amida (designada por amida II) e deformação da ligação N-H das aminas primárias presentes nas unidades desacetiladas [16].

A existência das bandas C=O e N-H conjuntamente indicam a presença de grupos amidas. A banda em torno de 1150  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao alongamento assimétrico do grupo C-O-C que é característico da estrutura de polissacarídeo [17, 18]. Bandas em 1066 e 1028  $\text{cm}^{-1}$  são referentes à vibração envolvendo alongamento C-O. Na faixa de 1384 – 1308  $\text{cm}^{-1}$  ocorre uma absorção que pode ser atribuída à deformação simétrica de C-H.

As vibrações ente 1233 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento (C-O-) de álcoois. Uma banda de absorção em 900  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada à presença de C-H. Em aproximadamente 1422  $\text{cm}^{-1}$ , observa-se um evento que pode ser referente à absorção de alongamento simétrico de sais de ácido carboxílico. As bandas em torno de 2960 e 2876  $\text{cm}^{-1}$  são ocasionadas por vibrações de alongamento do grupo C-H [19]. Essas bandas

características de FTIR para a Qs foram também observadas por: DELGADILLO-ARMENDARIZ, RANGEL-VAZQUEZ [20] ao investigarem as características de absorção do fármaco glibenclamida no hidrogel quitosana/genipina; SAMI, KHALID [21] ao formularem um hidrogel à base dos biopolímeros quitosana e goma guar para estudo avaliativo da liberação controlada do analgésico Paracetamol; BAKSHI, SELVAKUMAR [22] ao realizarem um estudo comparativo da atividade antimicrobiana e a biocompatibilidade de derivados N-seletivos de quitosana.

Relacionado ao espectro de FTIR apresentado na (Figura 2 (b)) referente à genipina pode-se observar uma banda de absorção em  $1680\text{ cm}^{-1}$  atribuída à vibração de alongamento da ligação C=O nos grupos carboxílicos esterificados com o grupo metilo [16], enquanto a absorção a  $1619\text{ cm}^{-1}$  está relacionada à vibração de alongamento do aleno da ciclo-olefina  $\nu(\text{C}=\text{C})$  do núcleo da molécula de genipina.

As absorções em  $2343$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas à deformação de alongamento  $\text{CH}_3$  e vibração de alongamento do grupo C-N, respectivamente. A banda de absorção em  $1445\text{ cm}^{-1}$  corresponde à flexão da ligação  $\text{CH}_3$  e as absorções a  $1150$  e  $1104\text{ cm}^{-1}$  estão associadas à vibração de alongamento do grupo  $\nu(\text{C}-\text{O})$  no éter cíclico da estrutura. A absorção em  $2942\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao alongamento do grupo C-H. Na faixa entre  $3397 - 3211\text{ cm}^{-1}$  é atribuído ao grupo C=C. A banda de absorção entre  $997 - 925\text{ cm}^{-1}$  foi atribuída ao modo de curvatura fora do plano do anel C-H, e a absorção em  $1308\text{ cm}^{-1}$  está relacionada à flexão  $\text{CH}_3$ .

A absorção em  $771\text{ cm}^{-1}$  está relacionada ao modo de curvatura do C-O-C fora do plano. A atribuição das bandas características do espectro de FTIR para a Gp foram também observadas por DIMIDA, BARCA [18] quando produziram *scaffolds* para regeneração e reparo ósseo de quitosana reticulada com diferentes concentrações de genipina para avaliação de propriedades físicas, químicas e biológicas.

Na Figura 3 encontra-se os espectros de infravermelho dos hidrogéis: S1G, S2G e S3G.

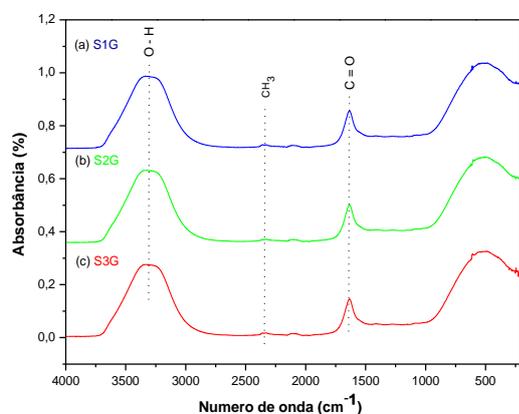


Figura 3 - Espectro de FTIR dos hidrogéis: (a) hidrogel com 0,08% de genipina (S1G); (b) hidrogel com 0,06% de genipina (S2G); e (c) hidrogel com 0,012% de genipina (S3G).

É possível observar no espectro de FTIR (Figura 3 (a), (b) e (c)) os hidrogéis à base de quitosana (S1G, S2G, S3G) com as diferentes concentrações de genipina (Gp) entre 0,08%, 0,06% e 0,012% (m/v), respectivamente, que não houve distinção significativa entre as curvas de FTIR.

Porém, importantes alterações após o processo de reticulação advindas de reações entre a quitosana (Qs) (Figura 2 (a)) e o agente reticulante (Gp) (Figura 2 (b)), respectivamente, podem ser observadas quando comparadas com os espectros de FTIR dos hidrogéis (Figura 3 (a), (b) e (c)). Pode-se observar nos hidrogéis S1G, S2G e S3G, o crescimento e desvios das bandas correspondentes à vibração de alongamento do grupo carbonil (C=O) dos grupos amidas (amida I), presentes nas unidades acetiladas da quitosana, em  $1649\text{ cm}^{-1}$  que passou para  $1634\text{ cm}^{-1}$ .

A absorção em  $1634\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao alongamento do anel C=O [16] sugere que o grupo carbonil da genipina reagiu com o grupo amina primária da quitosana para formar uma amida secundária caracterizando uma coloração azulada de acordo com a literatura [4, 6, 16, 18]. A intensidade da banda de absorção em torno de  $3600 - 3000\text{ cm}^{-1}$  para os grupos amina da quitosana é aumentada no espectro do hidrogel. Na faixa de absorção entre  $3600 - 3000\text{ cm}^{-1}$  ocorre o surgimento de uma banda atribuída ao grupo O-H.

A banda de absorção em torno de  $1581\text{ cm}^{-1}$  que é referente à sobreposição das vibrações do grupo amida (designada por amida II) devido à protonação pela ação do ácido [16], que está presente no espectro da quitosana (Qs) (Figura 2 (a)) diminuiu nos espectros dos hidrogéis (Figura 3 (a), (b) e (c)), o que pode estar associado à reação dos grupos amina da quitosana com a molécula da genipina. Já a vibração de deformação da ligação N-H das aminas primárias presentes nas unidades desacetiladas da quitosana não aparece nos espectros dos hidrogéis reações que confirmam a existência de interações entre a quitosana e o agente reticulante com o processo de formação da rede reticulada dos hidrogéis [5].

A absorção em  $2343\text{ cm}^{-1}$  atribuída à deformação de alongamento  $\text{CH}_3$  observada no espectro da genipina também pode ser observado nos hidrogéis quitosana/genipina.

Essas mesmas observações foram obtidas por DIMIDA, DEMITRI [6] que sintetizaram um hidrogel à base de quitosana reticulada com a genipina para estudo da cinética de reação em diferentes condições térmicas e diferentes concentrações do agente reticulante sem utilização de outros solventes para dissolver o mesmo, e também avaliaram características relacionadas à estrutura do hidrogel. MI, SUNG [4] sintetizaram uma nova rede baseada em quitosana reticulada como agente genipina para investigarem o mecanismo de reação que ocorre no processo de formação da rede reticulada entre a quitosana e a genipina.

### 3.2 Difração de raios X (DRX)

A Figura 4 ((a) e (b)) ilustra os espectros de difração de raios X da quitosana (Qs) e genipina (Gp), respectivamente.

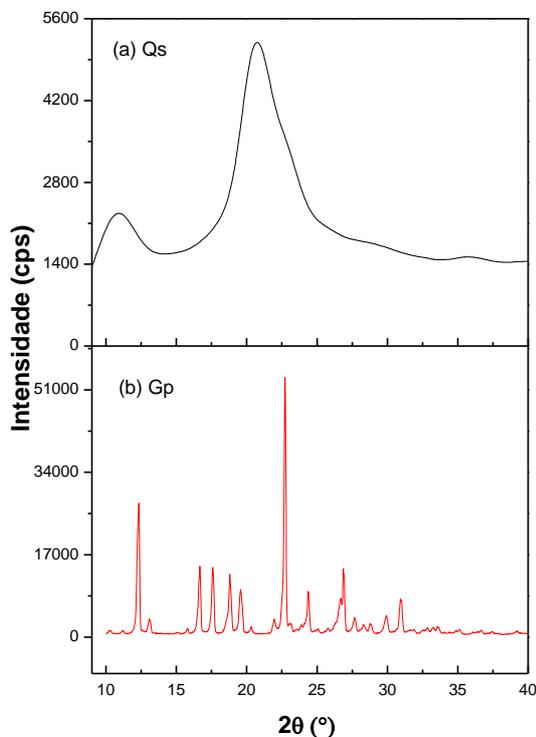


Figura 4 – Espectro de difração de raios X: (a) quitosana (Qs) e (b) genipina (Gp).

A partir do espectro de difração da quitosana (Figura 4 (a)) pode-se observar dois picos cristalinos, um em  $2\theta = 10,7^\circ$  menos intenso e com aspecto mais largo, e o outro em  $2\theta = 20,6^\circ$  caracterizado com uma maior intensidade.

De acordo com essas características podemos dizer que a quitosana é considerada um material semicristalino.

Segundo SAITA, NAGAOKA [23]; HUANG, LIU [24]; BAKSHI, SELVAKUMAR [22] e FAN, QIN [16], a cristalinidade observada na quitosana é explicada pelo fato de sua estrutura molecular apresentar certa regularidade e também a presença dos grupos  $-NH_2$  e  $OH$  que conferem fortes ligações de hidrogênio intermolecular e intramolecular, o que acaba acarretando mais estabilidade e ordenação na estrutura da cadeia polimérica, e como resultado a presença de regiões cristalinas na estrutura molecular da quitosana.

Estes mesmos picos e características também foram observados nos difratogramas obtidos por FAN, QIN [16] ao realizarem a síntese de derivados de quitosana a partir da enxertia de grupos poliaminoetila e dietoxifosforila como estratégia de melhorar o potencial de protonação e com isso aumentar a atividade antifúngica da quitosana, e por LI, SHAN [25] ao sintetizarem um complexo de

quitosana reticulada com glutaraldeído com o intuito de avaliar a atividade antibacteriana contra o *Complexo Burkholderia cepacia* (Bcc).

Na Figura 4 (b) encontra-se o difratograma de raios X do agente reticulante genipina, e podem-se observar picos mais intensos que representam uma maior cristalinidade.

Pouco é falado na literatura a respeito da caracterização estrutural por DRX da genipina, mas essas mesmas características foram observadas por ZENG, YE [26] ao sintetizarem microesferas de fibroína de seda (SF) com quitosana (CS) utilizando diferentes concentrações do agente reticulante genipina e realizando um estudo comparativo com microesferas de quitosana pura, quanto à eficiência de encapsulação e taxa de liberação controlada, e análise das propriedades físicas e químicas das microesferas.

LUO, PENG [27] ao prepararem microesferas de quitosana (CsMs) pelo método de reticulação de emulsão com uso da genipina (Gp) para estudos *in vitro* da liberação controlada de salidroside (SAL) e ZHANG, MENG [28] ao realizarem uma investigação comparativa quanto à absorção intestinal do complexo de inclusão genipina/hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) com o da genipina também observaram os mesmos picos característicos na difração de raios X da genipina.

A Tabela 2 a seguir apresenta os valores para o tamanho médio de cristalito e a cristalinidade determinados a partir dos dados de DRX (Figura 4) para as matérias-primas quitosana e genipina.

Tabela 2– Resultados do tamanho médio de cristalito e da cristalinidade determinados por DRX para as matérias-primas quitosana (Qs) e genipina (Gp) (Figura 4 (a) e (b)), respectivamente.

Matérias-Primas	Tamanho Médio de Cristalito (nm)	Cristalinidade (%)
Qs	2,87	33,7
Gp	67,36	85,8

De acordo com os dados da Tabela 2, observa-se que a quitosana (Qs) apresenta um valor de cristalinidade de 33,7%, cujo valor está de concordância com os espectros de DRX da Qs (Figura 4 (a)), representando uma menor cristalinidade. Com relação à Gp observa-se um valor de cristalinidade de 85,8%, cujo dado está coerente com o espectro de difração da (Figura 4 (b)), onde observa-se picos mais intensos, caracterizando um material de elevada cristalinidade.

A Figura 5 apresenta os espectros de difração de raios X dos hidrogéis (S1G, S2G, S3G).

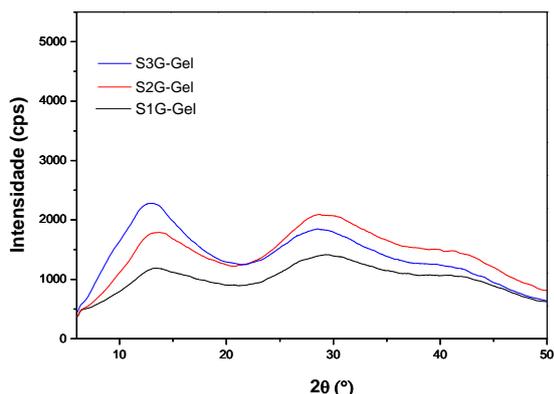


Figura 5 - Espectro de difração de raios X dos hidrogéis (S1G, S2G, S3G).

A partir do espectro de difração dos hidrogéis (Figura 5) pode-se observar dois picos cristalinos: um em  $2\theta = 12,7^\circ$ , mais intenso para S2G e menos intenso para S1G e com aspecto mais intenso quando comparado ao segundo pico em  $2\theta = 28,6^\circ$ , que nesse caso o S2G apresenta maior intensidade e S1G menor intensidade.

Após o processo de reticulação, importantes alterações, possivelmente advindas de interações entre a quitosana (Qs) (Figura 4 (a)) e o agente reticulante (Gp) (Figura 4 (b)), podem ser observadas quando comparadas com os espectros de DRX dos hidrogéis (Figura 5). O desvio dos picos e suas intensidades observadas nos espectros de DRX dos hidrogéis quando comparados aos espectros das matérias-primas (Figura 4 (a) e (b)).

A confirmação da reticulação dos hidrogéis pelos espectros de DRX a partir de interações entre a Qs e Gp também foram observadas por YU, FENG [29] ao produzirem um hidrogel (GP-CMCS/F127) duplo de pH e termossensível, composto de carboximetil quitosano (CMCS) e poloxamer 407 (F127) reticulado com o agente reticulante genipina (Gp) tendo como medicamento modelo para distribuição um anti-inflamatório oftálmico, baicalina (BN).

Observa-se também que quanto maior o teor de genipina mais características amorfas apresentam os espectros dos hidrogéis. O hidrogel S1G com maior teor de genipina (0,08%) apresenta características bem amorfas que os hidrogéis S2G e S3G, esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que o agente reticulador inibe o empacotamento/regularidade próximo das cadeias poliméricas, fazendo com que haja redução quanto ao grau de liberdade na conformação tridimensional, o que acaba dificultando e limitando a formação de regiões cristalinas [29, 30]. Os autores COSTA-JÚNIOR, BARBOSA-STANCIOLI [30] mencionam que uma menor cristalinidade pode vir a influenciar questões de degradabilidade, absorção de água e consequentemente no intumescimento da mistura/amostra.

### 3.3 Análise Termogravimétrica (TG)

Na Figura 6 encontra-se a análise termogravimétrica (TGA) das matérias-primas: quitosana (Qs) e genipina (Gp).

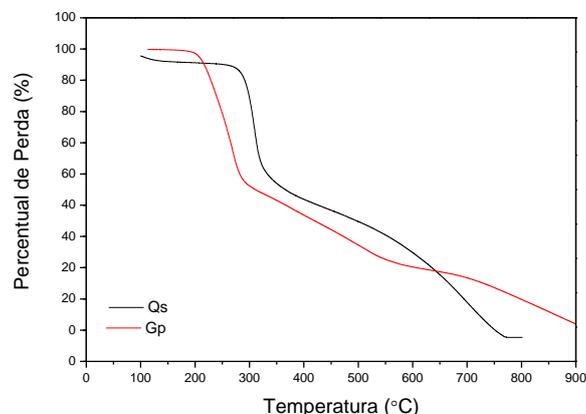


Figura 6 – Análises Termogravimétricas das matérias-primas: quitosana (Qs) e genipina (Gp).

Pode-se observar na curva TG referente à quitosana (Qs) que a amostra apresenta dois eventos principais de decomposição. O primeiro evento ocorre na faixa de 30 a 152°, apresentando uma perda de massa de 13%, já o segundo evento ocorre na faixa de 239 a 384°C e apresenta uma perda de massa de aproximadamente 50%. O primeiro evento presente em Qs é atribuído à evaporação da água [31], e a decomposição no segundo evento pode ser atribuída à desidratação complexa dos anéis de sacarídeos, despolimerização e decomposição pirolítica da estrutura do polissacarídeo [32-34]. Essas observações estão compatíveis com a literatura [31, 32, 35].

Com relação à análise termogravimétrica referente à genipina (Gp) pode-se observar a ocorrência de um evento principal de decomposição que ocorre em uma faixa de 152 a 272° com 44% de perda de massa. Essa etapa de decomposição está relacionada à desidratação do polímero [36].

Essas mesmas características termográficas também foram observadas por MEENA, PRASAD [37] ao prepararem um hidrogel de kappa-carragenina com utilização do agente reticulador genipina e por ZHAO, SONG [38] quando utilizaram a técnica de precipitação com o anti-solvente n-hexano para produção de pó micromizado de genipina.

A Figura 7 apresenta os dados da análise termogravimétrica TGA dos hidrogéis: hidrogel com 0,08% de genipina (S1G); hidrogel com 0,06% de genipina (S2G) e hidrogel com 0,01% de genipina (S3G).

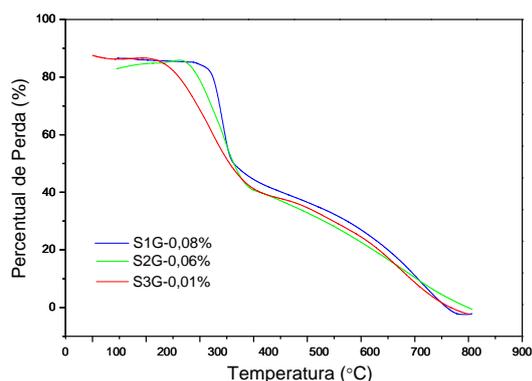


Figura 7– Análises Termogravimétricas dos hidrogéis: hidrogel com 0,08% de genipina (S1G); hidrogel com 0,06% de genipina (S2G); e hidrogel com 0,012% de genipina (S3G).

É possível observar a partir das curvas TG (Figura 7) um comportamento térmico muito similar entre os hidrogéis, sem grandes diferenças significativas. Todas as amostras de hidrogéis (S1G, S2G e S3G) apresentaram apenas um único evento de degradação que está em torno de 270 a 383 °C, 214 a 389°C e 276 a 404°C respectivamente.

É possível observar que o primeiro evento existente de degradação presente na curva TG da quitosana (Figura 6) que é referente à evaporação de água [31] não aparece nas amostras dos hidrogéis (Figura 7), o que pode estar relacionado ao efeito da reticulação com o agente reticulante genipina.

Pode-se também observar que as amostras dos hidrogéis, S1G, S2G e S3G, apresentam um maior valor de perda de massa com 55%, 53% e 51%, respectivamente, nessa região quando comparado à quitosana (Figura 6), o que pode estar associado ao menor caráter hidrofílico da quitosana quando comparado as amostras S1G, S2G e S3G. Indicando assim uma menor estabilidade térmica quando comparada à quitosana.

Tais observações foram também feitas por KLEIN, HACKENHAAR [33] ao prepararem um suporte de quitosana reticulado com o agente reticulante genipina, com compatibilidade alimentar, para imobilização da enzima  $\beta$ -d-galactosidase para aplicações alimentares.

Esses altos valores de perda de massa nesses intervalos de temperaturas podem ser atribuídos a um possível enfraquecimento de parte da estrutura da quitosana causada pela reticulação com genipina [33]. É importante observar que a maior perda de massa e menor estabilidade térmica para as amostras S1G, S2G e S3G quando comparada à quitosana confirma a reticulação.

Esse fenômeno de menor estabilidade térmica com maior perda de massa, observado após o processo de reticulação, também foi observado por FLORES, CARDOSO [36] ao prepararem esferas de quitosana reticuladas com genipina para estudo da influência de variáveis que ocorrem entre a reação como, pH e temperatura, possam vir a afetar a utilização do suporte

para imobilização da enzima  $\beta$ -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e SINGH, MEDRONHO [39] ao desenvolverem micro e macro partículas híbridas de carboximetilcelulose-quitosana (CMC-Cht) reticuladas com genipina para encapsulamento do probiótico modelo *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG).

#### 4. Conclusões

Com base nos resultados foi possível observar que os espectros de FTIR apresentaram as bandas características dos materiais estudados e interação da molécula de genipina com os grupamentos hidroxilas e amina da quitosana.

Os espectros de DRX confirmaram a formação das fases semi-cristalinas da quitosana e cristalinas da genipina, onde concluímos que a incorporação do reticulante na solução de quitosana possibilitou a redução da cristalinidade do hidrogel.

Por meio dos resultados obtidos nas análises termogravimétricas, foi possível observar comportamentos térmicos característicos dos materiais estudados, com o surgimento de eventos que são característicos de alterações mássicas do material diante exposição à temperatura.

Portanto, conclui-se que os hidrogéis (S1G, S2G, S3G), apresentam um comportamento térmico e interações químicas similares independentemente da concentração da genipina adicionada à solução de quitosana, bem como o processo de reticulação envolvendo reações características entre a genipina e a quitosana puderam ser confirmadas a partir das mudanças significativas observadas nos espectros e termogramas dos hidrogéis quando comparadas as das matérias-primas.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao FAPESP/CAPES pelo apoio financeiro e aos Laboratórios de Engenharia Bioquímica (LEB), da Unidade Acadêmica de Engenharia Química (UAEQ/UFCG); de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) e ao Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO) da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais (UAEMa/UFCG) e a Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

#### Referências

- [1] Pellá, M. G., Lima-Tenório, M. K., Tenório-Neto, E. T., Guilherme, M. R., Muniz, E. C., Rubira, A. F. Chitosan-based hydrogels: from preparation to biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 196, 233-45, 2018.
- [2] Peppas, N., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 27-46, 2000.
- [3] Akao, T., Kobashi, K., Aburada, M. Enzymic studies on the animal and intestinal bacterial

- metabolism of geniposide. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17, 1573-6, 1994.
- [4] Mi, F. L., Sung, H. W., Shyu, S. S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 38, 2804-14, 2000.
- [5] Butler, M. F., Ng, Y. F., Pudney, P. D. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41, 3941-53, 2003.
- [6] Dimida, S., Demitri, C., De Benedictis, V. M., Scalera, F., Gervaso, F., Sannino, A. Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 132, 2015.
- [7] He, M., Han, B., Jiang, Z., Yang, Y., Peng, Y., Liu, W. Synthesis of a chitosan-based photo-sensitive hydrogel and its biocompatibility and biodegradability. *Carbohydrate Polymers*, 166, 228-35, 2017.
- [8] Iftime, M.-M., Morariu, S., Marin, L. Salicylimine-chitosan hydrogels: Supramolecular architecturing as a crosslinking method toward multifunctional hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 165, 39-50, 2017.
- [9] Biao, L., Tan, S., Wang, Y., Guo, X., Fu, Y., Xu, F., Zu, Y., Liu, Z. Synthesis, characterization and antibacterial study on the chitosan-functionalized Ag nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 76, 73-80, 2017.
- [10] Laskar, K., Faisal, S. M., Rauf, A., Ahmed, A., Owais, M. Undec-10-enoic acid functionalized chitosan based novel nano-conjugate: An enhanced anti-bacterial/biofilm and anti-cancer potential. *Carbohydrate Polymers*, 166, 14-23, 2017.
- [11] Wahid, F., Wang, H.-S., Zhong, C., Chu, L.-Q. Facile fabrication of moldable antibacterial carboxymethyl chitosan supramolecular hydrogels cross-linked by metal ions complexation. *Carbohydrate Polymers*, 165, 455-61, 2017.
- [12] Madhumathi, K., Kumar, P. S., Abhilash, S., Sreeja, V., Tamura, H., Manzoor, K., Nair, S., Jayakumar, R. Development of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21, 807-13, 2010.
- [13] Anitha, A., Rani, V. D., Krishna, R., Sreeja, V., Selvamurugan, N., Nair, S., Tamura, H., Jayakumar, R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 78, 672-7, 2009.
- [14] Peter, M., Ganesh, N., Selvamurugan, N., Nair, S., Furuike, T., Tamura, H., Jayakumar, R. Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 80, 687-94, 2010.
- [15] Manzoor, K., Ahmad, S., Soundarajan, A., Ikram, S., Ahmed, S. Chitosan Based Nanomaterials for Biomedical Applications. *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications: Elsevier*; 2018. p. 543-62.
- [16] Fan, Z., Qin, Y., Liu, S., Xing, R., Yu, H., Chen, X., Li, K., Li, P. Synthesis, characterization, and antifungal evaluation of diethoxyphosphoryl polyaminoethyl chitosan derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 190, 1-11, 2018.
- [17] Lai, J.-Y., Li, Y.-T., Wang, T.-P. In vitro response of retinal pigment epithelial cells exposed to chitosan materials prepared with different cross-linkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 5256-72, 2010.
- [18] Dimida, S., Barca, A., Cancelli, N., De Benedictis, V., Raucci, M. G., Demitri, C. Effects of genipin concentration on cross-linked chitosan scaffolds for bone tissue engineering: Structural characterization and evidence of biocompatibility features. *International Journal of Polymer Science*, 2017, 2017.
- [19] Demetgül, C., Beyazit, N. Synthesis, characterization and antioxidant activity of chitosan-chromone derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 181, 812-7, 2018.
- [20] Delgadillo-Armendariz, N. L., Rangel-Vazquez, N. A., Marquez-Brazon, E. A., Gascue, R.-D. Interactions of chitosan/genipin hydrogels during drug delivery: a QSPR approach. *Química Nova*, 37, 1503-9, 2014.
- [21] Sami, A. J., Khalid, M., Jamil, T., Aftab, S., Mangat, S. A., Shakoori, A., Iqbal, S. Formulation of novel chitosan guar gum based hydrogels for sustained drug release of paracetamol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 324-32, 2018.
- [22] Bakshi, P. S., Selvakumar, D., Kadirvelu, K., Kumar, N. Comparative study on antimicrobial activity and biocompatibility of N-selective chitosan derivatives. *Reactive and Functional Polymers*, 124, 149-55, 2018.
- [23] Saita, K., Nagaoka, S., Shirotsaki, T., Horikawa, M., Matsuda, S., Ihara, H. Preparation and characterization of dispersible chitosan particles with borate crosslinking and their antimicrobial and antifungal activity. *Carbohydrate Research*, 349, 52-8, 2012.
- [24] Huang, B., Liu, M., Zhou, C. Chitosan composite hydrogels reinforced with natural

- clay nanotubes. *Carbohydrate Polymers*, 175, 689-98, 2017.
- [25] Li, B., Shan, C.-L., Zhou, Q., Fang, Y., Wang, Y.-L., Xu, F., Han, L.-R., Ibrahim, M., Guo, L.-B., Xie, G.-L. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde. *Marine Drugs*, 11, 1534-52, 2013.
- [26] Zeng, S., Ye, M., Qiu, J., Fang, W., Rong, M., Guo, Z., Gao, W. Preparation and characterization of genipin-cross-linked silk fibroin/chitosan sustained-release microspheres. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 2501, 2015.
- [27] Luo, M., Peng, H., Deng, Z., Yin, Z., Zhao, Q., Xiong, H. Preparation and characterization of genipin-crosslinked chitosan microspheres for the sustained release of salidroside. *International Journal of Food Engineering*, 11, 323-33, 2015.
- [28] Zhang, Y., Meng, F.-C., Cui, Y.-L., Song, Y.-F. Enhancing effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on the intestinal absorption process of genipin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10919-26, 2011.
- [29] Yu, Y., Feng, R., Li, J., Wang, Y., Song, Y., Tan, G., Liu, D., Liu, W., Yang, X., Pan, H. A hybrid genipin-crosslinked dual-sensitive hydrogel/nanostructured lipid carrier ocular drug delivery platform. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14, 423-34, 2019.
- [30] Costa-Júnior, E. S., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A., Vasconcelos, W. L., Mansur, H. S. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 76, 472-81, 2009.
- [31] Kumari, R., Dutta, P. Physicochemical and biological activity study of genipin-crosslinked chitosan scaffolds prepared by using supercritical carbon dioxide for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 261-6, 2010.
- [32] Liang, B., Shu, Y., Wan, P., Zhao, H., Dong, S., Hao, W., Yin, P. Genipin-enhanced nacre-inspired montmorillonite-chitosan film with superior mechanical and UV-blocking properties. *Composites Science and Technology*, 182, 107747, 2019.
- [33] Klein, M. P., Hackenhaar, C. R., Lorenzoni, A. S., Rodrigues, R. C., Costa, T. M., Ninow, J. L., Hertz, P. F. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and  $\beta$ -d-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 137, 184-90, 2016.
- [34] Paulino, A. T., Simionato, J. I., Garcia, J. C., Nozaki, J. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers*, 64, 98-103, 2006.
- [35] Felfel, R. M., Gideon-Adeniyi, M. J., Hossain, K. M. Z., Roberts, G. A., Grant, D. M. Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*, 204, 59-67, 2019.
- [36] Flores, E. E. E., Cardoso, F. D., Siqueira, L. B., Ricardi, N. C., Costa, T. H., Rodrigues, R. C., Klein, M. P., Hertz, P. F. Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. *Process Biochemistry*, 84, 73-80, 2019.
- [37] Meena, R., Prasad, K., Siddhanta, A. Effect of genipin, a naturally occurring crosslinker on the properties of kappa-carrageenan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41, 94-101, 2007.
- [38] Zhao, X., Song, K., Wang, S., Zu, Y., Li, N., Yu, X. Micronization of the pharmaceutically active agent genipin by an antisolvent precipitation process. *Chemical Engineering & Technology*, 36, 33-42, 2013.
- [39] Singh, P., Medronho, B., Alves, L., Da Silva, G., Miguel, M., Lindman, B. Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro-and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 175, 87-95, 2017..