DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO ANTICOAGULANTE PARA USO DÉRMICO

Palavras-Chave: trombose venosa superficial, anticoagulantes, tanshinona IIA sulfonato de sódio

Melanie Andery Bissolli – FCF - UNICAMP

Dra. Carolyne Brustolin Braga (Co-orientadora) – IQ - UNICAMP
Profa. Dra. Ljubica Tasic (orientadora) – IQ - UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios trombóticos, como a trombose venosa superficial (TVS) e a trombose venosa profunda (TVP), são condições caracterizadas pela formação anormal de coágulos de fibrina nos vasos sanguíneos. A TVS, apesar de ser considerada autolimitada e de menor gravidade, pode resultar em complicações graves, como a TVP e a embolia pulmonar [1,2]. Atualmente, no mercado, os anticoagulantes sintéticos de administração dérmica disponíveis são à base de heparina, a qual tem origem animal e pode eventualmente causar efeitos colaterais como alergias, além do risco de contaminação [3,4]. A partir da limitação provocada pela heparina, cresce o interesse pelo uso de compostos bioativos naturais, como aqueles extraídos de plantas e algas, que apresentam propriedades anticoagulantes, anti-inflamatórias e antioxidantes [5,6].

Nesse contexto, a tanshinona IIA sulfonato de sódio (Tan IIA-S) é um componente bioativo extraído e isolado de sementes da chia (*Salvia hispânica L.*) e possui potencial de inibir a proteína PAI-1, que é responsável pela inibição do ativador de plasminogênio tipo tecidual (tPA) e do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA), provocando a inibição da fibrinólise [7-9]. Portanto, ao inibir a proteína PAI-1, a Tan IIA-S pode estimular o processo de fibrinólise, promovendo a lise dos coágulos de fibrina [10,11].

Concomitantemente, a kappa-carragenana (κ-CRG), um polissacarídeo sulfatado extraído de algas vermelhas marinhas, tem sido estudada pela eficácia na formulação de hidrogéis biomiméticos, devido à sua biocompatibilidade e características espessantes e gelificantes [12,13]. Nesse sentido, a combinação desses compostos bioativos naturais em matrizes poliméricas pode representar uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos antitrombóticos de uso dérmico com baixo custo de preparação, seguros, eficazes e de origem natural, ainda não presentes no mercado. Dessa forma, o objetivo principal do estudo é desenvolver hidrogéis (HG) biomiméticos para aplicação dérmica com propriedades fibrinolíticas contendo em sua composição a Tan IIA-S e polissacarídeos sulfatados compondo a matriz do HG.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação da matriz do HG

Os hidrogéis foram preparados utilizando a κ-CRG e a pectina (PC), ambos polissacarídeos polares de origem natural e que atuaram como matriz principal, com o objetivo de fornecer características gelificantes e espessantes para as formulações [12-14]. Para otimizar as propriedades físico-químicas e mecânicas das formulações foi incorporado à formulação o cloreto de potássio (KCl), atuando como *crosslinker* [15].

2.2. Caracterização das formulações

A caracterização da estrutura e das propriedades físico-químicas foi feita utilizando um espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-vis) (Agilent HP 8453). Além disso, para avaliar a viscosidade aparente e o comportamento das formulações foi realizado um teste de espalhabilidade a 37 ºC, utilizando um papel circular milimetrado com eixo principal de 0,5 cm [16]. Conjuntamente, o comportamento viscoelástico das amostras foi avaliado por experimentos de reologia (Reômetro Haake MARS 40) realizados a 37 ºC, com a medição do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') a partir do ensaio oscilatório de varredura de frequência, assim como a viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento pela curva de fluxo [17-19].

2.3. Estabilidade das formulações

As amostras foram armazenadas a 37 ºC em um ambiente fechado e sem a presença de luz e, por fim, foram avaliadas quanto às características organolépticas, formação de precipitados e de colônias de fungos após um período de sete meses, entre dezembro de 2024 e julho de 2025.

2.4. Liberação da Tan IIA-S

O estudo sistemático *in vitro* da cinética de liberação da Tan IIA-S foi realizado a 37 ºC, em tampão acetato de sódio (pH 5,0) e em tampão fosfato de sódio (pH 7,4) [20,21]. A quantificação da porcentagem cumulativa de liberação foi avaliada por espectroscopia UV-vis durante períodos de tempo pré-determinados ao longo de 72 h, através de uma curva de calibração.

2.5. Avaliação da citotoxicidade das formulações

Os testes de avaliação da citotoxicidade dos HG foram realizados em uma linhagem de queratinócitos humanos HaCat, utilizando o método colorimétrico CCK8, de acordo com as instruções do fabricante. Nesse sentido, foram realizadas três análises utilizando 1 x 10^4 células por poço ao longo de 24 h e 48 h, em que elas foram expostas às formulações contendo diferentes concentrações de κ-CRG, Tan IIA-S e Tan IIA-S no HG, sendo que cada amostra foi analisada em triplicata [22]. A absorbância foi avaliada em cada poço em um comprimento de onda de 450 nm utilizando um leitor de placas multipoços (FlashScan 530 Analitic Jena), além disso, os valores de IC_{50} foram obtidos utilizando o software GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

2.6. Avaliação da atividade antitrombótica

A atividade antitrombótica das formulações foi avaliada por testes de fibrinólise padronizados de acordo com protocolos químicos e técnicos fornecidos em colaboração com o grupo da Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi do Hemocentro da UNICAMP, visando analisar o potencial fibrinolítico da Tan IIA-S frente a um controle [23,24]. Importa salientar que a docente orientadora deste projeto é a pesquisadora principal do auxílio à pesquisa FAPESP – Centros de Ciência para o Desenvolvimento: Centro de Doenças Tromboembólicas (Processo nº 2021/11963-0), coordenado pela Profa. Annichino-Bizzacchi.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Preparação e caracterização dos hidrogéis

A transparência dos HG avaliada por espectroscopia UV-vis está apresentada nas Figuras 1A-B e os espectros obtidos mostram que a variação na concentração de κ-CRG não influencia significativamente na transparência das formulações. Em contrapartida, observa-se que, com o aumento da concentração de PC, ocorreu uma diminuição da transparência dos HG, portanto, as amostras contendo 0,5% de PC foram desconsideradas para posterior análise.

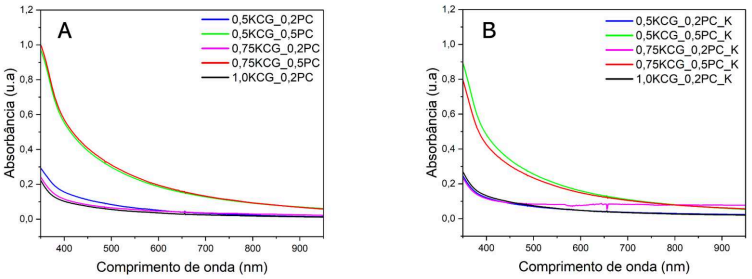
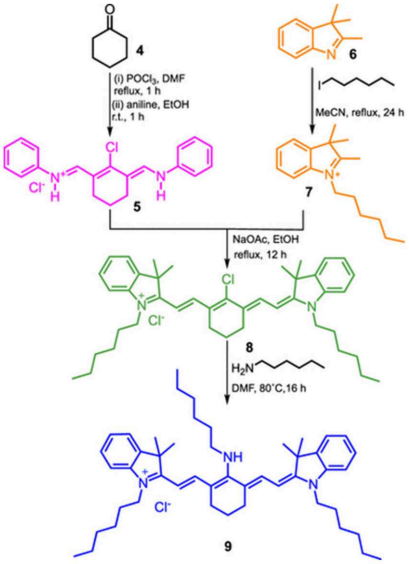


Figura 1 - Espectros UV-vis dos HG obtidos com diferentes proporções de κ-CRG e PC e adição de KCl: (A) HG com κ-CRG e PC, (B) HG com κ-CRG, PC e KCl.

Para o teste de espalhabilidade, foi considerado um volume de 2 mL de cada HG, além disso, para facilitar a visualização do teste foi adicionado às amostras 40 µL do corante aminocianina a 1 mg/mL, caracterizado como um sólido de coloração azul profundo, e que é representado pelo número 9 no Esquema 1 [25]. De acordo com os resultados mostrados na Figura 2, o aumento na concentração de κ-CRG proporcionou um aumento na viscosidade do HG, diminuindo a espalhabilidade, o que também foi observado com a adição de KCl. Portanto, a adição do *crosslinker* otimizou as propriedades físicas e mecânicas da formulação para a aplicação dérmica.



Esquema 1 - Rota sintética do corante aminocianina fluorescente NIR hidrofóbico (9) [25].

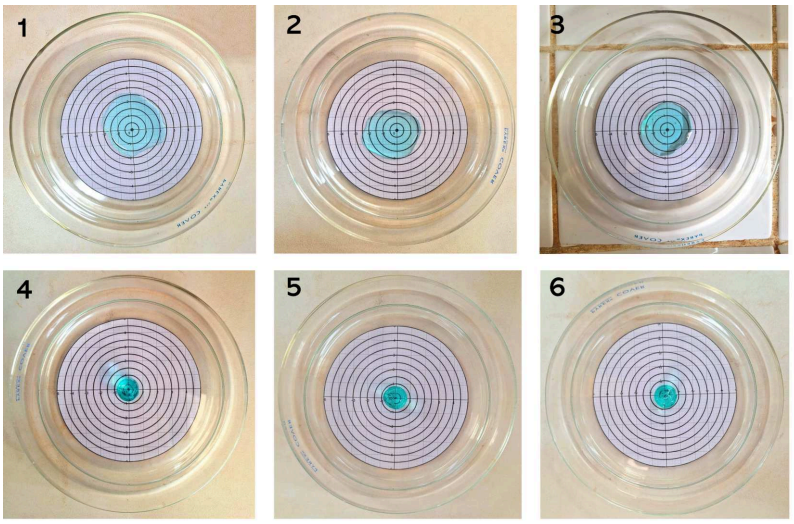


Figura 2 - Teste de espalhabilidade dos HG: (1) HG com 0,5% κ-CRG e 0,2% PC, (2) HG com 0,75% κ-CRG e 0,2% PC, (3) HG com 1,0% κ-CRG e 0,2% PC, (4) HG com 0,5% κ-CRG, 0,2% PC e KCl, (5) HG com 0,75% κ-CRG, 0,2% PC e KCl, (6) HG com 1,0% κ-CRG, 0,2% PC e KCl.

3.2. Comportamento reológico e mecânico das formulações

A curva de fluxo obtida a partir da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento foi realizada para o HG contendo somente 0,75% de κ-CRG, já que este apresentava alta espalhabilidade de acordo com o item 3.1. Nesse sentido, a Figura 3A mostra que com o aumento da taxa de cisalhamento ocorreu a diminuição da viscosidade da amostra a partir de, aproximadamente, 1 s^{-1}. Portanto, a amostra se comporta como um fluido não-Newtoniano pseudoplástico (Figura 4A), em que o HG apresenta menor resistência ao escoamento após a inversão do frasco, não sendo vantajoso para uma liberação controlada e para a aplicação desejada. Além disso, essa amostra não apresentou comportamento de gel, como mostrado na Figura 3B pelo ensaio oscilatório de varredura de frequência com G'' > G'. A partir da adição de PC e KCl, representado na Figura 3C, foi observada uma mudança no comportamento, já que a amostra se comportou como um líquido viscoelástico com G' > G'' (Figura 4B). Além disso, após a adição de Tan IIA-S ao HG (Figuras 3C e 4C), esse comportamento se manteve, o que indica que este componente não altera o comportamento viscoelástico da formulação.

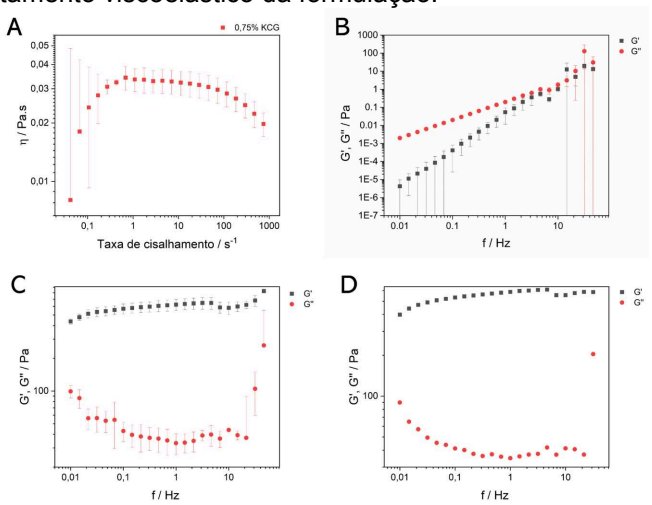


Figura 3 – Representação gráfica de dados obtidos em estudos de reologia dos HG. Curva de fluxo e ensaio oscilatório de varredura de frequência: (A-B) 0,75% κ-CRG, (C) 0,75% κ-CRG, 0,2% PC e 0,05 KCl, (D) 0,75% κ-CRG, 0,2% PC, 0,05 KCl e Tan IIA-S.

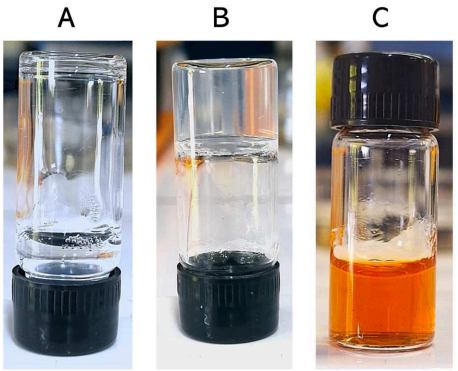


Figura 4 – Fotos dos HG: (A) 0,75% κ-CRG, (B) 0,75% κ-CRG, 0,2% PC e KCl, (C) 0,75% κ-CRG, 0,2% PC, KCl e Tan IIA-S.

3.3. Estudo *in vitro* do perfil de liberação da Tan IIA-S

O estudo de liberação da Tan IIA-S foi realizado em tampão acetato de sódio (pH 5,0), simulando o pH da pele humana, e em tampão fosfato de sódio (pH 7,4), usado como controle neutro, para a amostra que obteve os melhores resultados dos testes anteriores, sendo ela o HG com 0,75% de κ-CRG, 0,2% de PC e KCl. O perfil de liberação da Tan IIA-S no comprimento de onda de 458 nm, ilustrado nas Figuras 5A-B, se manteve durante o estudo realizado em um período entre 30 min e 72 h, mostra que não ocorreu degradação do composto (Tabela 1).

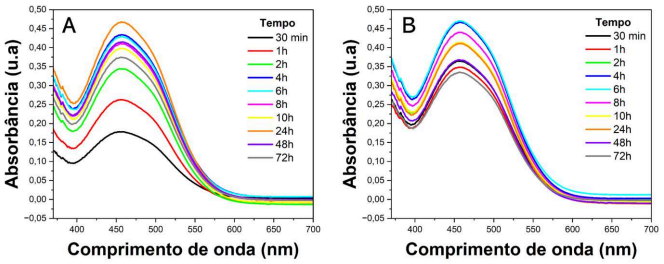


Figura 5 – Espectros UV-vis de liberação da Tan IIA-S em HG com 0,75% κ-CRG, 0,2 PC e KCl em pH 5,0 (A) e em pH 7,4 (B).

Tabela 1 – Porcentagem de liberação cumulativa de Tan IIA-S no HG em função do tempo em diferentes pH

	30 min	1h	2h	4h	6h	8h	10h	24h	48h	72h
pH 5,0	20,9%	34,4%	47,9%	60,5%	64,6%	68,1%	72,4%	84,5%	84,5%	84,5%
pH 7,4	44,0%	46,5%	57,9%	68,8%	73,4%	76,4%	78,8%	82,7%	83,4%	83,4%

Os resultados obtidos (Tabela 1) indicam que em ambos os valores de pH ocorreu uma liberação maior que 80% de Tan IIA-S, a qual estabilizou a partir de 24 h do estudo em pH 5,0 e de 48 h do estudo em pH 7,4. Porém, em pH 5,0, houve uma liberação mais controlada e maior de Tan IIA-S, totalizando aproximadamente 85%, em comparação ao pH 7,4, com a liberação total de 83,36%, o que indica a eficiência da formulação para a entrega controlada do componente bioativo para uma aplicação dérmica.

3.4. Teste de estabilidade

Após um período de sete meses de armazenamento, as amostras não exibiram alteração de odor, porém, apresentaram uma pequena variação na transparência, além disso, o HG apresentou um aumento de viscosidade, como apresentado na Figura 6, o que indica uma pequena perda de água durante o período. Ademais, não houve a formação de precipitados e de colônias de fungo a olho nu.

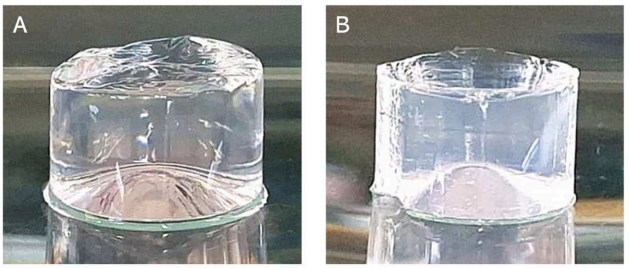


Figura 6 – Teste de estabilidade do HG com 0,75% κ-CRG, 0,2 PC e KCl: (A) Dezembro de 2024, (B) Julho de 2025.

3.5. Avaliação da citotoxicidade dos hidrogéis

Os resultados apresentados na Figura 7A, indicam que a viabilidade celular em 24 h e 48 h não foi alterada significativamente para todas as concentrações de κ-CRG analisadas. Além disso, a viabilidade celular manteve-se elevada (> 88%), o que indica baixa citotoxicidade mesmo em concentrações maiores do biopolímero, portanto, é possível afirmar que a κ-CRG apresenta um potencial de segurança biológica para ser usada como matriz do HG para um perfil de liberação controlada. Os valores obtidos de IC_{50}, como ilustrado (Figuras 7B-C), da Tan IIA-S e da Tan IIA-S no HG foram, respectivamente, 255 µmol/L e 283 µmol/L, o que indica que a matriz do HG carregando a Tan IIA-S não influencia na viabilidade celular. Além disso, é possível afirmar que a Tan IIA-S apresenta baixa citotoxicidade na concentração utilizada no HG, ou seja, 50 µmol/L, o que mostra seu potencial para aplicação dérmica.

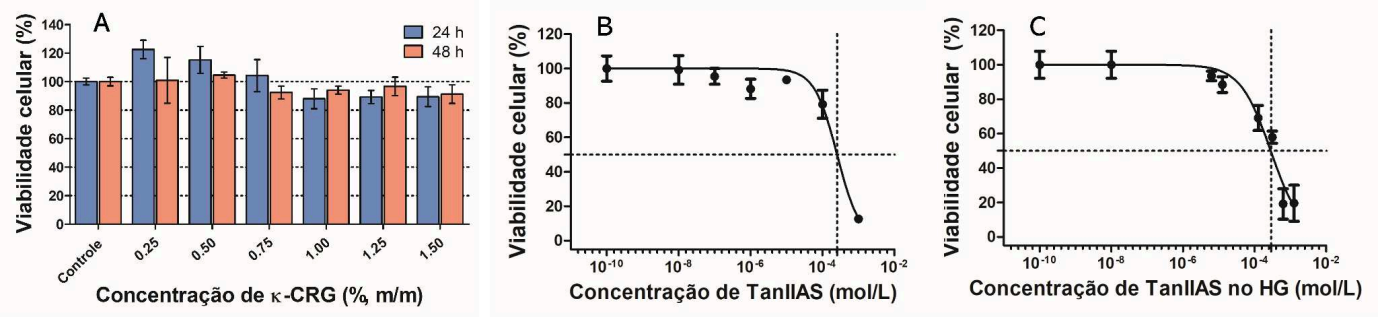


Figura 7 – Viabilidade celular em HaCat: (A) κ-CRG, (B) Tan IIA-S, (C) Tan IIA-S no HG.

3.6. Avaliação do potencial fibrinolítico do hidrogel

Para o teste de fibrinólise foram utilizadas amostras de plasma fornecidas pelo Hemocentro da UNICAMP de um paciente não identificado. O ácido tranexâmico 250 mg, um antifibrinolítico, foi usado neste estudo como um controle. Além disso, as amostras nomeadas por linha de base (*baseline*) foram analisadas somente com o plasma do paciente. Para as amostras analisadas de Tan IIA-S foi preparada uma solução 50 µmol/L de Tan IIA-S. Nesse sentido, foi observado (Figura 8,Tabela 2) que as amostras contendo Tan IIA-S apresentaram um tempo menor de início de lise do coágulo do que observado para as amostras de *baseline*, o que indica que o composto analisado tem potencial fibrinolítico, uma vez que promoveu a lise do trombo mais rapidamente. As amostras de ácido tranexâmico apresentaram valor negativo de tempo de lise, já que o processo de fibrinólise não ocorreu, como esperado. Além disso, as amostras contendo a Tan IIA-S exibiram valor de área sob a curva menor que as amostras de *baseline* e de ácido tranexâmico, o que pode indicar que o tamanho do coágulo formado foi menor.

Tabela 2 – Valores obtidos a partir do teste de fibrinólise

Amostras, paciente não identificado			
	Baseline	**Tan IIA-S**	**Ácido Tranexâmico**
Tempo de Início (min) - TI	3,50	2,84	3,50
Vmax (um/min)	44,40	70,35	10,77
Tempo de platô (min)	9,00	7,17	10,17
Mudança de turbidez (u.a.)	0,18	0,19	0,36
Área sob a curva	125,09	116,10	497,20
Tempo de lise	15,17	9,83	-5,50

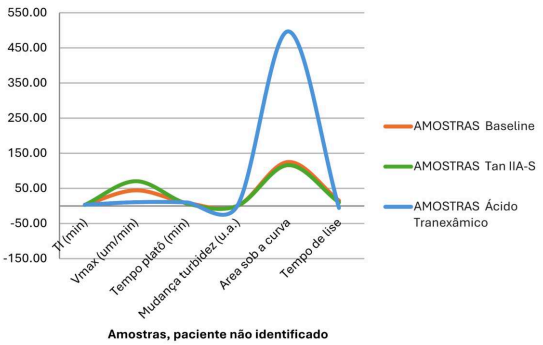


Figura 8 – Teste de fibrinólise.

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostraram que o hidrogel desenvolvido foi de fácil preparação e apresentou baixa citotoxicidade, com viabilidade celular maior que 90%, e liberação controlada de TanIIA-S de *ca*. de 85% em pH 5,0 ao longo de 24 h, sendo eficiente para a entrega do ativo à nível dérmico. A partir dos resultados das análises reológicas, foi possível concluir que a formulação apresentou comportamento viscoelástico, o que indica que as propriedades mecânicas dos hidrogéis produzidos puderam ser moduladas e otimizadas em relação ao HG apenas com a matriz de κ-CRG. Por fim, foi possível concluir que as amostras de Tan IIA-S apresentaram potencial antitrombótico de acordo com os testes de fibrinólise realizados, com menor tempo de lise e menor tamanho do coágulo formado do que comparados às amostras de linha de base (*baseline*) e de ácido tranexâmico, o que evidencia o potencial promissor do HG para atuar como agente antitrombótico para aplicações dérmicas.

5. BIBLIOGRAFIA

1. STONE, J. et al. Deep vein thrombosis: Pathogenesis, diagnosis, and medical management. Cardiovascular Diagnosis and Therapy, v. 7, n. Suppl 3, p. S276–S284, 2017.
2. VAN ROYEN, F. S. et al. Management of superficial venous thrombosis based on individual risk profiles: Protocol for the development and validation of three prognostic prediction models in large primary care cohorts. Diagnostic and Prognostic Research, v. 5, n. 1, p. 15, 2021.
3. BRANDÃO, G. M. S. et al. Anticoagulantes orais diretos para o tratamento da trombose venosa profunda: Revisão de revisões sistemáticas. Jornal Vascular Brasileiro, v. 17, n. 4, p. 310–317, 2018.
4. DI MINNO, A. et al. Old and new oral anticoagulants: Food, herbal medicines and drug interactions. Blood Reviews, v. 31, n. 4, p. 193–203, 2017.
5. MAZUMDER, T. et al. Current antithrombotic therapies and prospects of natural compounds in the management of the thrombotic disorder. Natural Resources for Human Health, v. 3, n. 2, p. 134–175, 2022.
6. KUBATKA, P. et al. Antithrombotic and antiplatelet effects of plant-derived compounds: A great utility potential for primary, secondary, and tertiary care in the framework of 3P medicine. The EPMA journal, v. 13, n. 3, p. 407–431, 2022.
7. ZHOU, Z.-Y. et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate: A review of pharmacological activity and pharmacokinetics. Biomedecine & Pharmacotherapie v. 118, n. 109362, p. 109362, 2019.
8. CHEN, L. et al. Effects of tanshinone combined with valsartan on hypertensive nephropathy and its influence on renal function and vascular endothelial function. American Journal of Translational Research, v. 13, n. 5, p. 4788–4795, 2021.
9. REN, J. et al. *Salvia miltiorrhiza* in treating cardiovascular diseases: A review on its pharmacological and clinical applications. Frontiers in Pharmacology, v. 10, p. 753, 2019.
10. WEI, B. et al. Bioactive components and molecular mechanisms of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in promoting blood circulation to remove blood stasis. Journal of Ethnopharmacology, v. 317, n. 116697, p. 116697, 2023.
11. LI, Z.-M.; XU, S.-W.; LIU, P.-Q. *Salvia miltiorrhiza* Burge (Danshen): A golden herbal medicine in cardiovascular therapeutics. Acta Pharmacologica Sinica, v. 39, n. 5, p. 802–824, 2018.
12. SERRA, J. P. et al. Carrageenan-based hybrid materials with ionic liquids for sustainable and recyclable printable pressure sensors. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, v. 10, n. 26, p. 8631–8640, 2022.
13. YERMAK, I. M. et al. Mucoadhesive properties of sulphated polysaccharides carrageenans from red seaweed families *Gigartinaceae* and *Tichocarpaceae*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 142, p. 634–642, 2020.
14. CANTERI, M. H. G. et al. Pectina: da matéria-prima ao produto final. Polímeros, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.
15. SHMIDOV, Y. et al. Effect of crosslinker topology on enzymatic degradation of hydrogels. Biomacromolecules, v. 21, n. 8, p. 3279–3286, 2020.
16. MONTEIRO, M. S. DE S. B. et al. Desenvolvimento e avaliação de hidrogéis de carboximetilcelulose para o tratamento de feridas. Infarma - Ciências Farmacêuticas, v. 32, n. 1, p. 41–55, 2020.
17. CORRÊA, N. M. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas , v. 41, n. 1, 2005.
18. SOARÊS, E. J. Introdução à reologia: Escoamento e caracterização de materiais complexos. São Paulo: Edgard Blücher, 2024.
19. NOGUEIRA, H. C. N. et al. Alkane selection as a critical factor in structuring reverse wormlike micelles. Journal of Colloid and Interface Science, v. 684, n. Pt 2, p. 170–180, 2025.
20. FARASATI FAR, B. et al. Multi-responsive chitosan-based hydrogels for controlled release of vincristine. Communications Chemistry, v. 6, n. 1, p. 28, 2023.
21. GULL, N. et al. *In vitro* study of chitosan-based multi-responsive hydrogels as drug release vehicles: A preclinical study. RSC Advances, v. 9, n. 53, p. 31078–31091, 2019.
22. BRAGA, C. B. et al. Enhanced synergistic efficacy against breast cancer cells promoted by co-encapsulation of piplartine and paclitaxel in acetalated dextran nanoparticles. Molecular Pharmaceutics, v. 21, n. 11, p. 5577–5597, 2024.
23. ARZENARES, L. et al. Plasmin generation in healthy individuals. Hematology, Transfusion and Cell Therapy, v. 45, p. S477–S478, 2023.
24. MARTINELLI, BM et al. Registro prospectivo multicêntrico em pacientes com câncer do Centro de doenças tromboembólicas do hemocentro da Unicamp (CDT), no estado de São Paulo: Análise da incidência de tromboembolismo venoso e validação dos escores de predição. Hematologia, transfusão e terapia celular. v. 46, p. S615–S616, 2024.
25. BRAGA, C. B. et al. Biodegradable and pH-responsive acetalated dextran (Ac-Dex) nanoparticles for NIR imaging and controlled delivery of a platinum-based prodrug into cancer cells. Molecular Pharmaceutics, v. 16, n. 5, p. 2083–2094, 2019.