PRODUÇÃO DE MICROGÉIS COM POTENCIAL APLICAÇÃO PARA ÁREA BIOMÉDICA: COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCESSOS EM BATELADA E MICROFLUÍDICO E ANÁLISE DO EFEITO DE DIFERENTES ÓLEOS NAS EMULSÕES

Palavras-Chave: MICROFLUÍDICA, MICROGEL, BIOMATERIAL

Autores(as):

NADYNE MARQUES BARNEZZI GIANASI, FEQ – UNICAMP

FERNANDA BARROSO PEIXOTO, FEQ – UNICAMP

BRUNA GREGATTI DE CARVALHO, FEQ – UNICAMP

Prof(ª). Dr(ª). LUCIMARA GAZIOLA DE LA TORRE, FEQ – UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Microgéis são partículas micrométricas de hidrogel que possuem muitas aplicações, principalmente na medicina regenerativa, como na regeneração de tecidos. Tais materiais podem ser utilizados para produzir o *scaffold* granular, também chamado de *Microporous Annealed Particle* (MAP), estrutura porosa formada pela interligação de microgéis compactados, proporcionando um sistema de cultura tridimensional. Seus poros favorecem a infiltração, migração e proliferação celular e aproxima-se da matriz extracelular natural de tecidos vivos. Hidrogéis semi-sintéticos têm sido utilizados em tais aplicações buscando associar características de biocompatibilidade e biodegradabilidade dos polímeros naturais com propriedades químicas e mecânicas dos polímeros sintéticos (YAHIA, 2015). A gelatina metacrilada (GelMA) é um hidrogel semi-sintético provindo do colágeno e que possui grupos metacrílicos, fazendo com que possa ser fotorreticulado sem depender da temperatura (WANG et al., 2017; YUE et al., 2015).

As características dos microgéis — como forma, tamanho e homogeneidade — são fundamentais para suas aplicações, exigindo atenção aos métodos de produção e seus parâmetros. Este estudo investigou duas técnicas: emulsão em batelada e microfluídica de gotas, utilizando óleos de baixo custo. A emulsão em batelada é amplamente usada pela simplicidade e eficiência. Nela, uma solução polimérica é dispersa em uma fase oleosa imiscível sob agitação, formando microgéis estabilizados por surfactantes. No entanto, esse método pode gerar variações significativas nas características dos microgéis, devido à dificuldade de controle preciso do processo (MOLLEY, 2022). Como alternativa, a microfluídica de gotas permite maior controle na produção, resultando em microgéis monodispersos e menores. O processo envolve a injeção controlada de duas fases imiscíveis em dispositivos microfluídico, fazendo com que as forças viscosas e interfaciais promovam a formação uniforme de gotas (SEEMANN et al., 2012; SACKMANN; FULTON; BEEBE, 2014).

Em ambos os métodos, a escolha do óleo influencia diretamente nas propriedades dos microgéis, incluindo estabilidade, biocompatibilidade e funcionalidade. Na microfluídica, a viscosidade do óleo é um fator crítico. Óleos fluoretados são ideais por sua baixa viscosidade, mas seu alto custo limita o uso em larga escala (BAROUD; GALLAIRE; DANGLA, 2010). Assim, óleos alternativos como os minerais e vegetais (canola, milho etc.) têm ganhado destaque por serem acessíveis, estáveis e biocompatíveis (MA et al., 2023; MOLLEY, 2022; SARTIPZADEH et al., 2022). Com isso, torna-se essencial compreender como suas propriedades influenciam na formação dos microgéis frente aos óleos fluoretados.

METODOLOGIA:

1. **Preparo das soluções**

A GelMA foi sintetizada de acordo com a metodologia de YUE et al. (2015). Inicialmente foi preparada a solução de 10 % (m/v) de GelMA em PBS e fotoiniciador Irgacure 2959 (1 % m/v) a temperatura de 60°C. A solução foi mantida em estufa até total dissolução. Foram testados dois óleos: (1) óleo de canola com 0,5 % de Span 80 (MOLLEY, 2022) e (2) óleo mineral com 2 e 3% de Span 80 (MUIR et. al., 2021).

2. **Produção de microgéis em emulsão batelada**

Os testes para escolha do melhor óleo foram realizados mantendo o óleo (mineral ou canola, 15 mL) aquecido a 50°C e mantido sob agitação utilizando um agitador mecânico digital (Tecnal, TE-039) com um impelidor do tipo disco dentado a 450 rpm, seguindo conforme mostra a Figura 1. Em seguida, a solução de GelMA foi adicionada gota a gota com o auxílio de uma bomba de seringa (Harvard Apparatus, EUA) a uma vazão de 1 mL/min na proporção volumétrica 1:30 (fase aquosa: fase oleosa). Após 15 minutos de agitação e ainda mantendo-a, a solução foi submetida a banho de gelo (4°C) por 30 minutos. Por fim, alíquotas de 5 mL foram separadas para reticulação com luz UV a uma intensidade de 17,4 mW cm^{-2}com o auxílio de uma lanterna (Lonefire) por 5 minutos em uma placa de Petri (90x15 mm). A fotopolimerização foi conduzida em uma caixa revestida internamente por papel alumínio com a lanterna de luz ultravioleta a 10 cm da amostra a ser irradiada. Os microgéis em emulsão foram armazenados a 8°C por pelo menos um dia antes da lavagem.

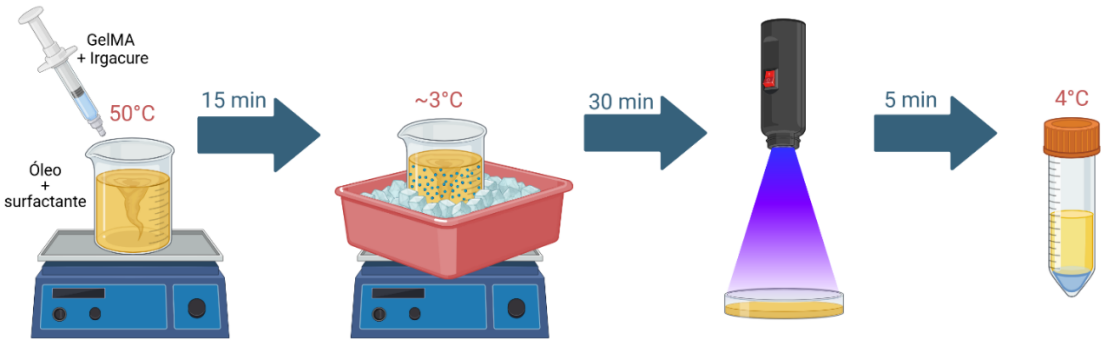

Figura 1 - Protocolo estabelecido para a produção de microgéis em batelada, representando o gotejamento da solução de GelMA na fase oleosa aquecida e sob agitação, seguida das reticulações física e química (por fotopolimerização). Criada com Biorender.

3. **Produção de microgéis em microfluídica**

Nessa etapa, foram utilizados dispositivos microfluídicos de alta e de baixa vazão (Figura 2). As soluções utilizadas são indicadas no item 1, sendo a fase dispersa a solução de GelMA e a fase contínua, a solução de óleo mineral com 3% de Span 80; ambas foram introduzidas no dispositivo a partir de duas bombas seringa (Harvard Apparatus, USA). As vazões utilizadas no dispositivo *Step emulsification* foram de 100µL/min para a fase dispersa e 20µL/min para a fase contínua. No dispositivo *Flow focusing* as vazões foram de 10µL/min e 4µL/min para a fase dispersa e contínua, respectivamente.

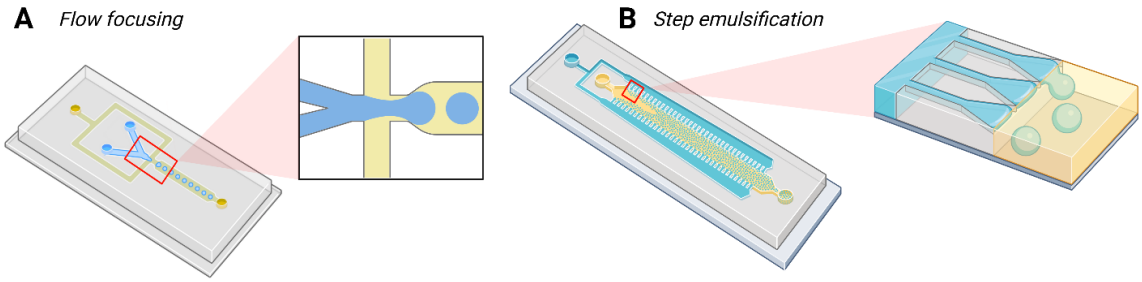

Figura 2 – Configurações dos dispositivos utilizados de baixa (A) e alta (B) vazão. Criada com Biorender.

4. **Recuperação dos microgéis**

A recuperação dos microgéis de GelMA dos óleos de canola e mineral consistiu em quatro lavagens sequenciais sempre seguidas pela centrifugação da amostra. Na primeira etapa, cerca de 5 ml da amostra foram lavados com 3 ml de diferentes solventes (PBS ou PBS com 0,025 % Tween 20), após a lavagem a amostra foi centrifugada a 10°C e 10000g por 10 minutos, para remoção do sobrenadante, composto por óleo e os solventes adicionados. Nas três subsequentes lavagens os microgéis foram lavados apenas com tampão PBS e centrifugados a 10°C e 10000g por 10 minutos. Para os microgéis produzidos em microfluídica, foram feitas 3 lavagens com a solução de Tween 20 e uma com PBS, seguindo o mesmo protocolo de centrifugação.

5. Caracterização dos microgéis

Após a lavagem, os microgéis suspensos em PBS foram caracterizados utilizando imagens de microscopia óptica obtidas com o auxílio de um Microscópio Invertido (Nikon, USA). Para cada triplicata do processo, 100 microgéis tiveram seu diâmetro medido utilizando software Image J. A homogeneidade da amostra foi verificada por meio do coeficiente de variação (CV), calculado a partir da Equação 1:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} . 100 \qquad \textit{Equação 1}$$

Onde $\bar{x}$ indica a média dos diâmetros do espaço amostral e σ representa o desvio padrão dos dados, e é calculado conforme equação 2:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(xi-\bar{x})^2}{n}} \qquad \textit{Equação 2}$$

Onde xi é cada valor individual e n é a quantidade de valores utilizados (100 microgéis).

Os resultados serão reportados como a média dos diâmetros ± desvio padrão amostral, em µm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

1. Estabelecimento do tempo de reticulação com luz ultravioleta

Inicialmente, microgéis foram produzidos e reticulados a 1, 3 e 5 minutos (Figura 2) e foram avaliados quanto a sua morfologia, a fim de estabelecer o tempo ideal de reticulação com luz UV. Os parâmetros de processo, nessa fase, seguiram como foi descrito no item 2 da metodologia, alterando apenas a agitação para 700 rpm e o volume para 30 mL.

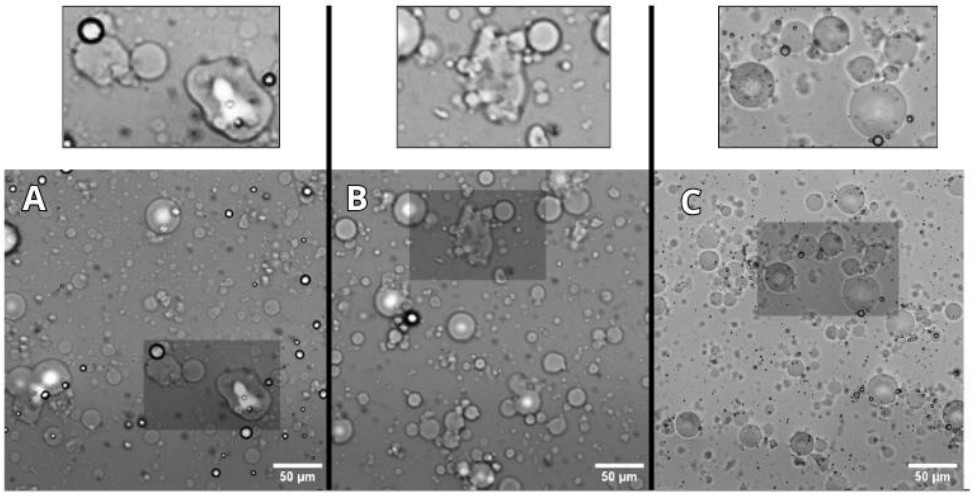

Figura 3 – Imagens de microscopia óptica dos microgéis em dos diferentes tempos de exposição à luz UV, 1 minuto (A), 3 minutos (B) e 5 minutos (C) de reticulação com ultravioleta. As imagens em destaque no canto superior mostram em detalhe a formação dos aglomerados. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

A observação das imagens apresentadas na Figura 2 indica que as irradiações de 1 e 3 minutos provocam a formação de aglomerados, indicando que a fotorreticulação não ocorreu ou que ocorreu parcialmente. Dessa forma, foi estabelecido que o melhor intervalo de tempo para a reticulação é de 5 minutos e foi usado nos experimentos posteriores.

2. Produção dos microgéis em diferentes óleos e lavagem

Mantendo as condições de processo descritas no item 2 da metodologia, novos microgéis foram produzidos e separados do óleo e do surfactante. Foram realizadas centrifugações e lavagens utilizando PBS e PBS com Tween 20. A utilização de Tween 20 busca remover o surfactante, que pode ser tóxico para células. Portanto, a metodologia as quantificações de tamanho e CV foram realizadas e são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de diâmetro e de CV para os experimentos conduzidos em triplicata, comparando o uso de óleo de canola e óleo mineral e, também, lavagem com PBS e com a solução de PBS e Tween 20. As soluções de óleo de canola e de óleo mineral possuem respectivamente 0,5 e 2 % de Span 80.

Lavagem	Óleo + surfactante	Diâmetro (µm)	CV
PBS	Óleo de canola	36,8±19,4	56,9
	Óleo mineral	49,0±22,8	47,1
PBS + Tween 20	Óleo de canola	32,0±19,3	60,3
	Óleo mineral	54,1±19,2	36,3

Analisando os valores expostos na Tabela 1, não se percebe diferença de diâmetro nem de CV comparando microgéis produzidos com o mesmo óleo e lavados com PBS e com PBS + Tween 20, o que contribui para a ideia de que o Tween 20 somente age na remoção do surfactante. Comparando os microgéis lavados com a mesma solução, percebe-se que, utilizando o óleo mineral, o resultado são microgéis maiores e um CV menor. Apesar de não haver literatura suficiente que explique os efeitos de diferentes óleos na formação de microgéis, é possível atribuir tais resultados à diferença de viscosidade dos óleos (ALMEIDA et al., 2012). Fluidos mais viscosos, como o óleo de canola, apresentam tendência a exercer forças de cisalhamento maiores, favorecendo a quebra das gotas em tamanhos menores (HESS, 2002).

3. Produção de microgéis por microfluídica

Utilizando dispositivos Flow Focusing e Step Emulsification, foram produzidos microgéis de GelMA usando óleo mineral, já que mostrou resultados com menor valor de CV na etapa anterior. A lavagem foi conduzida com solução de PBS com Tween 20. Os resultados presentes na Tabela 2 mostram que, para as vazões testadas, com o dispositivo *flow focusing* foram obtidos microgéis menores, o que pode ser associado ao tamanho dos canais, às vazões utilizadas e às propriedades de cada dispositivo, porém mais monodispersos do que com o dispositivo do tipo *step emulsification*. Uma propriedade importante do dispositivo *step emulsification* é que, como mostra a Figura 2, ele possui uma série de canais paralelizados, fazendo com que haja diferença de pressão entre eles, contribuindo para um aumento no valor do CV (OFNER, 2017). Outro parâmetro a ser analisado é a produtividade. Como é possível utilizar vazões bem maiores com o *step emulsification*, a quantidade de microgéis obtidos por tempo é muito maior do que utilizando o dispositivo *flow focusing.*

Os resultados se apresentam de acordo com a literatura, conforme estudado por CHEN et al. (2014) e SAMANIPOUR et al. (2016) utilizando o dispositivo *flow focusing.* Apesar de não haver literatura suficiente que explore o dispositivo *step emulsification* utilizando óleo mineral, é possível comparar com os trabalhos de OFNER et al. (2017) e CHA et al. (2014) e validar os resultados obtidos.

Tabela 2 – Comparativo entre as três formas de produção testadas nas condições de vazão, volume e concentrações adotadas e utilizando óleo mineral e lavagem com solução de PBS com 0,025% de Tween 20.

Forma de produção	CV	Diâmetro (µm)
Emulsão em batelada	36,3	54,1 ± 19,2
Flow focusing	9,3	36,2 ± 3,3
Step emulsification	42,2	143,9 ± 60,3

CONCLUSÕES:

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que foi possível produzir microgéis de GelMA utilizando óleos de baixo custo a partir de ambos os métodos utilizados. Para a metodologia de emulsão em batelada, obteve-se um protocolo viável de produção de microgéis de GelMA utilizando ambos os óleos explorados. Entretanto, o óleo mineral se mostrou uma melhor escolha para produção de microgéis com aplicações biomédicas devido à obtenção de um menor valor de CV. Ainda nessa etapa, foi possível concluir que a lavagem dos microgéis utilizando solução de Tween 20 pode ser promissora na remoção do surfactante sem afetar a integridade das estruturas.

Na segunda etapa, foram explorados dois dispositivos microfluídicos, sendo ambos viáveis para a produção de microgéis de GelMA. O dispositivo *flow focusing* produziu microgéis de menor diâmetro e menor valor de CV. Dessa forma, é possível concluir que a depender da aplicação final a ser utilizada, cada um dos métodos pode se mostrar mais favorável. Para uma aplicação que necessita de baixa polidispersividade, a microfluídica utilizando o dispositivo *flow focusing* foi considerada a mais favorável. Para aplicações que buscam alta produtividade, a emulsão em batelada utilizando o óleo mineral é bastante viável. O dispositivo *step emulsification* se mostrou menos favorável dentre as formas de produção estudadas, já que resulta em microgéis com altos valores de CV, assim como a emulsão em batelada, mas essa última apresenta produtividade bem maior.

BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, A. C. M.; DA COSTA, G. A.; DA SILVA, S. M. C. **Estimativa da Viscosidade e Densidade de Óleos Vegetais**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, dez. 2012.

BAROUD, C. N.; GALLAIRE, F.; DANGLA, R. Dynamics of microfluidic droplets. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 16, p. 2032–2045, 2010.

CHEN, Yujie et al. Microfluidics-assisted fabrication of gelatin–silica core–shell microgels for injectable tissue constructs. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 15, n. 8, p. 2684–2692, 2014.

HESS, B. Determining the shear viscosity of model liquids from molecular dynamics simulations. **Journal of Chemical Physics**, v. 116, n. 1, p. 209–217, 1 jan. 2002.

MA, X. et al. Minimally invasive injection of biomimetic Nano@Microgel for in situ ovarian cancer treatment through enhanced photodynamic reactions and photothermal combined therapy. **Materials Today Bio**, v. 20, n. January, p. 100663, 2023.

MOLLEY, T. G. **Microgel Suspensions for Tissue Engineering and Tumor Models**. Sydney: The University of New South Wales, Australia, 2022.

MUIR, V. G. et al. Influence of Microgel Fabrication Technique on Granular Hydrogel Properties**. ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 7, n. 9, p. 4269–4281, 16 fev. 2021.

OFNER, Alessandro; MOORE, David G.; RÜHS, Patrick A.; SCHWENDIMANN, Pascal; EGGERSDORFER, Maximilian; AMSTAD, Esther; WEITZ, David A.; STUDART, André R. High-Throughput Step Emulsification for the Production of Functional Materials Using a Glass Microfluidic Device. **Macromolecular Chemistry and Physics**, Weinheim: Wiley-Blackwell, v. 218, n. 2, p. 1600472, 2017.

SACKMANN, E. K.; FULTON, A. L.; BEEBE, D. J. The present and future role of microfluidics in biomedical research. **Nature**, v. 507, n. 7491, p. 181–189, 2014.

SARTIPZADEH, O. et al. Microfluidic-assisted synthesis and modeling of stimuli-responsive monodispersed chitosan microgels for drug delivery applications. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2022.

SEEMANN, R. et al. Droplet based microfluidics. **Reports on Progress in Physics**, v. 75, n. 1, 2012.

WANG, Z. et al. Comparative study of gelatin methacrylate hydrogels from different sources for biofabrication applications. **Biofabrication**, v. 9, n. 4, 2017.

YAHIA, LH. History and Applications of Hydrogels. **Journal of Biomedical Sciencies**, v. 04, n. 02, p. 1–23, 2015.

YUE, K. et al. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. **Biomaterials**, v.73, p. 254–271, dez. 2015.