

MICRO E NANO HIDROGÉIS DE HIALURONATO DE SÓDIO

Sônia M. Malmonge¹ e Maria Helena A. Santana²

¹CECS, Universidade Federal do ABC, Santo André (SP), Brasil

²LDPB, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP), Brasil

E-mail: sonia.malmonge@ufabc.edu.br

Abstract: Micro and nano hydrogels particles have been obtained for using in nanobiotechnology area, such as injectable biomaterials. This work presents a study that was performed aiming the obtaintion of sodium hyaluronate micro/nanohydrogels by using the water in oil emulsion technique and adipic dihydrazide crosslinking. The hydrogels particles obtained presented a spherical morphology with diameter changing from 200 nm to 50 µm with high equilibrium water content. The viscosity of HNa particles in aqueous dispersion was lower than HNa solution considering the same concentration. Additionally the viscoelasticity of the particles seems to increase with the porosity of that. These micro/nano hydrogels seems to present high potential for use as injectable biomaterials.

Palavras-chave: Biomateriais, Hidrogéis, Nanotecnologia.

Introdução

Os biomateriais poliméricos tem sido alvo de constantes pesquisas e, dentre os diferentes polímeros estudados para uso na área médica destaca-se a classe dos hidrogéis poliméricos que vem recebendo atenção desde o trabalho pioneiro de Witcherle (1960) [1] uma vez que estes materiais apresentam propriedades interessantes para uso como biomateriais.

Embora muitos estudos na área empreguem hidrogéis na forma de filmes densos e/ou porosos, atualmente, nanopartículas e/ou micropartículas de hidrogéis tem sido tem sido estudadas como alternativa para uso em aplicações específicas tais como liberação sustentada de fármacos, sensores, biomateriais injetáveis e outros que atendam os requisitos da moderna nanobiotechnology [2-4]).

Sistemas líquidos ou pastosos podem ser obtidos a partir da formação de dispersões de micro/nanopartículas pré formadas de hidrogel, para uso como biomateriais injetáveis empregando técnicas minimamente invasivas, isto é, inserção do implante com uso de seringas e métodos laparoscópicos. Outras vantagens do uso de sistemas coloidais referem-se à melhoria da adesão do material de implante ao tecido hospedeiro devido ao aumento da área superficial, bem como a possibilidade de encapsulação de substâncias ativas e/ou células.

Além disso, o emprego visando o reparo do tecido segundo princípios da engenharia de tecidos, é necessário que o hidrogel seja um material bioreabsorvível, que mimetize o comportamento da matriz acelarular do tecido em questão, constituindo-se em ambiente que permita o metabolismo e proliferação das células que promoverão o crescimento do tecido para o reparo da lesão.

Neste contexto, a literatura apresenta alguns trabalhos interessantes que podem ser tomados como referência para o estudo e desenvolvimento de hidrogéis a partir de polímeros naturais tais como o ácido hialurônico [5-6]. Hidrogéis de ácido hialurônico (AH) podem ser obtidos através da reticulação de precursores preparados pela modificação do AH com dihidrazida adípica e aldeído.

Micro e/ou nano partículas de hidrogéis de AH podem ser obtidas empregando-se as tecnologias desenvolvidas para a obtenção de microesferas, sendo as mais utilizadas as técnicas de evaporação de solvente e extração. Em ambos os casos, é necessário o preparo de uma emulsão onde a fase descontínua é constituída de microgotas de uma solução do polímero e a(s) substância(s) ativas a serem incorporadas.

A fase contínua deve ser escolhida de forma a garantir a homogeneidade na dispersão das gotas, bem como ser passível de remoção por evaporação ou extração. Microesferas de hialuronato de sódio (HNa) foram desenvolvidas por Kubo em 2005, através da emulsificação, água em óleo (A/O) e reticulação empregando o sistema dihidrazida adípica (ADH) e carbodiimida 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) (EDCI) [7].

Assim sendo, este trabalho apresenta um estudo sobre a obtenção e caracterização de micro/nanohidrogéis de hialuronato de sódio (HNa) visando o emprego como biomateriais.

Materiais e Métodos

Obtenção dos micro/nanohidrogéis de HNa

Micro/nanohidrogéis de hialuronato de sódio (HNa) foram obtidos empregando-se a técnica de emulsão água em óleo (A/O), para a formação das esferas a partir da reticulação do HNa com dihidrazida adípica (ADH) e carbodiimida 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) (EDCI) em meio ácido. A emulsão A/O foi formada pela

homogeneização de 100 ml de solução aquosa de HNa e ADH em 400 ml de óleo mineral, empregando Span 80 como emulsificante (5 ml). A solução inicial foi agitada a 1000 rpm durante 30 minutos, utilizando agitador de pá dentada e, em seguida foi adicionado lentamente a quantidade pré determinada de carbodiimida 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) (EDCI), dissolvidos em água destilada, e a emulsão agitada por mais 30 minutos. A reticulação foi iniciada com a adição de HCl 0,1N (até pH = 4,5 ± 0,5) e a reação química, à temperatura ambiente, ocorreu durante 48 horas.

Após 48 horas, foi adicionado álcool isopropílico (IPA) sob agitação vigorosa. A fase aquosa contendo as microesferas foi separada do óleo mineral utilizando-se um funil de separação. As microesferas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as microesferas foram lavadas três vezes com IPA. Após a lavagem final, as microesferas foram resuspensas em água, congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas. O valor da relação molar de HNa/ADH empregado foi 2,5 e os valores de concentração da solução aquosa de HNa empregados foram 0,5 e 2,0 % (p/p).

Caracterização dos micro/nanohidrogéis de HNa

Intumescimento em água

O grau de intumescimento, expresso em termos da quantidade de água absorvida nas micro/nanoesferas de HNa foi determinado por pesagem, partindo de uma amostra de partículas secas, que foi previamente pesada e submetida ao intumescimento em água pela adição gota a gota de água até que fosse observado um excesso de água não adsorvida pelas partículas. O grau de intumescimento foi calculado através da equação 1 abaixo, como a média para 06 determinações, sendo GI = grau de intumescimento (%), Mi = massa de amostra intumescida e Ms = massa de amostra seca.

$$GI = (M_i / M_s) \times 100 \quad (1)$$

Análise morfológica – MO, MEV e TEM

Para a observação das partículas ao microscópio ótico foi utilizado um equipamento LEICA DML com câmera acoplada. Uma gota da suspensão aquosa contendo as partículas era depositada sobre uma lâmina de vidro e espalhada com o auxílio de outra lâmina.

Para a observação das partículas ao microscópio eletrônico foi utilizado um equipamento LEO modelo 440i. Amostra de partículas secas (desidratadas com IPA) ou liofilizadas eram fixadas ao suporte metálico empregando uma fita adesiva dupla face condutora e em seguida era feito o recobrimento com ouro-paládio empregando um Sputter Coater POLARON SC7620..

Análise das partículas por microscopia de transmissão foi realizado empregando um microscópio Carl Zeiss, CEM 902, equipado com filtro de energia Casting-Henry-Ottensmeyer, sendo as imagens adquiridas através de câmera CCD – Proscan. Para o

preparo da amostra, uma gota da dispersão de partículas era depositada sobre suporte (tela de cobre – 200 mesh, recoberta com filme de colódio), e deixada em repouso durante 5 min, após o que era removido o excesso da dispersão e realizado o coramento da amostra, pela deposição de uma gota de acetato de uranila (1% p/p) e manutenção de 1 min sob repouso.

Tamanho distribuição de tamanhos das partículas

A determinação da distribuição de tamanhos das partículas em dispersão aquosa (0,1% (p/p)) foi determinada por espalhamento de luz laser He-Ne (QLS), empregando um equipamento (Malvern Autosizer 4700 ($\lambda=633\text{nm}$) com detector posicionado a 90° em relação ao feixe de luz incidente.

Comportamento reológico de dispersão aquosa das partículas

As propriedades reológicas do HNa em solução aquosa e das partículas de HNa dispersas em água foram determinadas empregando um reômetro (Haake CV 20N) equipado com banho termostático e com módulo de placas paralelas oscilantes. Para a determinação da viscosidade e viscoelasticidade, foram utilizados o método dinâmico de cisalhamento permanente e o método dinâmico de cisalhamento oscilatório para a determinação da componente elástica (G'), componente viscosa (G'') e a viscosidade (η).

Resultados

A partir dos experimentos realizados, foram obtidas amostras de hidrogéis particulados, cujas partículas quando intumescidas em água, apresentaram-se com formato esférico, com tamanhos variando na faixa de 200 nm a < 50 μm , conforme mostram os resultados apresentados a seguir.

Os valores de grau de intumescimento em água das partículas de hidrogéis obtidos a partir das diferentes condições testadas variaram tendo sido determinado o valor de GI = (760 ± 50) % e GI = (273 ± 20) respectivamente para amostras obtidas empregando-se soluções aquosas de HNa 0,5 e 2,0 % (p/p). Observa-se que os hidrogéis obtidos apresentam elevados valores de grau de intumescimento, sendo que o aumento da concentração de HNa na solução de partida resulta em partículas de hidrogéis com menor capacidade de intumescimento, provavelmente porque as partículas obtidas são menos porosas.

As figuras 3 e 4 apresentam a morfologia das partículas de hidrogéis em estudo.

Observa-se na Fig. 3.1.a que foram formadas partículas esféricas quando suspensas em água, não tendo sido evidenciado diferenças no formato das partículas em função da diferença na concentração de

HNa. Já, para o caso das partículas de hidrogel obtidas empregando-se solução HNa 2,0%, foi possível observar ao MEV o aspecto esférico das mesmas, bem como a larga distribuição de tamanhos das esferas do hidrogel obtido (Fig. 3.1.b).

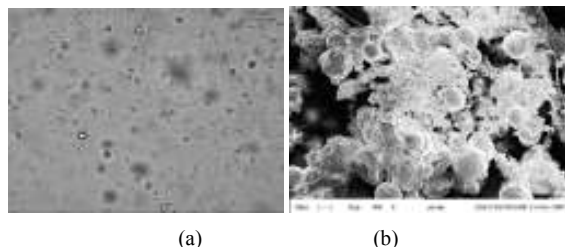


Figura 3.1 – Micrografia obtidas por (a) MO e (b) MEV das partículas de HNa reticuladas por ADH.

Para a visualização das nanoesferas obtidas foi empregado análise por microscopia de transmissão. As imagens das figuras 3.2 a-b comprovam a presença de tais nanoesferas nas amostras obtidas para as diferentes condições de preparo dos hidrogéis de HNa reticulado com ADH. Observa-se a presença de partículas esféricas com diâmetros na faixa de 200 – 500 nm.

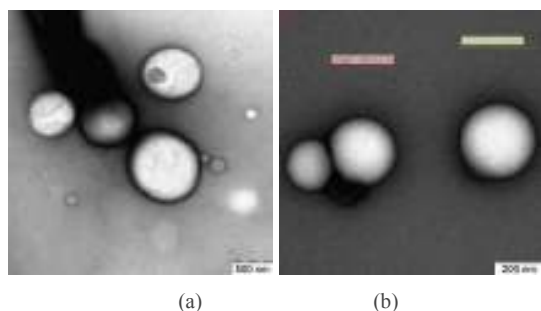


Figura 3.2: Imagem das partículas de HNa liofilizadas, observadas por TEM. Concentração HNa inicial (a) 0,5% e (b) 2,0%.

Tais resultados são concordantes com os resultados verificados pela técnica de espalhamento de luz laser, já que considerando-se a determinação do diâmetro a partir da análise de intensidade de espalhamento foram determinados valores de diâmetros médios de 325 nm e 313 nm respectivamente para partículas obtidas a partir de solução HNa 0,5 % e 2,0 % (p/p).

A avaliação do comportamento reológico do hidrogel de HNa foi realizado tendo em vista que a possibilidade de aplicação destes como biomateriais injetáveis. Tal avaliação permite uma avaliação quantitativa das respostas elástica e viscosa do material quando submetido a esforço cisalhante, o que ocorre quando o material é injetado empregando seringas ou dispositivos similares.

A figura 3.3 apresenta as curvas de viscosidade (η), módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') de amostras de HNa em solução aquosa (1,0 %

p/p) e de amostras de dispersões aquosas de nanopartículas de HNa (1,0 % p/p), obtidas partindo-se de soluções HNa 0,5 % (p/p) e 2,0 % (p/p).

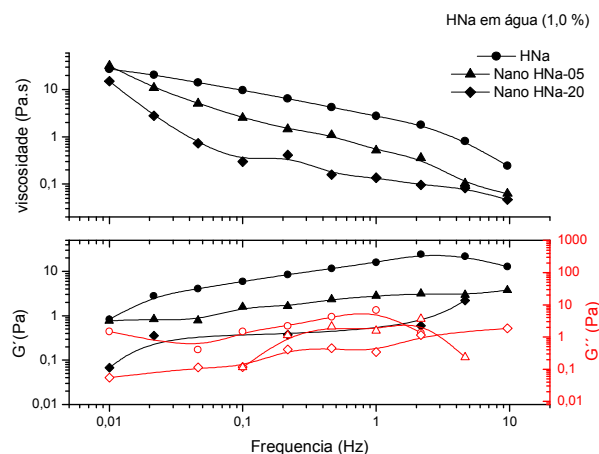


Figura 3.3: Curvas de viscosidade, módulo elástico (G') e módulo de perda (G'') para solução aquosa de HNa e dispersões de nanopartículas de HNa obtidas a partir de concentrações de HNa 0,5 % (p/p) e 2,0 % (p/p).

Observa-se que a viscosidade das dispersões aquosas de nanopartículas de HNa é menor do que a viscosidade de solução aquosa do HNa para mesma concentração, o que pode viabilizar o aumento da concentração de HNa em uma situação clínica que envolva a injeção do biomaterial por exemplo. Além disso, observa-se que as partículas que apresentaram menor teor de intumescimento em água, isto é, aquelas que provavelmente são menos porosas apresentam menor valor de viscosidade quando dispersas em água em comparação às partículas que apresentaram maior teor de intumescimento.

Ainda em relação ao comportamento reológico foi possível observar que as amostras em estudo apresentaram comportamento viscoelástico, sendo que a viscoelasticidade do material varia em função das características estruturais das partículas. Quanto maior a capacidade de intumescimento em água das partículas, maior a viscoelasticidade destas e, o que mais uma vez nos leva a acreditar que estas sejam mais porosas.

O estudo do comportamento reológico de micro e nano hidrogéis de HNa deve ter continuidade para melhor compreensão da relação entre as características estruturais destas partículas e suas propriedades reológicas.

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que é viável a obtenção de hidrogéis de hialuronato de sódio, na forma de micro/nano esferas, a partir da reticulação do HNa com ADH/EDCI em emulsão água em óleo. As micro/nanoesferas de HNa assim obtidas apresentam elevada capacidade de intumescimento em água e em consequência deformam-

se facilmente, permitindo a formação de filmes do polímero a partir da deposição e secagem das partículas.

Em função das características apresentadas pelos micro/nanohidrogéis de HNa, estes apresentam grande potencialidade para emprego como biomateriais injetáveis.

Agradecimentos

Ao CNPq (processo 151207/2007-0) e FAPESP (processo 2005/04484-6) pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] Wichterle, O., e Lim, D.(1960), “Hydrophilic gels for biological use”. *Nature*, v. 8, 185-117.
- [2] Jiang, B., Hu, L., Gao, C. and Shen, J. (2006). “Crosslinked polysaccharide nanocapsules: preparation and drug release properties”, *Acta Biomaterialia*, v.2, 9-18.
- [3] Shu, X.Z., Ahmad, S., Liu, Y. and Prestwich, G.D. (2006). “Synthesis and evaluation of injectable, *in situ* crosslinkable synthetic extracellular matrices for tissue engineering”. *Journal of Biomedical Materials Research*, 79A: 902-912.
- [4] Krauland, A.H. and Alonso, M.J. (2007). Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system, *International Journal of Pharmaceutics*, in press (available online at www.sciencedirect.com)
- [5] Hahn, S.K., Kim, J.S. and Shimobouji, T. (2007). “Injectable hyaluronic acid microgels for controlled release formulation of erythropoietin”, *Journal of Biomedical Materials Research* 80A, 916-924.
- [6] Ito, T., Fraser, I.P., Yeo, Y., Highley, C.B., Bellas, E. and Kohane, D.S. (2007). “Anti-inflammatory function of an *in situ* cross-linkable conjugate hydrogel of hyaluronic acid and dexamethasone”, *Biomaterials*, v.28, 1778-1786.
- [7] Kubo, T. M. O. (2005). “Preparação e caracterização de micropartículas de hialuronato de sódio para encapsulação e liberação controlada de proteínas para aplicação nasal”, dissertação de mestrado, FEQ/UNICAMP, Campinas.
- [8] Ogrodowski, C. S.. (2006). “Produção de ácido hialurônico por *streptococcus*: Estudo da Fermentação e Caracterização do Produto”, tese de doutorado, FEQ/UNICAMP, Campinas.