

## FOTOPOLIMERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE ÁCIDO HIALURÓNICO

Stacy Duarte<sup>1</sup>, Rúben Pereira<sup>2</sup>, Carlos Campos<sup>3</sup> e Daniela C. Vaz<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mestranda, Engenharia Biomédica e Biofísica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa

<sup>2</sup> Centro para o Desenvolvimento Rápido e sustentado de produto, IPLeiria; Instituto de Engenharia Biomédica e Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto; [ruben.pereira@ineb.up.pt](mailto:ruben.pereira@ineb.up.pt)

<sup>3</sup> Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Leiria; [carlos.campos@ipleiria.pt](mailto:carlos.campos@ipleiria.pt)

<sup>4</sup> Unidade de Investigação em Saúde (UIS), Escola Superior de Saúde de Leiria (ESSLei-IPL) e Centro de Química de Coimbra, Departamento de Química, Universidade de Coimbra [dvaz@uc.pt](mailto:dvaz@uc.pt)

**PALAVRAS CHAVE:** Ácido hialurónico, Fotopolimerização, Hidrogel, Iota-carragenina, IPN, semi-IPN

**RESUMO:** O ácido hialurónico (HA) é um polissacarídeo amplamente presente no organismo humano e constitui um material com potencial para ser incorporado em hidrogéis direcionados para aplicações biomédicas. No entanto, as fracas propriedades mecânicas, rápida degradação e libertação *in vivo* do HA não reticulado solúvel limita muitas aplicações clínicas diretas. Deste modo, com vista melhorar as suas características materiais procedemos à modificação química do HA com anidrido metacrílico (MA), com formação de ácido hialurónico metacrilado (MeHA), com propriedades fotopolimerizáveis, combinado ainda na presença e ausência de agente gelificante extra, tal como o polissacarídeo natural iota-carragenina. O HA utilizado foi caracterizado através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e de dicroísmo circular (CD). Os hidrogéis produzidos foram analisados via testes de absorção de água e de degradação em meio aquoso, bem como através de análise mecânica dinâmica (DMA) à compressão. O estudo conduzido permitiu verificar que, enquanto os biofilmes de HA se mostraram quebradiços e com fracas propriedades mecânicas, o MeHA não só foi capaz de formar hidrogéis, por fotopolimerização, como a adição do iota-carragenina à formulação, possibilitou a formação de IPNs (Interpenetrating Polymer Networks) e de semi-IPNs com melhores propriedades físicas e mecânicas.

### 1 INTRODUÇÃO

Polissacarídeos naturais tais como o ácido hialurónico (HA) têm sido extensivamente estudados para fins biomédicos [1]. O HA é um copolímero glicosaminoglicano linear hidrofílico carregado negativamente, composto por unidades dissacarídeo repetidas de ácido D-glucorónico e N-acetil-D-glucosamina associadas através de ligações O-glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  e  $\beta(1\rightarrow3)$  (Figura 1). As fracas propriedades mecânicas apresentadas pelo HA não reticulado solúvel podem ser ultrapassadas por modificação química e reticulação, pelo que a formação de hidrogéis tem sido

relatada como uma alternativa funcional [2]. A modificação de HA pode ser conseguida através de derivatização covalente dos grupos hidroxilo (-OH) do polímero. Os derivados de HA resultantes apresentam geralmente propriedades físico-químicas significativamente diferentes do polímero nativo, mas a maioria continua a ser biocompatível e biodegradável [3]. Assim, procedeu-se à modificação química dos grupos hidroxilo do HA com produção de HA metacrilado (MeHA), com propriedades fotopolimerizáveis.

## 2 HA E MEHA

As soluções de ácido hialurônico (HA) (Sigma-Aldrich) foram preparadas em água Milli-Q (0,054  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e analisadas por espectroscopia de absorção de UV-Vis, dicroísmo circular (CD), ressonância magnética nuclear unidimensional à frequência de próton (1D  $^1\text{H}$ -RMN) e por calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

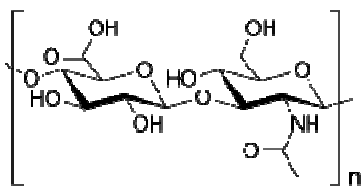


Fig. 1 Representação das unidades dissacarídeo repetidas presentes no ácido hialurônico (HA), compostas por ácido D-glucorónico e N-acetil-D-glucosamina (unidade detentora do grupo cromóforo amida (-NHCO-), covalentemente ligadas por ligações O-glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  e  $\beta(1\rightarrow3)$ .

A análise espectroscópica de absorção UV-visível e por CD do HA, no ultravioleta (UV) longínquo, com vista à avaliação do ambiente conformacional do cromóforo amida (-NHCO-) da unidade de N-acetil-D-glucosamina do HA (Fig. 1), mostrou que o polímero apresentava a conformação prevista a pH 7.4 [4]. Adicionalmente, o espectro 1D  $^1\text{H}$  RMN adquirido permitiu identificar os sinais característicos dos prótons metilo (-CH<sub>3</sub>) do grupo acetilo (HAc, CH<sub>3</sub>CO-) da unidade de N-acetil-D-glucosamina (2,50 ppm), bem como os sinais localizados entre 3,84 ppm e 4,30 ppm, atribuídos aos restantes prótons das unidades de ácido D-glucorónico e N-acetil glucosamina (Figura 1.A), em concordância com estudos anteriores [4, 5].

Adicionalmente, a análise térmica por calorimetria de varrimento (DSC) conduziu à obtenção de perfil endotérmico com ponto de inflexão (temperatura de fusão) à temperatura de  $104,0 \pm 7,6$  °C e variação de entalpia de fusão de  $305,93 \pm 22,75$  J/g, de

acordo com o reportado previamente por Vasi et al. [5].

A modificação do HA foi efetuada através da adição lenta e gradual de anidrido metacrílico (MA), sob agitação contínua, com permanente ajuste do valor de pH a 8.0. A solução de MeHA (ácido hialurónico metacrilado) formada foi sujeita a diluição e diálise contra membrana porosa (< 8 KDa), seguida de análise por 1D  $^1\text{H}$  RMN. O espectro de  $^1\text{H}$  RMN permitiu confirmar a formação de MeHA associada à identificação de novos sinais a 6,22 ppm e 6,64 ppm, atribuídos aos prótons vinilo do grupo metacrilado presente no MeHA [6].

## 3 MEHA E IOTA-CARRAGENINA

A “carragenina” representa a designação genérica de polissacarídeos produzidos por algas marinhas vermelhas e é um polímero largamente utilizado na indústria alimentar e com enorme potencial no campo das aplicações biomédicas [7]. As carrageninas são galactanos sulfatados lineares hidrofílicos compostos por unidades dissacarídeas de  $\beta$ -D-galactopirranose e  $\alpha$ -D-galactopirranose. A iota-carragenina, sintetizada por algas vermelhas *Solieria filiformis*, forma géis após arrefecer até à sua temperatura de transição espiral-hélice (45°C em água) [7], pelo que a associação de iota-carragenina ao MeHA produzido teve intuito gelificante.

## 4 PREPARAÇÃO DE BIOFILMES

Os biofilmes de MeHA foram produzidos por *solvent-casting* com secagem a 40°C durante 24 horas. Prepararam-se cinco formulações (Tabela 1) de hidrogéis de MeHA e iota-carragenina, com 9 mm de diâmetro e 3 mm de altura, para os testes de absorção e de degradação e com uma altura de 5 mm para os ensaios de análise mecânica dinâmica (DMA). O fotoiniciador não iónico hidrossolúvel VA-086 (Wako Pure Chemicals) foi adicionado a todas as formulações.

## 5 FOTOPOLIMERIZAÇÃO

Polímeros hidrofílicos com grupos polimerizáveis, como o acrilato ou o metacrilato, são capazes de formar hidrogéis quando expostos a luz UV. Assim, a indução de fotopolimerização por UV, processo geralmente rápido e minimamente invasivo, constitui uma abordagem alternativa para a formação de hidrogéis reticulados quimicamente e *in situ*, formados à temperatura ambiente ou corporal, e sem a utilização de solventes orgânicos. Como tal, a fotopolimerização tem vindo a ser muito utilizada na preparação de hidrogéis, incluindo IPNs (*interpenetrating polymer networks*), com potencial aplicação na área biomédica [8]. Os radicais que iniciam a polimerização são gerados quando os fotoiniciadores (VA-086) sofrem clivagem da ligação hemolítica após exposição à luz UV/Visível. Deste modo, e após fotopolimerização por ação da luz UV, foi possível obter hidrogéis reticulados de MeHA, para as formulações III, IV e V (Tabela 1).

Tab. 1 Formulações de biofilmes de Iota-carragenina e/ou de MeHA testadas.

Formulação	Componentes	UV	KCl
<b>I-controlo</b>	Iota-carragenina+VA		
<b>II-controlo</b>	Iota-carragenina+VA		X
<b>III-controlo</b>	MeHA + VA	X	
<b>IV-semi-IPN</b>	Iota-carragenina+MeHA+VA	X	
<b>V-IPN</b>	Iota-carragenina+MeHA+VA	X	X

HA- ácido hialurónico; MeHA, ácido hialurónico metacrilado; VA, fotoiniciador VA-086.

## 6 RETICULAÇÃO

O iota-carragenina sofre reticulação tanto na presença de iões monovalentes como por ação de iões divalentes [7]. Neste estudo, a influência do efeito gelificante do iota-carragenina reticulado nas propriedades físicas e mecânicas de biofilmes de MeHA, foi testada através da preparação das formulações I, II, IV e V (Tabela 1), na ausência (I e IV) e presença (II e V) deste polissacarídeo na formulação (Tabela 1). O

passo indutor de reticulação do iota-carragenina consistiu na submissão das preparações a solução de cloreto de potássio (KCl) a 1,5 % m/V, durante 15 minutos. Deste modo, enquanto à formulação IV (Tabela 1) conduziu à formação de uma semi-IPN (rede polimérica de MeHA associada a iota-carragenina com efeito gelificante), a formulação V conduziu à formação de uma IPN (formada pela coexistência e interligação das malhas poliméricas de MeHA fotopolimerizado e de iota-carragenina reticulado).

## 7 PROPRIEDADES DOS BIOFILMES

O teste de absorção permitiu verificar que os hidrogéis I de “iota-carragenina” (Figura 1) foram os que apresentaram maior absorção de água, seguidos dos hidrogéis II, IV, III e V. O teste de degradação permitiu concluir que após 6 dias, os hidrogéis fotopolimerizados e os hidrogéis de iota carragenina reticulados com iões potássio mantiveram a sua estrutura íntegra, aspeto que associado à sua menor capacidade de absorção de água apontou para uma rede mais densa e resistente. Em contrapartida, os hidrogéis compostos apenas por iota-carragenina não reticulado (I-controlo) apresentaram-se mais frágeis e quebradiços, resultado que associado à sua menor capacidade de absorção de água, comprovou que a sua rede menos densa resultou num hidrogel menos resistente.



Fig. 1 Hidrogel V-IPN, composto por MeHA fotopolimerizado e por iota-carragenina reticulado (A) e hidrogel I-controlo “iota-carragenina” (B) após 8 h de absorção em meio aquoso.

Os ensaios de análise mecânica dinâmica (DMA) foram apenas efetuados para as

formulações III, IV e V, em que o MeHA fotopolimerizado forma malha polimérica, com consistência e propriedades adaptáveis à realização de ensaios mecânicos. Os ensaios realizados, bem como, os valores de módulo de elasticidade (módulo de Young) obtidos permitiram verificar que tanto a formulação IV-semi-IPN, em que um dos componentes, o MeHA se encontra reticulado, como a formulação em que ambos os componentes formam redes poliméricas (V-IPN) apresentam melhores propriedades mecânicas a todas as temperaturas e maior módulo de elasticidade à compressão tanto a 25 °C como a 37 °C, relativamente à formulação simples III-controlo, composta por MeHA fotopolimerizado (Tabela 2).

Tab. 2 - Valores de módulo de elasticidade/Young (Y, em Pa) obtidos nos ensaios de DMA.

Formulação	Y <sub>25 °C</sub> (Pa)	Y <sub>37 °C</sub> (Pa)
III-Controlo	4170,7 ± 176,9	4294,0 ± 114,7
IV-Semi-IPN	13160,0 ± 874,3	13383,3 ± 735,0
V-IPN	9868,3 ± 2896,3	10232,3 ± 2892,3

Adicionalmente, e embora com pequenas diferenças entre os valores de módulo de elasticidade/Young, exibidos pelos hidrogéis de MeHA e iota-carragenina nas composições IPN e semi-IPN, os hidrogéis semi-IPN apresentam maiores valores de módulo de elasticidade/Young e maior resistência à compressão (Tabela 2) do que os hidrogéis IPN. O processo de reticulação do iota-carragenina, pelos iões potássio (K<sup>+</sup>), pode por um lado fornecer maior estabilidade química e física ao polímero, mas por outro, diminuir a disponibilidade molecular das cadeias de iota-carragenina para interagir e participar na rede interpenetrada interna composta pelas malhas poliméricas formadas pelos dois polissacarídeos (MeHA e iota-carragenina).

## 8 CONCLUSÕES

A caracterização química da solução de HA mostrou que o HA utilizado apresenta

propriedades nativas, de acordo com os resultados de CD, UV-Vis, RMN e análise térmica por calorimetria de varrimento (DSC) [4-6].

A análise dos filmes de HA produzidos mostrou que apenas o MeHA, posteriormente reticulado por ação de luz UV (fotopolimerização), se mostrou capaz de formar um hidrogel. A adição do polissacarídeo natural iota-carragenina ao MeHA permitiu ainda a formação de IPNs e de semi-IPNs que apresentaram melhores propriedades físicas e mecânicas, avaliadas através dos ensaios de absorção, de degradação e de análise dinâmica mecânica (DMA) à compressão, tanto a 25 °C como a 37 °C.

## REFERÊNCIAS

- [1] C.B. Highley, G.D. Prestwich, J.A. Burdick. *Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications*. Curr Opin Biotechnol 40, 35-40, 2016.
- [2] H. Lin, J. Liu, K. Zhang, Y. Fan, X. Zhang. *Dynamic mechanical and swelling properties of maleated hyaluronic acid hydrogels*. Carbohydrate Polymers 123, 381-389, 2015.
- [3] C.E. Schanté, G. Zuber, C. Herlin, T.F. Vandamme. *Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications*. Carbohydrate Polymers 85 469-489, 2011.
- [4] M.K. Cowman, S. Matsuoka. *Experimental approaches to hyaluronan structure*. Carbohydrate Research 340, 791-809, 2005.
- [5] A.M. Vasi, M.I. Popa, M. Butnaru, G. Dodi, L. Verestiuc. *Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications*. Materials Science and Engineering C 38, 177-185, 2014.
- [6] S.S. Prado, J.M. Weaver, B.J. Love. *Gelation of photopolymerized hyaluronic acid grafted with glycidyl methacrylate*. Materials Science and Engineering C 31 1767-1771, 2011.
- [7] G.A. Paula, N.M.B. Benevides, A.P. Cunha, A.V. Oliveira, A.M.B. Pinto, J.P.S. Morais, H.M.C. Azeredo. *Development and characterization of edible films from mixtures of k-carrageenan, i-carrageenan, and alginate*. Food Hydrocolloids 47, 140-145, 2015.
- [8] P. Matricardi, C. Di Meo, T. Coviello, W.E. Hennink, F. Alhaique. *Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews 65 1172-1187, 2013.