

HIDROGÉIS HÍBRIDOS DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO OBTIDOS POR IMPRESSÃO 3D

Palavras-chave: biomateriais, óxido nítrico, impressão 3D

Giovana B. Romano [IQ-UNICAMP]

Laura C. E. da Silva [IQ-UNICAMP]

Marcelo G. de Oliveira (orientador) [IQ-UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

Este projeto tem como propósito o desenvolvimento de hidrogéis híbridos orgânico-inorgânicos doadores de óxido nítrico (NO) que sejam baseados em poli(2-hidroxietilmetacrilato) (PHEMA), Pluronic® F127 e polisilsesquioxano (PSS) e produzidos por impressão 3D assistida por luz. É esperado que a matriz de PHEMA confira ao hidrogel mucoadesão e resistência à abrasão, enquanto o PSS deverá conferir resistência ao rasgo e à fadiga e o Pluronic® F127 flexibilidade.

O NO é uma importante molécula endógena que atua em diversos processos fisiológicos, incluindo a vasodilatação e a aceleração no processo de cicatrização (DE OLIVEIRA, 2016). Entretanto, em meio aquoso o NO apresenta curto tempo de meia vida, o que motiva o desenvolvimento de novos doadores de NO e de hidrogéis que liberem NO de forma controlada e prolongada. Uma estratégia interessante para tal é fabricar hidrogéis que apresentem microambientes hidrofóbicos (PSS e F127) em sua estrutura

pois a matriz hidrofílica (PHEMA) permite a dissolução de doadores endógenos de NO, como a S-nitrosoglutationa (GSNO), enquanto os nanodomínios hidrofóbicos atuam como barreiras para difusão dos doadores de NO. Além disso, o NO pode se concentrar no interior dos domínios hidrofóbicos, promovendo maior controle da sua liberação (CHAMPEAU et al, 2018).

Neste trabalho foram fabricados inicialmente os precursores híbridos, HEMA-TES e TES-F127-TES, que sofreram hidrólise e condensação em meio ácido para gerar resinas para impressão 3D contendo nanoestruturas de polisilsesquioxano, micelas de Pluronic® F127 e grupos metacrilato capazes de sofrer fotoreticulação. Estas resinas foram utilizadas para fabricar hidrogéis híbridos na forma de discos e *stents* vasculares utilizando a fotoimpressão 3D. A GSNO foi incorporada às peças impressas por meio de sorção seguida de liofilização durante o pós-processamento das peças. Finalmente, a fidelidade de impressão foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura e as cinéticas de liberação de NO foram

determinadas por quimiluminescência. Os resultados obtidos demonstram que estes hidrogéis híbridos representam novas plataformas de entrega controlada de NO.

METODOLOGIA:

1. Síntese dos precursores híbridos HEMA-TES e TES-F127-TES

A síntese dos monômeros híbridos HEMA-TES e TES-F127-TES foi realizada a partir da reação de 3-isocianatopropil trietóxisilano (IPTES), com 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) ou com Pluronic® F127, conforme descrito nas Figuras 1 e 2. Para isso, HEMA, Pluronic® F127 e IPTES foram purgados separadamente com nitrogênio por 40 min. Em seguida, o IPTES foi transferido em quantidades estequiométricas para os frascos purgados e selados, contendo HEMA ou F127 e os sistemas foram mantidos a 70 °C sob agitação magnética por 4h.

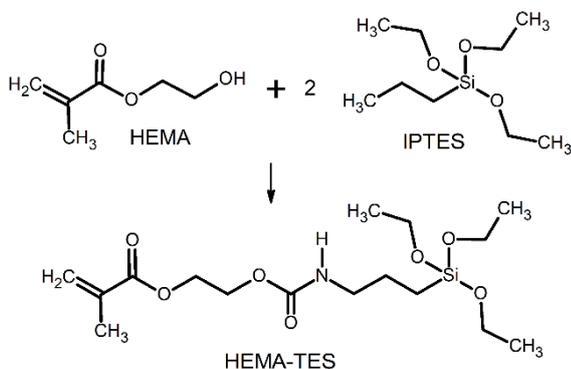


Figura 1. Síntese de HEMA-TES.

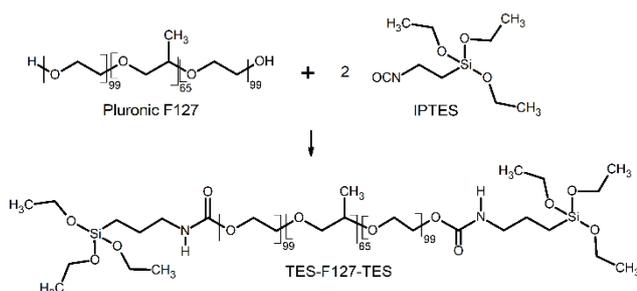


Figura 2. Síntese de TES-F127-TES.

2. Preparação das resinas e fotoimpressão 3D

Inicialmente, foi realizada a hidrólise e condensação dos grupos trietóxisilil das moléculas de HEMA-TES e TES-F127-TES, abrindo-se os frascos ao ar e adicionando uma solução de ácido clorídrico (pH =2). Em meio ácido, os grupos etóxi são removidos das terminações trietóxisilil dando origem a grupos silanol que se condensam, formando polisilsesquioxano. A evolução de etanol na forma de bolhas é um marcador da reação de condensação e, ao cessar o borbulhamento, foi adicionado ao sistema HEMA e/ou F127 para completar as composições desejadas para cada resina, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Composição das resinas híbridas.

Amostra	Composição (%m/m)			
	HEMA-TES	Água*	F127	HEMA
HEMA-PSS	23	25	-	51
HEMA-PSS-F127	22	25	15	40
HEMA-PSS-F127-DMA	22	25	15	40

* Solução de HCl 2% m/m

Na resina HEMA-PSS-F127 os precursores híbridos HEMA-TES e TES-F127-TES foram misturados antes da adição de água. Já na resina HEMA-PSS-F127-DMA foi utilizado o Pluronic® F127 dimetacrilato, produzido conforme a reação descrita por (VAN HOVE et al, 2013), e adicionado após o término da reação de hidrólise e condensação de HEMA-TES.

Para a fotoimpressão 3D, um sistema fotoiniciador/ fotobloqueador (FI/FB) composto de Irgacure® 819 (FI) e Tartrazina (FB) na proporção molar de 100:1 FI:FB foi adicionado na concentração de 1 %m/m.

imediatamente antes da resina ser colocada na impressora 3D/DLP *Photon S (Anycubic)*. Os objetos foram impressos em camadas de 50 μ , com 12 s de exposição em cada camada. Após o término da impressão, foi realizada a lavagem em isopropanol, seguida da remoção dos suportes de impressão. Em seguida, os objetos impressos foram submetidos a pós-cura em luz UV de 365 nm e 405 nm por 4 min.

3. Incorporação da GSNO

Soluções de GSNO de concentrações 5, 10 e 20 mM foram preparadas por dissolução de GSNO em água MilliQ. Os discos impressos foram imersos nas soluções de GSNO e mantidos à temperatura ambiente protegidos de luz por 4 h.

4. Caracterização morfológica

A superfície dos *stents* impressos foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um microscópio Quanta FEG 250 (*Thermo Scientific*) operando a 10 kV.

5. Cinéticas de liberação de NO em tempo real

Os perfis de liberação de NO dos hidrogéis recém-carregados com GSNO foram determinados em tempo real por quimiluminescência em um analisador de NO (Sievers 208i, *GE Analytical instruments*). As amostras dos hidrogéis foram inseridas no frasco de reação contendo 10 mL de tampão PBS 0,01M (pH 7,4). N₂ foi utilizado como gás de arraste (7,0 Torr) e O₂, na pressão de 6,0 psi foi utilizado para gerar O₃ na câmara de reação. O instrumento foi previamente calibrado utilizando o sistema NaI/NaNO₂.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A Figura 3 ilustra os discos e *stents* que foram impressos utilizando a impressora 3D/DLP comercial *Photon S (Anycubic)*. Após a otimização dos parâmetros de impressão, pode-se notar que as peças impressas apresentaram uma boa resolução, sugerindo fidelidade ao modelo computacional. A coloração amarela observada é devida ao FB utilizado e reduz significativamente de intensidade após a etapa de pós-cura, devido ao consumo do FB.

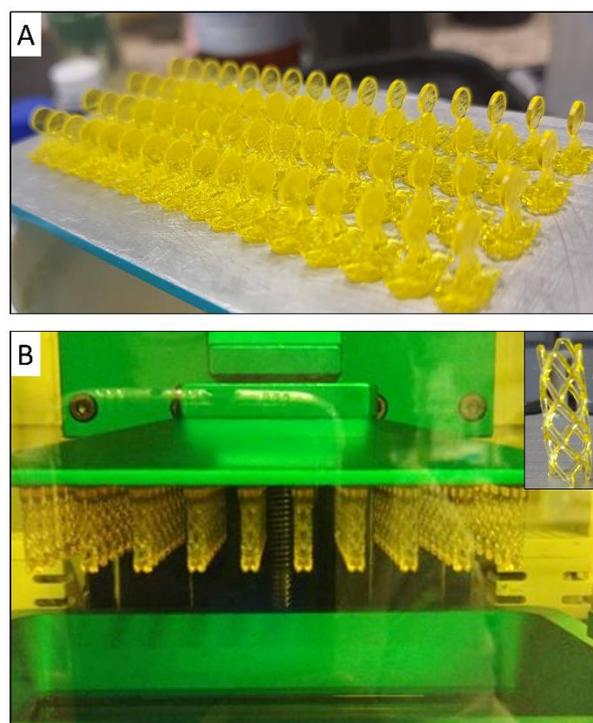


Figura 3. Peças de hidrogéis impressas a partir das resinas híbridas de PHEMA-PSS.

As micrografias da superfície dos *stents* fabricados a partir de cada uma das resinas demonstram que o *stent* de HEMA-PSS (Figura 4A,D) apresenta excelente fidelidade de impressão, visto que suas hastes apresentam aproximadamente 155 μ m de espessura, o que é muito próximo dos 150

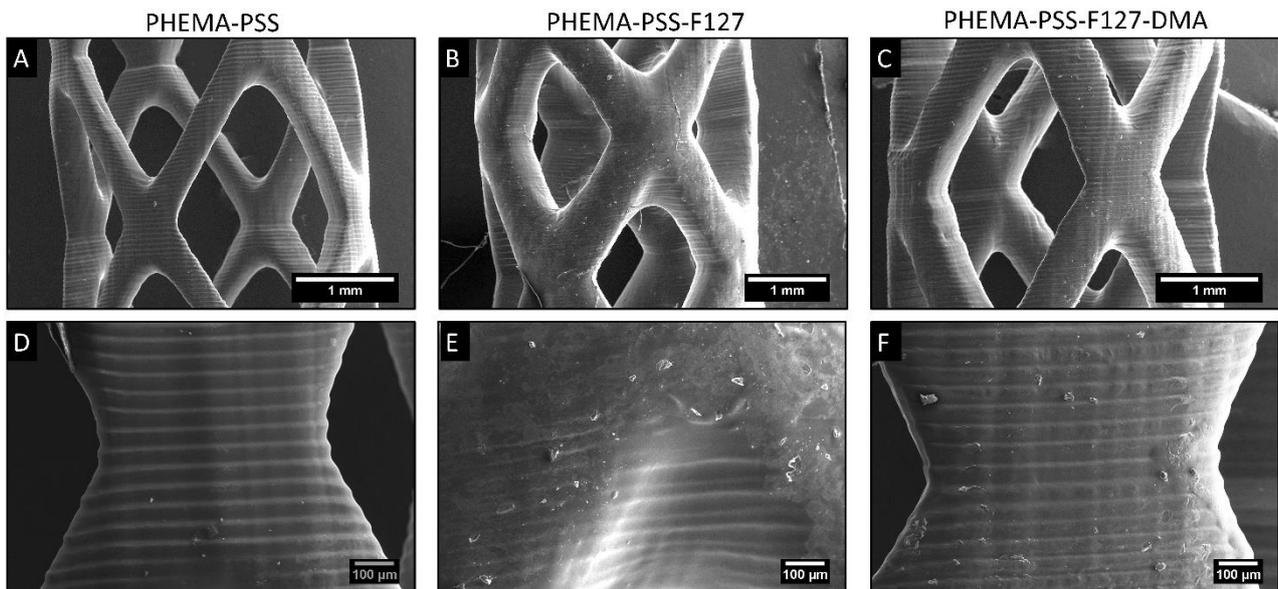


Figura 4. Micrografias de varredura eletrônica de *stents* vasculares obtidos por impressão 3D utilizando as resinas PHEMA-PSS (A e D), PHEMA-PSS-F127 (B e E) e PHEMA-PSS-F127-DMA (C e F).

um previstos pelo modelo computacional. Entretanto, com a adição de TES-F127-TES, apesar de aumentar a flexibilidade do *stent*, há uma redução significativa da fidelidade de impressão o que é observado pela perda de definição das camadas de impressão (Figura 4B,E) e pelo fato das hastes apresentarem aproximadamente 700 μm de espessura.

No entanto, ao substituir TES-F127-TES por F127-DMA, a fidelidade de impressão é parcialmente recuperada, tendo em vista que há boa definição das camadas de impressão (Figura 4F) e a espessura das hastes neste caso é de aproximadamente 550 μm . Dessa forma, o *stent* impresso com a resina PHEMA-PSS-F127-DMA é o que apresenta melhor potencial de aplicação, pois apresenta resolução e fidelidade de impressão superiores a PHEMA-PSS-F127 e flexibilidade comparável a PHEMA-PSS.

Após esta etapa, foi realizada a análise de liberação de NO por quimiluminescência utilizando os discos impressos. A Figura 4A apresenta as curvas de total de NO liberado

em função do tempo para discos obtidos com cada uma das resinas e intumescidos em solução de GSNO 10 mM. É possível observar que PHEMA-PSS apresentou uma taxa de liberação de NO aproximadamente duas vezes maior que as taxas dos demais hidrogéis e não houve diferença estatística entre os discos impressos das resinas contendo Pluronic® F127.

A curva de liberação de NO em tempo real da resina PHEMA-PSS-F127-DMA, apresentada na Figura 4B, demonstra que estes hidrogéis são capazes de sustentar a liberação de NO por longos períodos uma vez que a taxa de liberação atingiu estabilidade após 4 h de análise e que se manteve inalterada por pelo menos 10 h.

Na Figura 4C estão apresentados os valores das taxas de liberação de NO, obtidos do coeficiente angular das curvas de total de NO liberado a partir de discos de PHEMA-PSS-F127-DMA intumescidos em soluções de GSNO com diferentes concentrações (5 mM, 10 mM e 20 mM). É possível verificar que não

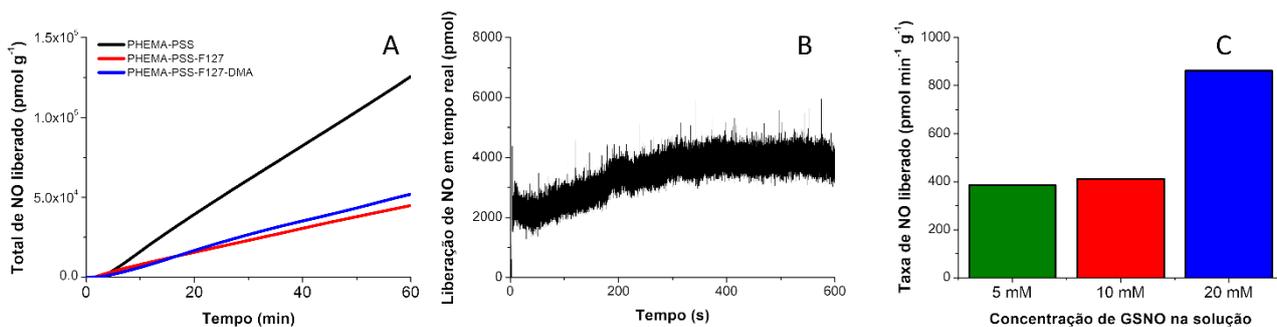


Figura 5. Curvas de liberação de NO. (A) Total de NO liberado por discos das diferentes resinas imersos em soluções de GSNO de 10 mM

há uma relação linear entre a dose de GSNO absorvida e a taxa de liberação de NO resultante, uma vez que discos intumescidos em soluções de GSNO 5 mM e 10 mM apresentam taxas de liberação muito próximas, enquanto discos intumescidos em uma solução de GSNO 20 mM apresentam taxa de liberação significativamente superior.

Possivelmente, isso está atrelado a influência das nanoestruturas sobre a taxa de liberação de NO, visto que os caroços hidrofóbicos de poli(propileno glicol) das micelas de F127 podem atuar como reservatórios de NO, auxiliando no controle e na redução das taxas de liberação de NO (Champeau et. al. 2018).

CONCLUSÕES:

O projeto permitiu a síntese de hidrogéis híbridos que apresentam flexibilidade, em decorrência da adição do Pluronic® F127 às resinas, e uma boa resolução de impressão. Foi possível também obter uma melhor compreensão do comportamento destes hidrogéis no que se refere a liberação de NO por meio da inserção de seus doadores. No entanto, os resultados obtidos sobre a sua liberação são ainda preliminares. Além disso, as resinas

sintetizadas possuem um caráter hidrofílico e, portanto, podem ser biocompatíveis, o que torna possível a sua aplicação em materiais para fins biomédicos.

AGRADECIMENTOS:

Este projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processo FAPESP 2020/16804-5).

BIBLIOGRAFIA:

- CHAMPEAU, M. et al. **Supramolecular poly(acrylic acid)/F127 hydrogel with ydriatiol-controlled nitric oxide release for enhancing wound healing.** *Acta Biomater.* VOL 74, p.1 – 14, 2018.
- de OLIVEIRA MG. **S-Nitrosothiols as Platforms for Topical Nitric Oxide Delivery.** *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.* VOL. 119, p. 49 – 56, 2016.
- VAN HOVE, M. et al. **Microwave-assisted Functionalization of Poly(ethylene glycol) and On-resin Peptides for Use in Chain Polymerizations and Hydrogel Formation.** *JOVE J. Vis. Exp.* VOL 80, p.1 – 15, 2013.