

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOCOMPATIBILIDADE IN VITRO DE MEMBRANAS DE HIDROGEL

Renata Hage Amaral¹, Sizue Ota Rogero¹, Áurea S. Cruz², Ademar Benévolo Lugão¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN- CNEN/SP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária – CEP 05508-000 – São Paulo, SP, Brasil

²Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355 – CEP 01246-902 – São Paulo, SP, Brasil
rhamaral@ipen.br

Resumo. Os hidrogéis estão dentre as matrizes poliméricas mais utilizadas em tecnologia farmacêutica devido a sua vasta aplicação e funcionalidade, principalmente em sistema de liberação de fármacos. Estudo das propriedades físico-química e biocompatibilidade *in vitro* de membranas de hidrogéis de poli(vinil-2-pirrolidona) (PVP) e poli(vinil álcool) (PVA) obtidos pela reticulação por radiação ionizante foram realizados com objetivo de serem utilizados como matrizes para compor um sistema de liberação de fármacos. A caracterização físico-química das membranas foi realizada pelos dos ensaios de fração gel e intumescimento e o de biocompatibilidade *in vitro* pelo ensaio de citotoxicidade. No ensaio de fração gel a diferença do grau de reticulação entre os hidrogéis foi cerca de 10%. O hidrogel de PVP apresentou uma maior porcentagem de intumescimento em relação ao de PVA. Os hidrogéis submetidos ao ensaio de citotoxicidade mostraram-se não tóxicos demonstrando a possibilidade de serem utilizados como matrizes poliméricas para a imobilização de princípios ativos ou fármacos.

Palavras-chave: Sistema de liberação, hidrogel PVA, hidrogel PVP, citotoxicidade

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o maior grupo de materiais usados para fins biomédicos são os polímeros. O polímero para ser considerado um biomaterial deve preencher alguns requisitos como: não-toxicidade, funcionalidade, biocompatibilidade e esterilizável [Rosiak *et al.*, 1995].

Existe um grande interesse na utilização de hidrogéis como matrizes para compor um sistema de liberação controlada de fármacos. Em geral, esta aplicação tem como requisitos principais a utilização de um material biocompatível, resistente a processos de degradação e propriedades mecânicas adequadas. Dentre os vários mecanismos utilizados na incorporação de princípios ativos à hidrogéis destaca-se o intumescimento do hidrogel em solução contendo o princípio ativo e posterior adsorção [Barcellos *et al.*, 2000].

Os hidrogéis de poli(vinil-2-pirrolidona) (PVP) e poli(vinil álcool) (PVA) foram reticulados por meio da radiação ionizante. Este processo apresenta a vantagem de promover a reticulação e esterilização simultânea da matriz polimérica [Miranda *et al.*, 1999].

O objetivo deste trabalho foi o estudo da caracterização físico-química e a avaliação preliminar da biocompatibilidade *in vitro* dos hidrogéis de PVP e PVA para serem utilizados como matrizes poliméricas para compor um sistema de liberação de fármacos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Obtenção das membranas de hidrogel

Foram sintetizadas 2 tipos de membranas: PVP e PVA. A membrana PVP foi obtida a partir de poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) K 90, Kollidon 90F, massa molar média 1000000 – 1500000 proveniente da BASF, em solução aquosa, utilizando o poli (etileno glicol) (PEG) 300 da Oxiteno como plastificante e o ágar da Oxoid como gelificante. A membrana PVA foi

preparada com poli (vinil álcool) (PVA), Celvol E 47/88, grau de hidrólise 87-89%, ponto de fusão de 180°C, temperatura de transição vítrea de 58°C, proveniente da Dermet, em solução aquosa e tendo como agente gelificante o ágar da Oxoid. Os componentes e suas concentrações estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Composição das formulações das membranas PVP e PVA.

MEMBRANA	COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO (%)
PVP	PVP K90	6,0
	PEG 300	1,5
	ÁGAR	0,5
PVA	PVA	8,0
	ÁGAR	1,0

Para síntese da membrana PVP foram misturados primeiramente o PVP K90, o PEG 300 e a água e deixados durante 24 horas em temperatura ambiente. Após este período a mistura foi aquecida até a fervura e adicionou-se o ágar, mantendo-se em aquecimento até a completa dissolução dos componentes. A membrana PVA foi sintetizada a partir da mistura de PVA e água com posterior aquecimento até a dissolução do PVA. Posteriormente foi adicionado o ágar e a fervura manteve-se até dissolução total dos componentes.

As membranas foram preparadas vertendo-se 5mL da solução resfriada a aproximadamente 40°C em moldes circulares de 5cm de diâmetro, as quais, após resfriamento, foram seladas, embaladas adequadamente e enviadas para irradiação em uma fonte de raios gama de Co-60. As membranas PVP foram irradiadas na dose de 25kGy e as membranas PVA na dose de 20kGy.

As amostras de membranas de hidrogel obtidas foram caracterizadas pelos ensaios de fração gel e intumescimento e a avaliação preliminar da biocompatibilidade verificada pelo ensaio *in vitro* de citotoxicidade.

2.2. Ensaio de Fração Gel

Para a realização deste ensaio foi utilizado o extrator de Soxhlet. As amostras de membranas de hidrogel foram secas em estufa na temperatura de 60°C até peso constante. Após a secagem, cada amostra com cerca de 0,15g cada, em triplicata, foi acondicionada em saquinho de tecido *non woven* e colocadas no extrator. A remoção da fração solúvel foi realizada utilizando como solvente a água por 36 horas. Decorrido este tempo as amostras foram novamente secas em estufa na temperatura de 60° C até atingirem peso constante. O cálculo da fração gel foi realizado pela Eq. (1):

$$\% \text{ fração gel} = \frac{mf}{mo} \times 100 \quad (1)$$

Onde: mo = massa inicial desidratada

mf = massa final seca

2.3. Ensaio de Intumescimento

O ensaio de intumescimento foi realizado em tampão fosfato salina (PBS) pH = 5,0. As amostras de membranas de hidrogel foram secas em estufa na temperatura de 60°C até peso constante. Os hidrogéis secos, com cerca de 0,15g cada, em triplicata, foram colocados em 20mL de PBS por um período de 24 horas, sendo verificada a massa a cada hora durante as primeiras 6 horas do ensaio e após 24h. O intumescimento foi calculado utilizando a Eq.(2):

$$\% \text{ Int} = \frac{mf - mo}{mo} \times 100 \quad (2)$$

Onde: mo = massa inicial

mf = massa final

2.4. Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio *in vitro* de citotoxicidade foi realizado utilizando a técnica de Incorporação do Vermelho Neutro seguindo normas internacionais [ISO 10993-5, 1992] e metodologia publicada anteriormente [Rogero *et al.*, 2003].

A norma ISO 10993 contém um guia para avaliação de testes iniciais de biocompatibilidade. Nesta norma, para a seleção apropriada dos testes iniciais de avaliação para cada dispositivo e/ou material e seu tempo de contato, é apresentada uma tabela de orientação. No caso de dispositivos que ficarão em contato com a pele, como é a membrana de hidrogel em estudo, a tabela de orientação recomenda o ensaio *in vitro* de citotoxicidade e ensaios *in vivo* de sensibilização e irritação intracutânea. Estes ensaios *in vivo* deverão ser realizados após a verificação da não citotoxicidade e antes da etapa de incorporação de agentes ativos para completar os testes de biocompatibilidade.

Os ensaios *in vitro* são normalmente efetuados como um teste de triagem inicial na primeira fase da avaliação da biocompatibilidade. A avaliação *in vitro* pode fornecer dados rápidos e financeiramente acessíveis sobre interações biológicas. Entretanto a questão deve ser analisada se o teste *in vitro* mede realmente o que pode ocorrer em ambiente mais complexo do teste *in vivo*. Os testes *in vitro* minimizam o uso de animais em pesquisa, por exemplo, materiais que causam coagulação e que são incompatíveis com células, geralmente não merecem uma avaliação *in vivo*.

As condições de extração devem simular o mais próximo possível as condições em que o dispositivo será normalmente utilizado. Para a preparação dos extratos líquidos do material as condições de extração devem atender as condições clínicas de uso exageradas para definir o potencial toxicológico sem causar mudança significativa como fusão ou derretimento dos pedaços do material ou alteração de sua estrutura química. A concentração de qualquer substância endógena ou estranha no extrato, assim como a quantidade exposta às células em teste depende da área interfacial, volume de extração, pH, solubilidade química, osmolaridade, agitação, temperatura e outros fatores.

Os extratos das amostras e dos controles foram preparados pela imersão dos mesmos em meio mínimo de Eagle (MEM), na proporção de 1cm² de área superficial por mL, durante 24h em temperatura de 37°C. Foram feitas diluições dos extratos obtidos das amostras, dos pellets de PVC (policloreto de vinila) que foram utilizados como controle negativo, e da solução de fenol 0,02% que foi utilizado como controle positivo. Em seguida as diluições foram colocadas em contato com uma cultura de células de tecido conectivo de camundongo da linhagem NCTC clone 929 da ATCC (American Type Culture Collection) distribuídas em 96 poços de uma microplaca.

A toxicidade foi verificada pela viabilidade celular no ensaio pela medida da quantidade do corante vermelho neutro incorporado nas células vivas. A quantificação do corante foi realizada em espectrofotômetro leitora ELISA modelo Sunrise da Tecan, em 540nm e o cálculo da viabilidade celular foi feito em relação ao controle de células no ensaio e considerado 100%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de fração gel pode-se observar que houve uma reticulação adequada dos hidrogéis e os resultados estão apresentados na Tabela 2. A membrana de PVA apresentou porcentagem de fração gel cerca de 10% maior que a membrana de PVP, ou seja, uma reticulação maior. Segundo estudo semelhante, o hidrogel de PVA associado à quitosana carboximetilada irradiado na dose de 20kGy apresentou porcentagem de fração gel cerca de 88% e quando irradiado em doses maiores não mostrou uma diferença significativa no resultado da fração gel. Neste trabalho o resultado de fração gel foi de aproximadamente 84%, sendo bem próximo ao resultado obtido no trabalho relatado em literatura [Zhao *et al.*, 2003].

Tabela 2. Resultados do ensaio de fração gel das membranas PVP e PVA

Membrana	mo (g)	mf(g)	% fração gel
PVP	0,1433	0,1075	73,8 ± 2,4
	0,1490	0,1123	
	0,1267	0,0901	
PVA	0,1309	0,1107	84,4 ± 0,3
	0,1492	0,1253	
	0,1550	0,1310	

No ensaio de intumescimento os resultados obtidos mostraram que tanto o hidrogel de PVP quanto o de PVA possuem uma boa capacidade de intumescimento e na Fig. 1 estão apresentadas as curvas de intumescimento dos hidrogéis estudados. Pode ser verificado que o hidrogel de PVP apresentou intumescimento maior do que o hidrogel de PVA e que em 24h houve uma diferença de 25% na capacidade de intumescimento do PVP em relação ao PVA. Esta diferença deverá ser levada em consideração na eventual utilização de incorporação de um agente ativo pela capacidade de intumescimento da membrana de hidrogel.

Em trabalho publicado na literatura sobre caracterização de hidrogéis de PVP foi verificado a capacidade de intumescimento do hidrogel em relação a diferentes doses de irradiação mostrando que o aumento da dose de irradiação diminui a capacidade de intumescimento do hidrogel [Benamer *et al.*, 2006]. Neste estudo, o hidrogel de PVP irradiado na dose de 25kGy apresentou comportamento semelhante ao obtido por Benamer *et al.*, podendo o hidrogel aumentar cerca de 20 vezes o seu peso inicial.

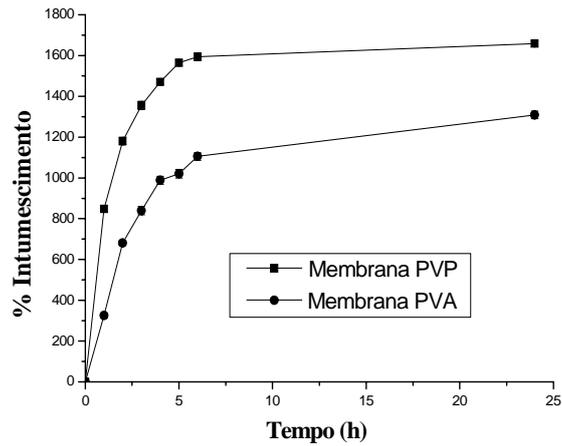


Figura 1. Curvas de intumescimento das membranas PVP e PVA

No ensaio de citotoxicidade, com os resultados de DO obtidos a viabilidade celular foi calculada em relação ao controle de células no ensaio, considerada 100%. Projetando-se os valores de viabilidade celular em relação à concentração dos extratos foram obtidas as curvas de viabilidade celular, apresentadas no gráfico na Fig. 2. O índice de citotoxicidade $IC_{50\%}$ determina quantitativamente o potencial tóxico das amostras, indicando a concentração de extrato que provoca a morte de 50% da população celular. No ensaio, todas as amostras que apresentarem curvas de viabilidade celular acima da linha do índice de citotoxicidade $IC_{50\%}$ são consideradas não citotóxicas, como o controle negativo. As amostras cujas curvas estiverem abaixo do $IC_{50\%}$ são consideradas citotóxicas e aquelas que cortarem a linha do $IC_{50\%}$, pode ser obtido o valor do índice de citotoxicidade na intersecção das linhas, como o controle positivo, cujo $IC_{50\%}$ é cerca de 37.

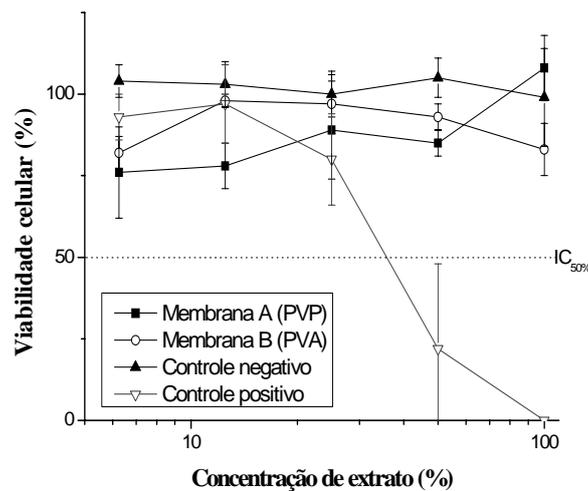


Figura 2. Curvas de viabilidade celular das membranas PVP e PVA no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Neste ensaio apenas o controle positivo apresentou toxicidade, com IC_{50%} igual a 37, significando que o extrato do controle positivo na concentração de 37% matou metade da população celular do ensaio. As amostras das membranas de hidrogel apresentaram comportamento semelhante ao controle negativo mostrando as curvas de viabilidade celular acima da linha do índice de citotoxicidade, portanto não apresentaram citotoxicidade (Fig.2).

4. CONCLUSÃO

As membranas de hidrogel de PVP e PVA não apresentaram efeito tóxico no ensaio de citotoxicidade e além de se mostrarem resistentes apresentaram reticulação e capacidade de intumescimento adequadas para uma matriz polimérica com possibilidade de incorporação de um princípio ativo para compor um sistema de liberação. Estudos serão continuados com o objetivo de incorporar um princípio ativo com propriedades antiinflamatória, antioxidante e cito estimulante para obtenção de membranas para tratamento de processos de regeneração cutânea.

AGRADECIMENTOS

A CNEN pela bolsa de Mestrado, a Capes e à estudante Rezolina Pereira dos Santos do IAL pela preparação das placas de cultura celular.

REFERÊNCIAS

- Barcellos, I.O., Katime, I.A., Soldi, V., Pires, A.T.N. (2000), “Influência do comonômero e do método de polimerização na cinética de liberação de fenobarbitona a partir de hidrogéis”, *Polímeros.*, São Carlos, v.10.
- Benamer, S., Mahlous, M., Boukrif, A., Mansouri, B., Youcef, S.L. (2006), “Synthesis and characterization of hydrogels based on poly (vinyl pyrrolidone)”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 248, 284-290.
- ISO document 10 993-5, (1992), Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
- Miranda, L.F., Lugão, A.B., Machado, L.D.B. (1999), “Crosslinking and degradation of PVP hydrogels as a function of dose and PVP concentration”, *Radiation Physics and Chemistry.*, 55, 709-712.
- Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Miyamaru, L., Cruz, A.S. (2003), “Biocompatibility study of polymeric biomaterials”, *Artificial Organs.*, 27, 5, 424-427.
- Rosiak, J.M., Ulanski, P., Pajewski, L.A., Yoshii, F., Makuuchi, K. (1995), “Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments”, *Radiation Physics and Chemistry.*, 46, 161-168.
- Zhao, L., Mitomo, H., Zhai, M., Yoshii, F., Nagasawa, N., Kume, T. (2003), “Synthesis antibacterial PVA/CM-chitosan blend hydrogel with electron beam irradiation”, *Carbohydrate Polymers.*, 53, 439-446.

PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* BIOCOMPATIBILITY OF HYDROGEL MEMBRANES

Renata Hage Amaral¹, Sizue Ota Rogero¹, Áurea S. Cruz², Ademar Benévolo Lugão¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN- CNEN/SP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária – CEP 05508-900 – São Paulo, SP, Brasil

²Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355 – CEP 01246-902 – São Paulo, SP, Brasil

rhamaral@ipen.br

Abstract. *In pharmaceutical technology hydrogel is the most used among the polymeric matrices due to its wide application and functionality, primarily in drug delivery system. Study on physical-chemical properties and biocompatibility in vitro of hydrogel membranes of poly(vinyl-2- pyrrolidone) (PVP) and poly(vinyl alcohol) (PVA) obtained by ionizing radiation crosslinking have been performed in order to be used as matrices to compose a drug delivery system. The physical-chemical characterization of membranes was carried out by gel fraction and swelling tests and biocompatibility by in vitro test of cytotoxicity. In the gel fraction test the difference of crosslinking degree was about 10%. The PVP hydrogel showed a greater percentage of swelling in relation to PVA. The hydrogels submitted to the cytotoxicity test showed non-toxicity effect presenting the possibility to be used as polymeric matrices for immobilization of pharmaceutical or active agents.*

Keywords: *Delivery system, PVA hydrogel, PVP hydrogel, Cytotoxicity*