

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE HIDROGÉIS DE PVAL/PVP/ÁCIDO CITRICO

Maria J. A. Oliveira*¹, Monise F. Almeida^{1,2}, Valdir S. Amato³, Duclerc F. Parra¹, Ademar B. Lugão¹

1- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN-CNEN/SP, Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA).
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, 05508-900, São Paulo, Brazil.

2 – Faculdades Oswaldo Cruz

Rua Brigadeiro Galvão, 540 - Barra Funda - São Paulo – SP CEP 01151-000

3-Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP

Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - Bairro Cerqueira César - São Paulo - SP; CEP: 05403-000 - Sala 4028.

mariajho@yahoo.com.br

Hidrogéis são comumente usados na prática clínica da medicina em aplicações que incluem engenharia de tecidos e medicina regenerativa, diagnósticos, separação celular, imobilização de biomoléculas ou droga e como aderências para regular a barreira de materiais biológicos. O objetivo desse trabalho foi obter hidrogéis de Poli(N-2-vinil-pirrolidona) (PVP), Poli(álcool vinílico) (PVAL) e ácido cítrico, por reticulação química e analisar suas características quanto a intumescimento e citotoxicidade para a aplicabilidade na imobilização de fármaco usado em tratamento de lesões cutâneas. A caracterização das membranas de hidrogel foi conduzida na forma seca. Os hidrogéis secos foram analisados por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Termogravimetria (TGA), Análise Espectroscópica no Infravermelho (FTIR), intumescimento e determinação de gel. Foi observado que o aumento da concentração de ácido cítrico na síntese diminui o intumescimento da membrana, aumenta a fração gel e caracteriza uma membrana de maior estabilidade térmica. A membrana resultante não apresentou citotoxicidade. As características apresentadas como integridade, citotoxicidade, homogeneidade e intumescimento, observados nas membranas de hidrogéis são favoráveis para aplicação em imobilização de fármacos nos trabalhos futuros.

Palavras-chave: Hidrogéis, reticulação química, PVAL, PVP

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF PVAL/ PVP/ CITRIC ACID HYDROGELS MEMBRANES

Hydrogel are used in medicine clinical practice, including applications in tissue engineering and regenerative medicine, diagnostics, cellular immobilization separation of biomolecules or cells, and barrier materials to regulate biological adhesions. The work objective was the preparation of poly (N-2-vinyl-pyrrolidone) (PVP), Poly (vinyl alcohol) (PVAL) hydrogel by chemical reticulation with citric acid and their characterization as swelling and cytotoxicity, to future evaluation in the drug immobilization for treatment of skin lesions. The characterization of hydrogel membranes was conducted on dried form. The dried hydrogel was analyzed by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry analysis (TGA), infrared spectroscopic analysis (FTIR), swelling and gel determinations. The increase of citric acid concentration impedes the swelling, increases the gel fraction and characterize a higher thermal stability membrane. The produced membranes showed no cytotoxicity. The results of cytotoxicity, integrity, homogeneity and swelling are favorable to the hydrogel use as drug immobilization in the future work.

Keywords: Hydrogels, crosslinked chemistry, PVAL, PVP.

1- Introdução

As modificações estruturais em polímeros têm sido de grande interesse tanto comercial quanto científico para obtenção de novos materiais para uso farmacêutico e biomédico. Essas modificações podem ser obtidas na presença de um agente reticulante ou adicionando-se um segundo polímero, por emprego de radiação gama [1-3], ou reticulação física por processo de ciclos térmicos de

congelamento e descongelamento [4-6], reticulação por agente químico [7-10], ou por radiação de feixe de elétrons [11-13], efeito fenton [14] e radiação no ultravioleta [15].

Hidrogéis, ou géis contendo água, são polímeros caracterizados por sua hidrofiliabilidade e insolubilidade em água. Em meio aquoso, esses hidrogéis intumescem (ou incham) até um volume de equilíbrio, mas preservam seu formato original. A hidrofiliabilidade é devida à presença de grupos solúveis em água como: $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, entre outros presentes na cadeia polimérica [16].

A insolubilidade e a estabilidade destes géis são devidas à presença de uma rede tridimensional. O intumescimento resulta de um balanço entre as forças de dispersão atuando nas cadeias hidratadas e as forças coesivas devido às ligações covalentes cruzadas. Outras interações características também estão presentes, entre elas as interações eletrostáticas e de dipolo-dipolo [17] tornando-se o grau e a natureza das ligações cruzadas responsáveis por suas características no estado intumescido. As propriedades mecânicas dos hidrogéis dependem principalmente da rigidez original das cadeias poliméricas, do tipo de retículo, da densidade das ligações cruzadas e do intumescimento como resultado do balanço hidrofílico e hidrofóbico.

O desenvolvimento dos hidrogéis como biomateriais começou em 1940 quando se descobriu que esse material por causa da sua hidrofiliabilidade poderia ser utilizado para a substituição de tecidos orgânicos ou para outras aplicações biomédicas [18]. Recentemente descobriu-se que esses hidrogéis são excelentes suportes para liberação de droga e macromoléculas bioativas, surgindo assim a idéia do sistema de liberação controlada, um conceito promissor que deverá substituir as técnicas convencionais do uso de drogas (comprimidos, injeções e pulverizações) [19]. Foi em decorrência do sucesso dessas propriedades e de suas avançadas aplicações que, nos últimos 40 anos, pesquisadores de renome como Nikolaos Peppas, Janusz Rosiak, Edward Merrill, Robert Langer, Michael Sefton, Joseph Kost e Richard Kormeyer, entre outros, voltaram seus estudos para esse campo.

Seguindo nesta mesma linha de pesquisa e com base em trabalhos da literatura, a proposta deste trabalho foi preparar hidrogéis a base de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), poli(álcool vinílico) (PVAI) e ácido cítrico, utilizando-se a reticulação química.

Uma aplicação potencial de membranas é na superfície de tecidos lesados. A Leishmaniose cutânea é causada por um protozoário do gênero *Leishmania* transmitida por mosquitos flebotômídeos, clinicamente é caracterizado por febre prolongada, palidez, emagrecimento e feridas de difícil cicatrização na pele. Vários reservatórios têm sido identificados, na área urbana o cão é a principal fonte de infecção; no ambiente silvestre destacam-se as raposas e os marsupiais. O homem insere-se no ciclo epidemiológico como hospedeiro eventual, mas em áreas epidêmicas pode ser considerado

reservatório, podendo ocorrer a transmissão homem-vetor-homem, sem necessidade dos canídeos [20].

De acordo com o Dr. Valdir S. Amato responsável pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (HC-FMUSP), para a tentativa de liberação controlada de fármaco em aplicação cutânea a membrana deve possuir as seguintes características: maciez, flexibilidade e uma liberação lenta do fármaco.

2- Experimental

Esta etapa de síntese foi feita a partir de solução de PVP e PVAI utilizando-se ácido cítrico como agente de reticulação. As formulações foram elaboradas com diferentes proporções de ácido cítrico. Após a dissolução separada dos polímeros PVAI e PVP juntaram-se as duas soluções e adicionou-se o ácido cítrico. A reticulação química foi iniciada usando como catalisador o HCl à temperatura de 80 °C por cinco minutos. Da solução final foram colocados 35mL em placas de *Petri* com 85 mm de diâmetro e deixados à temperatura ambiente por cinco dias para completar a reticulação. Por último, as amostras foram lavadas em água destilada para extração de possíveis resíduos ácidos indesejáveis.

3- Resultados e Discussão

As membranas de hidrogéis obtidas por reticulação química foram sintetizadas usando ácido cítrico como agente reticulante e ácido clorídrico como catalisador. Para uma mesma relação de PVAI / PVP variou-se a concentração do ácido cítrico. A concentração máxima utilizada foi de 3,0% de ácido cítrico que apresentou características estáveis. Também foi preparada uma matriz PVP + PVAI sem agente reticulante para comparação. Quando colocada em água a membrana desintegrou-se impossibilitando as análises e indicando que este sistema sem agente reticulante não se mantém estável.

3.1 Intumescimento

A figura 1 mostra as curvas de intumescimento das membranas de reticulação química. A matriz PVAI + PVP + 0,5 % de ácido cítrico intumescerá relativamente mais do que as matrizes com 2,0 e 3,0 % de agente reticulante. Quando aumenta a concentração do ácido cítrico diminui o intumescimento, o que é atribuído ao aumento da reticulação da membrana. Os valores de equilíbrio de intumescimento em água das matrizes de hidrogéis com diferentes concentrações 0,5; 2,0 e 3,0% de ácido cítrico foram respectivamente 58,7; 44,5 e 40,4%.

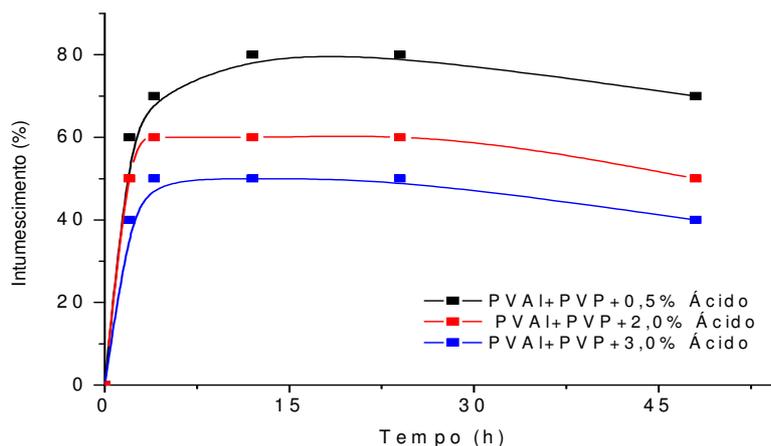


FIGURA 1 – Curvas de intumescimento da matriz de PVAI + PVP variando-se a concentração de ácido cítrico.

3.2 Fração gel

O conteúdo de fração gel está associado à extensão de reticulação da matriz. A tabela 1 apresenta a porcentagem da fração gel das matrizes de hidrogéis. O resultado está também relacionado à capacidade de intumescimento, quanto maior o grau de reticulação da matriz menor é o grau de intumescimento e isto, foi verificado nas formulações preparadas.

TABELA 1 – Fração gel em porcentagem (%) das matrizes de hidrogel obtidas por reticulação química.

Membrana	Fração gel (%)
PVP + PVAI + 0,5 ácido cítrico	40,0
PVP + PVAI + 2,0 ácido cítrico	59,6
PVP + PVAI + 3,0 ácido cítrico	67,1

3.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA)

Importante ressaltar que a membrana reticulada apresenta um resultado de maior estabilidade térmica como observado na figura 2. O evento de decomposição do PVAI que se inicia em 273 °C é deslocado para uma temperatura superior de 80 °C, tabela 2, nas concentrações utilizadas no estudo evidenciando o aumento da estabilidade térmica em virtude da reticulação do sistema polimérico. O evento de decomposição do PVP não sofre alterações significantes. Como pode ser observado na figura 3, as curvas de DTGA comprovam o aumento da estabilidade térmica pelo deslocamento da temperatura máxima de decomposição do PVAI, a reticulação química modifica a estrutura do polímero dificultando a sua decomposição. Observa-se na mesma figura que o PVP se mantém com a mesma T_{max} .

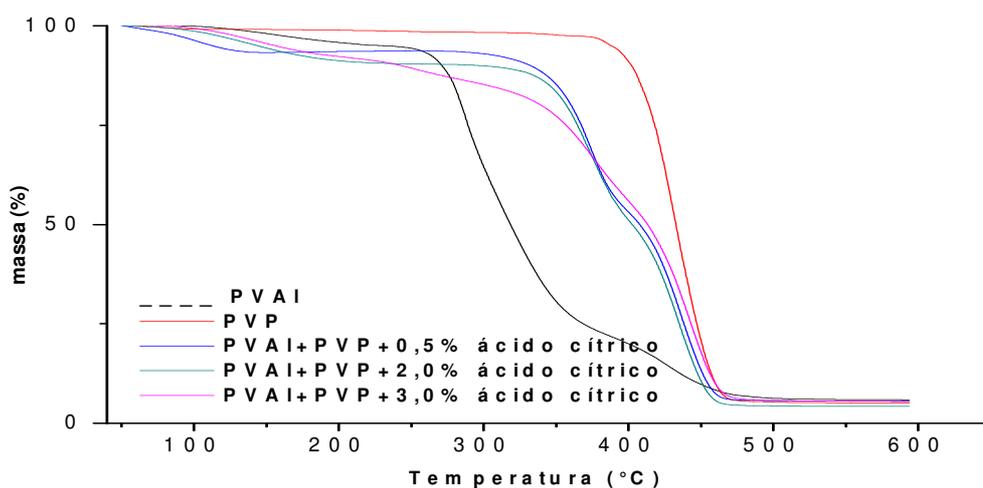


FIGURA 2 – Curvas de decomposição térmica dos hidrogéis por reticulação química, variando-se a concentração de ácido cítrico.

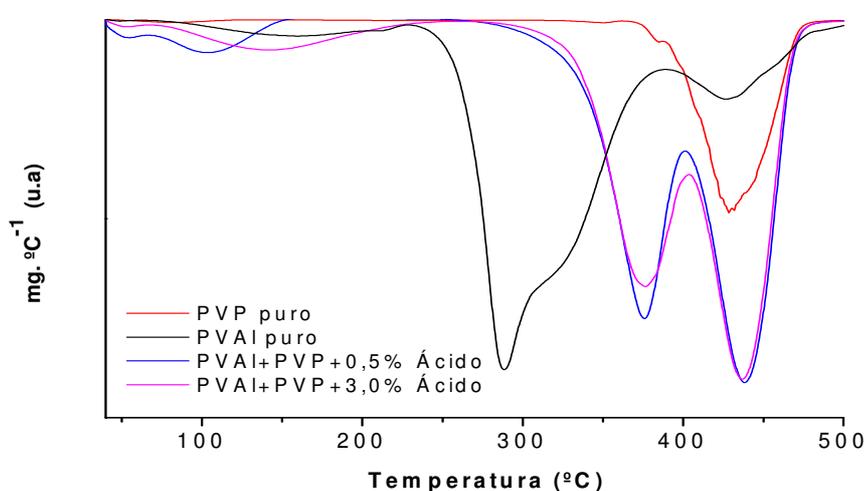


FIGURA 3 – Curvas de DTGA de hidrogéis PVAI / PVP por reticulação química.

TABELA 2 - Resultados da T_{onset} da perda de massa e do resíduo das matrizes de hidrogéis PVAI+PVP+ácido cítrico, obtidos por reticulação química.

	1ª T (°C) (água)	2ª T (°C)	3ª T (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%)
PVP puro	-	-	410,7	95,2	4,8
PVAI puro	-	273,3	408,3	94,1	5,9
PVP + PVAI + 0,5 ácido	105	349,0	425,3	94,4	5,6
PVP + PVAI + 2,0 ácido	105	358,0	424,3	95,8	4,2
PVP + PVAI + 3,0 ácido	105	358,0	424,7	94,5	5,5

T= Temperatura inicial de decomposição do evento.

Há também uma diferença de cerca de 15°C para o início de decomposição do terceiro evento. Atribui-se essa diferença à contribuição da decomposição do PVAI reticulado no terceiro evento. A

estabilidade da pirrolidona ao ataque ácido torna pouco provável a ocorrência de reticulação no PVP.

3.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC).

Como pode ser observado na figura 4 as curvas de DSC o pico localizado a 150 °C atribuído ao PVP não sofreu deslocamento, porém nesse evento também há a contribuição de desidratação do PVAI. O pico atribuído à fusão do PVAI (219 °C) é deslocado de cerca de 5 – 9 °C com diminuição de intensidade. Isto indica que com a reticulação química do PVAI diminuem as cadeias livres para cristalização alterando portanto a entalpia do processo de cristalização e como conseqüência e intensidade do pico.

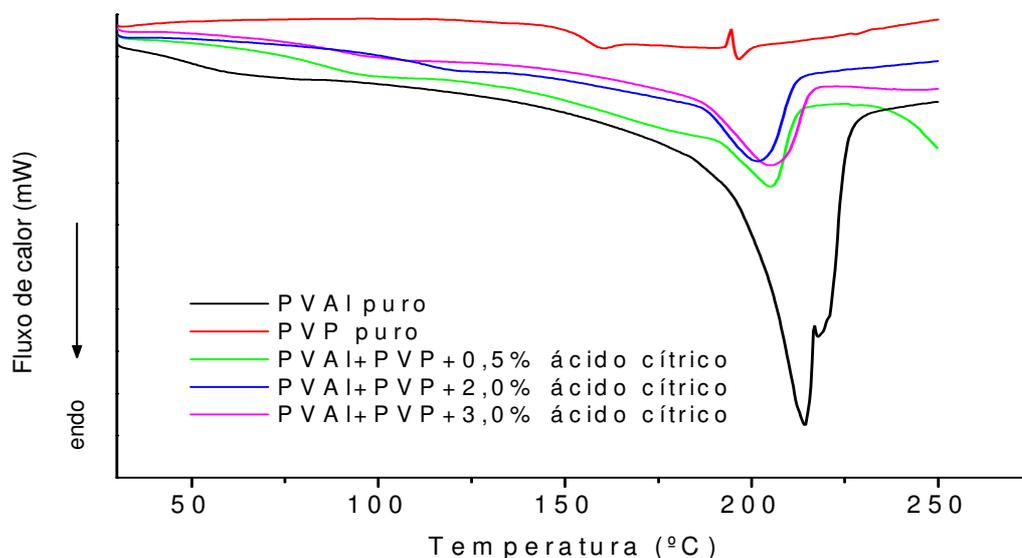


FIGURA 4 – Curvas de DSC primeira fusão PVP + PVAI variando-se a porcentagem de ácido cítrico.

Na tabela 3 estão apresentados os valores da temperatura das matrizes de hidrogéis obtidos por reticulação química. A temperatura de 219 °C foi atribuída à parte cristalina do PVAI. A baixa intensidade do pico em cerca de 210 °C, está relacionado com a diminuição de cristalinidade do PVAI novamente em razão da reticulação.

TABELA 3 - Valores de T_f das matrizes de hidrogéis PVP+PVAI + ácido cítrico.

Amostras	T (°C)
PVAI puro	219
PVP puro*	-
PVAI + PVP + 0,5% Ácido cítrico	210
PVAI + PVP + 2,0% Ácido cítrico	210
PVAI + PVP + 3,0% Ácido cítrico	215

* Polímero amorfo não apresenta T_f .

O mecanismo de reticulação do PVAI envolve o ataque nucleofílico catalisado por ácido. O ácido cítrico é protonado 1 e o átomo de oxigênio do PVAI age com nucleófilo sobre o C carboxílico formando o estado intermediário 2. A deslocalização eletrônica no átomo de oxigênio é estabilizada como consequência da eliminação da molécula de água.

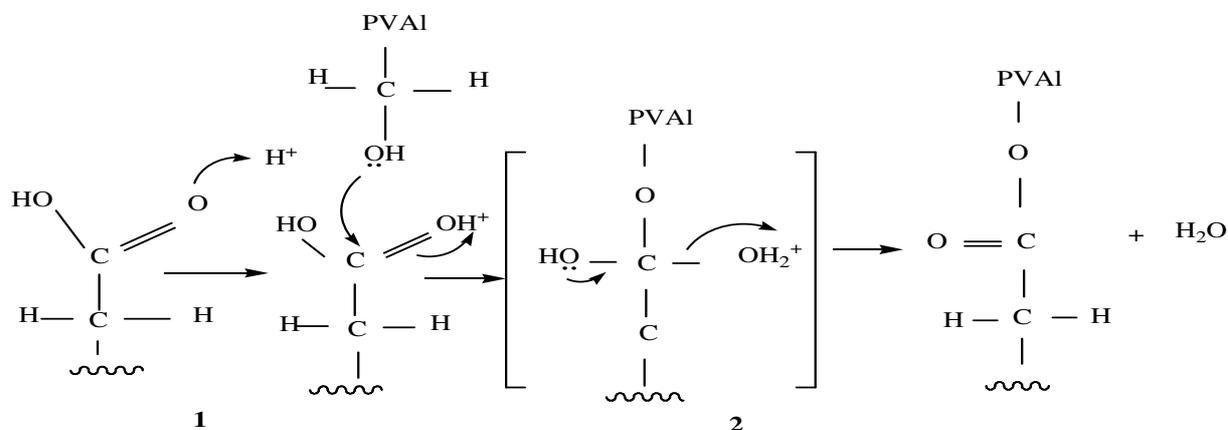


FIGURA 5- Mecanismo que ocorre na reticulação do PVAI envolvendo o ácido cítrico

3.5 Análises de infravermelho (IR)

Como pode ser observado na figura 6, a menor intensidade relativa e o estreitamento da banda correspondente às ligações O-H (3000 a 3500 cm^{-1}) indicam que houve condensação. Aumentando-se a concentração de ácido cítrico para 2,0% observa-se maior estreitamento do pico. Nota-se também o deslocamento do sinal atribuído à carbonila do PVP de $1660 - 1640\text{ cm}^{-1}$ quando o PVAI é adicionado. O deslocamento dessas bandas para menores valores de frequência indica a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila e hidroxila como resultado das interações de PVAI com o PVP. O aparecimento de sinal relativo à carbonila do PVAI reticulado é observado no espectro do 2,0% de ácido cítrico a 1736 cm^{-1} , enquanto que o estiramento do grupo C-O-C do éster é observado a $1100-1050\text{ cm}^{-1}$.

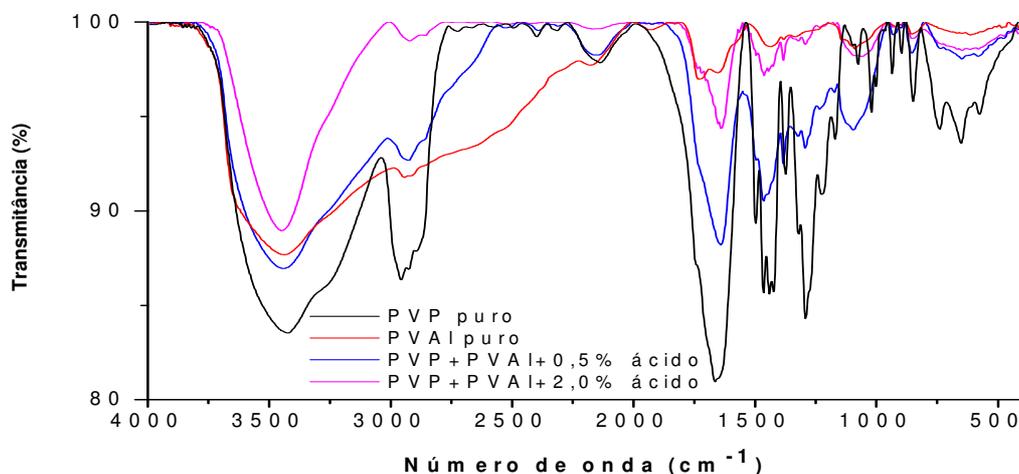


FIGURA 6 – Espectros de absorção na região do infravermelho das membranas dos hidrogéis obtidos por reticulação química.

3.6 Matrizes de hidrogéis PVP+PVAI+Ácido cítrico

As matrizes de hidrogéis obtidas por reticulação química apresentam características físicas diferentes das reticulações obtidas por irradiação gama e reticulação física, como são ilustradas na figura 7a e 7b. Quando submetida ao intumescimento apresenta-se em forma de hidrogel mantendo-se maleável.

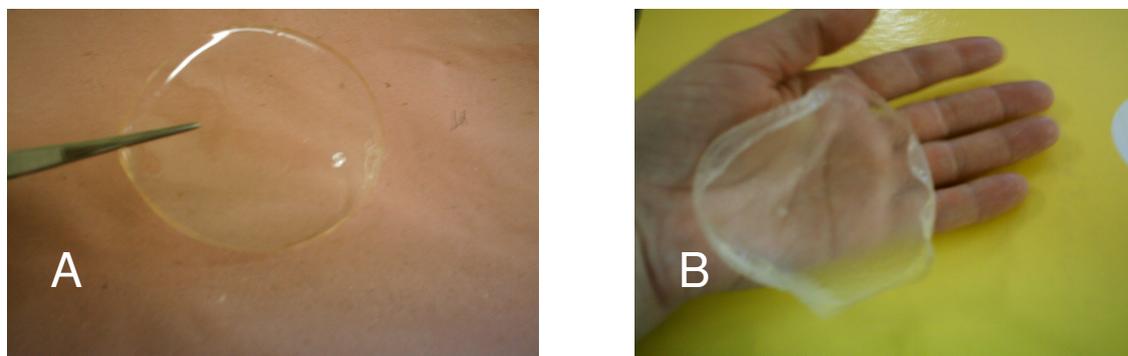


FIGURA 7 – Fotos das matrizes de hidrogéis PVP+PVAI+ácido cítrico, obtidos por reticulação química.(A)Antes do intumescimento (B) Após intumescimento.

3.7 – Citotoxicidade

Como no resultado do teste não foi observado halo de toxicidade ao redor ou sobre as amostras das células. Estas se mostraram íntegras sem nenhuma alteração morfológica apresentando comportamento idêntico ao controle negativo, figura 8. Pode-se afirmar que os hidrogéis sintetizados por reticulação química desenvolvidos nesse trabalho não causam morte ou prejuízo à população celular sendo, portanto, caracterizados como não-citotóxicos.

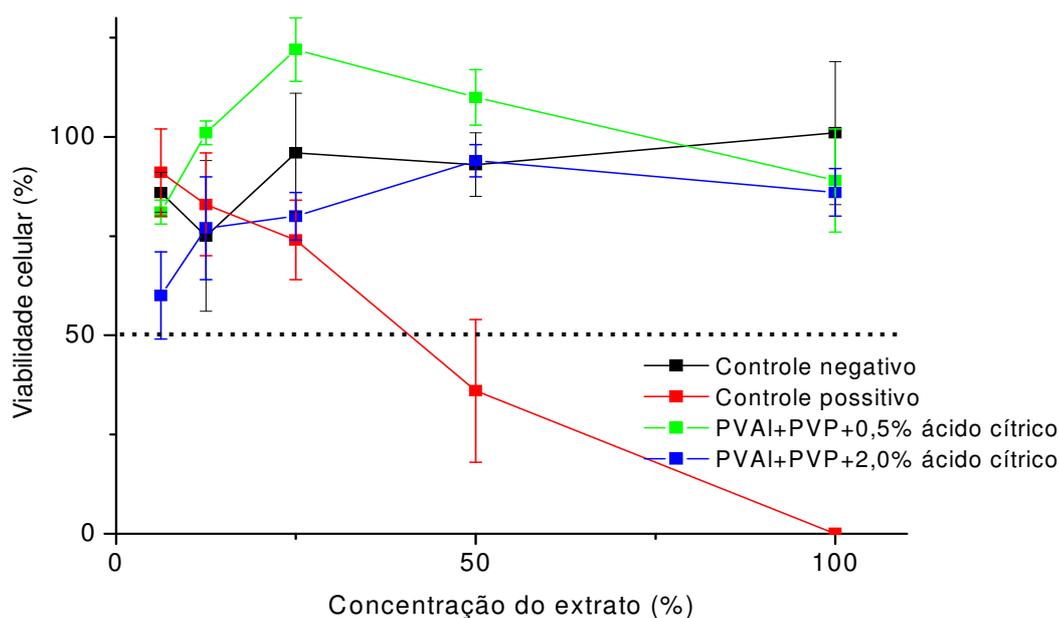


FIGURA 8 - Curvas de viabilidade celular das matrizes de hidrogéis pela incorporação do vermelho neutro.

4- Conclusões

Os resultados evidenciam que o aumento da concentração de ácido cítrico diminui o intumescimento, aumentando a quantidade de gel demonstra-se que reticularam em todas as concentrações usadas. Além disso, pode-se observar a ocorrência de um estreitamento do pico de infravermelho na região correspondente às ligações O-H, indicando a ocorrência de condensação atribuída ao aumento da reticulação da membrana. Em virtude da reticulação as membranas produzidas têm maior estabilidade térmica. No sistema PVAL/PVP observa-se que a reticulação se processa no PVAL que esterifica-se em presença do ácido cítrico. As características de integridade, homogeneidade, não citotoxicidade observados nas membranas sintetizadas por reticulação química caracterizam sua potencialidade para aplicações como liberação de fármaco.

5- Agradecimentos

FAPESP 06/53634-3/CNPq /CAPES/IPEN-CNEN/SP. Agradecemos também a Dr. Sizue Rogero pelos testes de citotoxicidade e ao Técnico Eleosmar Gasparin pelas análises térmicas.

6- Referências Bibliográficas

1. J. M. Rosiak; P. Ulanski. Synthesis of Hydrogels by Irradiation of Polymers in Aqueous Solution, *Radiation Physics and Chemistry*, v. 55, p. 139-151, 1998.
2. Z. Ajji; I. Othman., J. M. Rosiak. Production of Hydrogel Wound Dressings Using Gamma Radiation, *NIM B*, v. 229, p. 375-380, 2005.
3. M. M. Lakouraj; M. Tajbakhsh; M. Mokhtary. Synthesis and Swelling Characterization of Cross-linked PVP/PVA Hydrogels, *Iranian Polymer Journal*, v.14 (12) p.1022-1030. 2005.
4. X. Yang; Q. Liu; N. X. Che; Z. Zhu. Investigation on the Formation Mechanisms of Hydrogels Made by Combination of γ -Ray Irradiation and Freeze-Thawing, *Journal Polymer Science*, v. 108, p. 1365-1372, 2008.
5. N.A. Peppas; S. R. Stauffer. Reinforced uncrosslinked poly(vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing–thawing process: a short review, *Journal Controlled Release*, v. 16, p.35, 1991.
6. V. I. Lozinsky. Study of Cryostructure of Polymer Systems. XVI. Freeze- thaw-induced Effects in the low Concentration Systems Amylopectin-water, *Russian Chem. Reviews*, v. 67, p.573, 1998.
7. K. Y. Lee; D. J. Mooney. Hydrogels for Tissue Engineering, *Chemical Reviews*, v. 101, nº 7, 2001.
8. S. R. V. Tomme; G. Storm; E. W. Hennink. *In Situ* Gelling Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications, *International Journal of Pharmaceutics* p. 1–18, 2008.
9. J. Ruiz; A. Mantecón; V. Cadiz. Synthesis and Swelling Characterization of Acid-containing Poly(vinyl alcohol) Hydrogels, *Journal Appl. Polym. Sci.*, v. 81, p.1444-1450, 2001.
10. T. Wang; M. Turhan; S. Gunaekaran. Selected properties of pH-sensitive, Biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) Hydrogel, *Polymer Int.*, v.53, p. 911-918, 2004.
11. A. M. Atta; A. M. Elsayed; H. I. Shafy. Uses of Electron-beam Irradiation to Prepare pH- and Temperature-Sensitive Hydrogels from Reactive Poly(vinyl alcohol) Grafts, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 108, p. 1706-1715, 2008.

12. J. M. Rosiak; P. Ulanski. Synthesis of Hydrogels by Irradiation of Polymers in Aqueous Solution, *Institute of Applied Radiation Chemistry*, Lodz, Poland, 1998.
13. A. G. Chmiekewski; D. K. Chmielewska; J. Michalik; M. H. Sampa. Prospects and Challenges in Application of Gamma, Electron and ion Beams in Processing of Nanomaterials, *NIM B*, v.265 p. 339-346, 2007.
14. J.A.G. Barros; G. J. M. Fehine; M. R. Alcantra; L. H. Catalani. Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) Hydrogels Produced by Fenton Reaction, *Polymer* v.7, p. 8414-8419, 2006.
15. L.C. Lopérgolo; A. B. Lugão; L. H Catalani. Direct UV Photocrosslinking of Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to Produce Hydrogels, *Polymer*, v. 44, p. 6217–6222, 2003.
16. V. P Bavaresco; L. D. B Machado; C. A. C. Zavaglia; M. C. Reis. Caracterização Mecânica de Hidrogéis de PVAI para serem utilizados como cartilagem artificial reticulados por irradiação. *Rev. Brás. Pesq. Des.*, v. 4 (3) parte 2, p. 1679-1681, 2002.
17. S. Benamer; M. Mahlous; A. Boukrif; B. Mansouuri; F. S. Lyouce. Synthesis and Characterizations of Hydrogels Based on Poly(vinyl pyrrolidone), *NIMB*, v.248, p. 284-290, 2006.
18. K. Y Lee et al. Hydrogels as Extracellular Matrices for Skeletal Tissue Engineering, *Macromolecules*, v.33, p. 4291, 2000.
19. N. A. Peppas. “Hydrogels in Medicine and Pharmacy”, v. III, CRC PRESS *Boca Raton*, 1987.
20. *BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE*, Ministério da Saúde, Disponível em 07 de julho de 2008, <<http://bvsm.sau.gov.br/html/pt/dicas/126leishmania>>.