

CARACTERIZAÇÃO DO HIDROGEL DE POLI(N-VINIL-2-PIRROLIDONA) PARA USO VETERINÁRIO

Sizue O. Rogero; Solange G. Lorenzetti; Lilian C. Lopérgolo; Ademar B. Lugão.

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Av. Lineu Prestes 2.242
05508-900 - Butantã, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Muitas aplicações de hidrogéis de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) podem ser citadas. Talvez a mais promissora seja o seu uso no campo da medicina e farmácia. Mais de 30 anos de pesquisa neste campo resultaram no uso comum de hidrogéis como lentes de contato, curativos avançados, sistemas de liberação de fármacos, superabsorventes, etc. Este trabalho propõe a síntese de um novo gel para uso veterinário a base de PVP e polissacarídeos, a ser utilizado em queimaduras e lesões da pele de animais. Os géis foram preparados via radiação gama com dose de 10kGy. Os géis apresentaram boa adesão e a presença de polissacarídeos aumentou a densidade de reticulação dos mesmos, sendo considerados não tóxicos.

Keywords: hydrogel, veterinary gel, cytotoxicity, PVP-polysaccharides

I. INTRODUÇÃO

Os hidrogéis são polímeros hidrofílicos reticulados por radiação que, na presença de água, absorvem uma significativa quantidade desta formando um gel elástico [1]. Desde o desenvolvimento do gel 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) em 1960 [2] e a descoberta de que a epitelização pode ser acelerada se o ferimento for mantido úmido pelo uso de um filme de polietileno, em 1962 [3], os hidrogéis têm sido usados em diversas aplicações. A leveza, a qualidade não abrasiva, sua permeabilidade e capacidade de umedecer substâncias biologicamente ativas são características suficientes para preparar materiais com excelentes propriedades biomédicas. Rosiak e col.[4] desenvolveram um sistema polimérico hidrófilo na forma de uma membrana de cerca de 3mm de espessura, a base de PVP, polietilenoglicol (PEG) e agar, reticulado por radiação ionizante, com excelentes características para ser utilizado como curativo, principalmente em queimaduras.

A ciência na área de biomateriais, principalmente na aceleração da cura em ferimentos, tem avançado rapidamente nestes últimos anos e muitos produtos apareceram no mercado. Um dos mercados mais promissores é o da área veterinária. Segundo a Associação de Medicina Veterinária [5] muitos são os casos de queimaduras ou ulcerações de pele em animais, decorrentes de queimaduras ou mordidas de outros animais. Os curativos utilizados e existentes no mercado são, em geral à base de colágeno bovino [6]. Estes curativos são pouco eficientes, não possuem boas propriedades mecânicas e sua remoção é feita por raspagem, o que pode ferir ainda mais o local. Este trabalho tem por objetivo avaliar um novo gel veterinário a

ser utilizado como curativo para queimaduras a base de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) com polissacarídeos reticulado por radiação gama. As propriedades como densidade de reticulação e tamanho de poro foram, também, avaliadas tendo como objetivo estimar um possível sistema para liberação de fármacos.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Os hidrogéis foram obtidos a partir de soluções aquosas do homopolímero poli(N-vinil-2-pirrolidona) da BASF - KOLLIDON-K90. Sua massa molar média ponderal é $M_w = 1,2 \times 10^6$.

Preparação dos Hidrogéis

Os hidrogéis foram preparados segundo as formulações apresentadas na Tabela 1, via radiação gama com dose de 10kGy.

TABELA 1. Formulação dos hidrogéis a base de PVP.

Componentes	A1	A2	A3
PVP K90	6,0%	6,0%	6,0%
PEG 300	1,5%	1,5%	1,5%
CMC	----	0,5%	----
ALGINATO de SÓDIO	0,5%	----	----
CARRAGENA	----	----	0,5%

Conteúdo de gel após a irradiação

Após a irradiação, os hidrogéis ficaram em repouso por cerca de 12 horas para atingir o equilíbrio. Em seguida foram pesados, embrulhados em meia de nylon e colocados em um extrator Soxhlet por aproximadamente 36 horas. O solvente utilizado foi água destilada. Após a extração os hidrogéis foram submetidos à secagem, em estufa por cerca de 48 horas à 60°C. Em seguida foram pesados até massa constante.

Para se obter a fração *sol* e a fração *gel* foram utilizadas as seguintes relações:

$$S(\%) = [(W_g - W_o) / W_o] \times 100$$

$$G(\%) = 100 - S$$

Onde, S(%) = porcentagem da fração sol, G(%) = porcentagem da fração gel, W_g = massa inicial de PVP na amostra, W_o = massa do gel seco.

Densidade de Reticulação

Os hidrogéis, de massas diferentes, foram secos com papel de filtro e pesados até indicação massa constante. Então, foram imersos em água destilada dentro de um tubo de vidro providos de tampas de tal forma a manter o líquido em equilíbrio com seu vapor. Após um período de 72 horas, foram retirados e pesados. Todas as medidas foram feitas à temperatura ambiente.

A densidade de reticulação em uma rede polimérica é inversamente proporcional a massa molecular média numérica entre ligações cruzadas (M_c). De acordo com o modelo de Flory-Rehner, M_c pode ser estimado segundo a equação 1 [7]:

$$\frac{1}{M_c} - \frac{2}{\bar{M}_n} = \frac{[\ln(1 - V_{2S}) + V_{2S} + \chi_1 V_{2S}^2]}{V_1 \rho_2 \left(V_{2S}^{1/3} - \frac{V_{2S}}{2} \right)} \quad (1)$$

onde \bar{M}_n é a massa molar média numérica do polímero, V_{2S} é a fração de volume do polímero no gel intumescido no equilíbrio, V_1 é o volume molar do solvente, V_2 é a densidade do polímero e χ_1 é parâmetro de interação soluto-solvente. Como subproduto deste cálculo, a granulação ou "mesh size" de uma rede polimérica pode ser calculada pela equação 2:

$$\xi = 0.1 V_{2S}^{-1/3} \left(C_n \frac{2 M_c}{M} \right)^{1/2} \delta \quad (2)$$

onde ξ é a granulação da rede polimérica (em nm), M é a massa molecular do mero (unidade repetitiva), C_n é o

coeficiente de rigidez e δ é o comprimento de uma ligação individual C-C (0,154 nm).

Ensaio de citotoxicidade [8-9]

Para o estudo da biocompatibilidade dos hidrogéis obtidos, foram realizados testes *in vitro* de citotoxicidade. No ensaio de citotoxicidade, foram utilizadas células da linhagem celular NCTC-clone L929 de tecido conectivo de camundongo, originária da American Type Culture Collection [ATCC-(CCL1)]. O meio de cultura foi o de Eagle (MEM) com adição de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio (Meio-uso). O teste foi realizado colocando-se o extrato do hidrogel a ser analisado em contato com as células em cultura e a toxicidade foi determinada pela medida da viabilidade celular através da incorporação do vermelho neutro. Foi preparada uma suspensão de células da cultura em garrafa de cultura celular. Para o destaque das células foi utilizada solução de tripsina; o número de células foi contado em hemocitômetro e a suspensão foi acertada para obtenção de 5×10^4 células por mL. Foi feita uma distribuição de 0,2mL desta suspensão em cada poço da microplaca de 96 wells. A placa foi incubada em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por cerca de 24h, para atingir a confluência desejada. A preparação do extrato do material a ser testado foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-5 de 1992. No teste propriamente dito, o extrato do material foi diluído em série, com o meio de cultura Meio-uso e 0,2mL de cada diluição foi colocado em contato com as células aderidas em cada poço, em triplicata. Controles positivo e negativo receberam o mesmo procedimento da amostra. A placa foi mantida em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por 24h. Decorrido este período os meios foram trocados por Meio-uso fresco contendo 50µg do corante vermelho neutro/mL e incubados por 3h. Após a captação do corante a placa foi lavada com a solução de CaCl₂ em formaldeído e em seguida cada poço recebeu 0,2mL da solução de ácido acético em etanol. A placa foi agitada por 10 min e levada para um leitor de ELISA em 540nm.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A porcentagem de gel é uma medida eficiente para avaliar o grau de reticulação de um material. A Figura 1 mostra a variação da porcentagem de gel de hidrogéis constituídos segundo a Tabela 1. Como pode ser observado o hidrogel isento de polissacarídeo apresentou uma porcentagem de gel menor do que os com polissacarídeos. Isto pode ser uma evidência de que os polissacarídeos aumentam a porcentagem de gelificação e conseqüentemente podem participar intimamente do processo de reticulação do hidrogel de PVP.

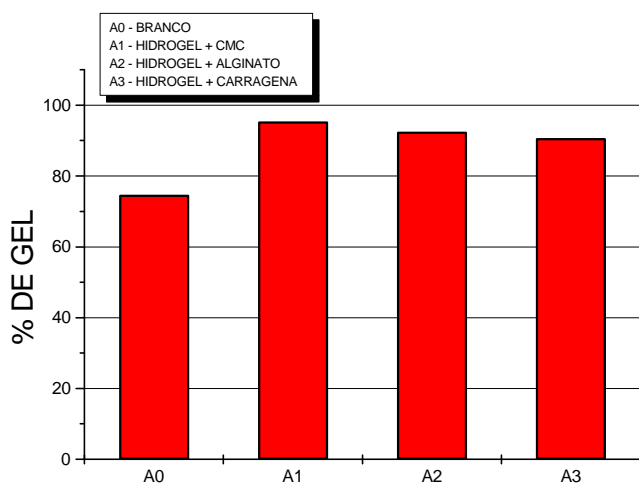


Figura 1. Variação de porcentagem de gel dos hidrogéis produzidos com diferentes polissacarídeos.

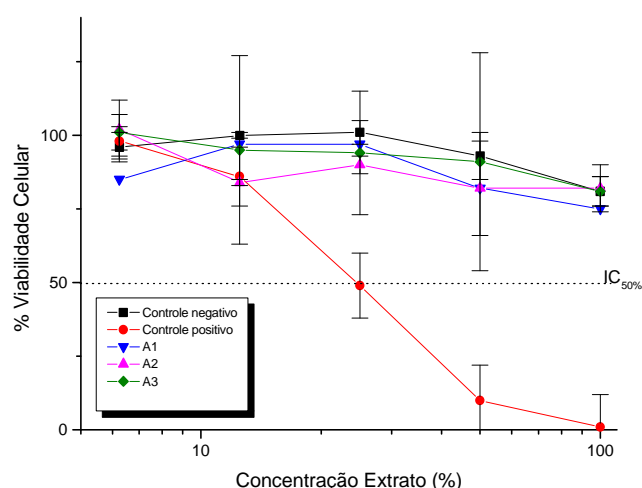
A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos pelo intumescimento dos hidrogéis produzidos. Observa-se que o hidrogel sem polissacarídeo apresenta um grau de intumescimento, densidade de reticulação, massa molar média entre cadeias e tamanho de rede sempre maior em relação aos hidrogéis com polissacarídeos. Um decréscimo no grau de intumescimento no equilíbrio significa que a rede formada fica cada vez mais fechada diminuindo sua capacidade de expansão e, portanto, a absorção de solvente. Isto indica que quanto maior a porcentagem de gel formada maior será a concentração de cadeias efetivas formadas e por consequência menor será a massa molar média entre ligações, M_c , que é inversamente proporcional a densidade de reticulação. Nota-se, também, que não existe diferença significativa entre os hidrogéis com polissacarídeos, CMC (carboximetilcelulose), Alginato de sódio e Carragena. Todos os hidrogéis apresentaram boa aderência.

TABELA 2. Dados experimentais do intumescimento dos hidrogéis produzidos

Tipo de hidrogel	Grau de intumescimento o no equilíbrio	Densidade de reticulação (mol/mL)	Massa molar média entre cadeias (mol/g)	Tamanho da rede polimérica (nm)
Branco	(115,40 ± 10,51)	(2,01 ± 0,22)E-5	(39.131 ± 3.572)	(5,67 ± 0,42)
A1	(44,85 ± 6,26)	(4,19 ± 1,08)E-5	(24.595 ± 5.175)	(3,44 ± 0,48)
A2	(51,47 ± 5,36)	(3,63 ± 0,87)E-5	(21.860 ± 5.470)	(3,09 ± 0,52)
A3	(59,86 ± 9,22)	(3,28 ± 1,24)E-5	(27.526 ± 8.921)	(3,82 ± 0,82)

A porcentagem relativa de viabilidade celular em diferentes concentrações do extrato dos hidrogéis, obtidos por radiação gama, foi calculada e está representada na Figura 2. A concentração de extrato que danifica a metade da população celular é conhecida como índice de citotoxicidade, expresso como $IC_{50\%}$. O controle negativo PVC não apresentou efeito tóxico ($IC_{50\%} > 100$) e o controle positivo, solução de fenol 0,02% apresentou toxicidade ($IC_{50\%} \sim 20$). Todos os hidrogéis foram considerados estéreis e não tóxicos.

Figura 2. Ensaio de citotoxicidade dos hidrogéis à base de



PVP e polissacarídeos.

IV. CONCLUSÃO

Os hidrogéis com polissacarídeos apresentaram densidade de reticulação maior que o hidrogel sem polissacarídeo, mostrando que estes componentes participam da rede tridimensional formada. Os hidrogéis apresentaram boa adesão e não são tóxicos.

REFERÊNCIAS

- [1] Rosiak, J. M. **Radiation of Hydrogels for Drug Delivery** Journal of Controlled Release, vol. 31, p 9-19, 1994.
- [2] Wichterle, O., Lim, D. **Hydrophilic Gels for Biological Use.** Nature, vol. 185, p 117- 118, 1960.
- [3] Winter, A. Nature, vol 45, p 89 - 90, 1962.
- [4] Rosiak, J., Ulasnski, P. **Radiation Gelation of Hydrogels and their Applications.** Radiat. Phys. Chem., vol 55, p 139-151, 1999.
- [5] Associação Brasileira de Medicina Veterinária – **ABMV.** Informação oral.
- [6] Swaim, S. F; Gillette, R. L. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian.** vol 20, p 1133, 1998.

[7] Flory, P.J; Rehner, J; **Statical Mechanics of Cross-linked Polymer Networks**. The Journal of Chemical Physics. vol.11, n. 11, p 512-520, 1943.

[8] ISO document 10 993-5, 1992 Biological evaluation of medical devices, Part 5, **Tests for cytotoxicity: in vitro methods**.

[9] Ciapetti, G.; Granchi, D.; Verri, E.; Savarino, L.; Cavedagna, D.; Pizzoferrato, A. **Application of recombination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials**. Biomaterials, vol.17, p 1259-1264, 1996.

ABSTRACT

Hydrogel is a polymeric material that exhibits the ability to swell in water and retains a significant fraction of water within its structure, but does not dissolve in water. This work was directed to the study of a new veterinary gel for use as wound dressings. The hidrogels were prepared by gamma irradiation of an aqueous polymer solution with different polysaccharides. The resulting changes in the main properties of the membranes, such as gel content, swelling characteristics and cytotoxicity were investigated.