

ESTUDO DE MATRIZES DE HIDROGEL DE POLI(VINIL ÁLCOOL) (PVA) COM ADIÇÃO DE CORANTES

Renata Hage Amaral¹, Sizue Ota Rogero¹, Áurea S. Cruz², Rogério S. Sacramento³, Acácio A. Souza Lima Filho³, Paulo Schor³, Ademar Benévolo Lugão¹

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

Av. Lineu Prestes, 2.242 – Cidade Universitária - 05508-900 - São Paulo, SP, Brasil - sorogero@ipen.br

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

³ Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Rua Morcote, 47 – Vila Clementino - São Paulo, SP, Brasil

Resumo. Matrizes poliméricas de hidrogéis são muito utilizadas na confecção de dispositivos médicos como na área de oftalmologia em lentes de contato, plugs para a síndrome de olho seco e outros. Neste trabalho foi estudado hidrogel de poli(vinil álcool) (PVA) obtido pela reticulação com radiação ionizante, adicionando-se alguns aditivos como sais e corantes. O estudo para caracterização físico-química foi realizado pelos ensaios de fração gel, de intumescimento e o de biocompatibilidade in vitro pelo ensaio de citotoxicidade. A adição de sais, assim como a do corante azuleno não modificou a % de gel e de intumescimento destes hidrogéis obtidos. O corante adicionado parece ter participado no processo de reticulação do mesmo. Os hidrogéis obtidos, mesmo o colorido submetidos ao ensaio de citotoxicidade não apresentaram toxicidade.

Palavras-chave: Sistema de liberação, Hidrogel PVA, Citotoxicidade

1. INTRODUÇÃO

A definição mais utilizada para os hidrogéis poliméricos é que são polímeros de cadeia reticulada, capazes de absorver água sem se dissolverem, podendo ter origem natural ou sintética. Desde a década de 70, estudos de hidrogéis poliméricos sintéticos à base de poli (álcool vinílico) (PVA) têm despertado interesse devido a sua biocompatibilidade [Bavaresco *et al.*, 2002].

Atualmente, tem-se dado muita atenção em pesquisa e desenvolvimento de biomateriais poliméricos, como lentes de contato, curativos, matrizes para imobilização de enzimas, e sistemas de liberação de fármacos [Peppas, 1996]. Estes materiais são de interesse especial para tais aplicações devido a sua biocompatibilidade e o fato de serem atóxicos [Chen *et al.*, 2004].

Os polímeros sintéticos mais utilizados para formação de hidrogéis são poli (álcool vinílico) (PVA), poli (vinil-pirrolidona) PVP, poli (óxido de etileno) (PEO), poli (acrilamida) (PAAm), poli (ácido acrílico) (PAA) e poli (éter metil vinílico) (PVME). A radiação ionizante

pode ser utilizada para reticulação de polímeros, apresentando a vantagem de ocorrer simultaneamente no mesmo processo a reticulação e a esterilização do produto [Rodas, 2004].

Este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos proporcionados pela incorporação de sais e corantes nas matrizes de hidrogel de PVA obtidas pela radiação ionizante.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Diferentes formulações para obtenção de matrizes de PVA

As diferentes formulações foram preparadas com PVA 8% proveniente da Bandeirante Química, utilizando a adição de sais ou corantes em algumas delas. As misturas foram aquecidas para completa dissolução, distribuídas em tubos Eppendorf e enviados para irradiação com raios gama na dose de 25 kGy, conforme Tab. 1.

Tabela 1. Descrição das diferentes formulações de hidrogel de PVA

Formulação	1	2	3	4	5	6
PVA (%)	8	8	8	8	8	8
Azuleno (%)	-----	-----	-----	-----	0,5	1,0
Azul de metileno (%)	-----	-----	1	-----	-----	-----
Corante aliment. (%)	-----	-----	-----	1	-----	-----
PBS (%)	92	-----	-----	-----	-----	-----
Água (%)	-----	92	91	91	91,5	91
Dose (kGy)	25	25	25	25	25	25

2.2 Ensaio de Intumescimento

O ensaio de intumescimento das amostras de hidrogel obtidas foi realizado em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4. As amostras foram secas em estufa na temperatura de 60°C até peso constante. Cada amostra, em triplicata, do hidrogel seco pesando cerca de 0,1g foi colocada em 20mL de PBS e foram realizadas medidas da massa de hora em hora durante 6h e uma medida após 24h. Foi utilizada a Eq. (1) para calcular o grau de intumescimento.

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

Onde: mo = massa inicial
mf = massa final

2.3 Ensaio de Fração Gel

O ensaio de fração gel foi realizado em extrator Soxhlet. As amostras de hidrogel com cerca de 0.5g cada, em triplicata, foram secas em estufa na temperatura de 60°C até peso constante. Posteriormente estas amostras foram acondicionadas em saquinhos de *non woven* e colocadas no extrator. A extração da fração solúvel foi realizada com H₂O durante 48h. Decorrido este tempo as amostras foram novamente secas em estufa na temperatura de 60°C até adquirirem peso constante. A fração gel foi calculada através da Eq. (2).

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

Onde: mo = massa inicial desidratada
mf = massa final

2.4 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando-se o método de incorporação do vermelho neutro seguindo normas internacionais [ISO 10993-5, 1992] e seguindo metodologia publicada anteriormente [Rogerio *et al.*, 2003]. O extrato foi preparado pela imersão da amostra em meio de cultura celular (MEM). Foram feitas diluições do extrato obtido e em seguida as diluições colocadas em contato com uma cultura de células de tecido conectivo de camundongo da linhagem NCTC clone 929 da ATCC (American Type Culture Collection). A toxicidade foi verificada pela viabilidade celular medindo a quantidade de vermelho neutro incorporado nas células vivas. A quantificação do corante foi realizada em espectrofotômetro, leitora ELISA Sunrise da Tecan, em filtro de 540nm e o cálculo da % de viabilidade celular feito em relação ao controle de células no ensaio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os hidrogéis obtidos apresentaram boa reticulação, muito resistentes e transparentes. Com relação às formulações utilizando corante, foi verificado que o corante azul de metileno e o corante alimentício azul, após a irradiação tornaram-se incolores, tendo sido descartados para continuação do estudo de caracterização. O corante azuleno, tanto na quantidade de 0,5 como 1% manteve a coloração azul no hidrogel obtido após irradiação. Portanto as formulações 1, 2, 5 e 6 foram as selecionadas para estudos de caracterização dos hidrogéis.

No ensaio de intumescimento foi verificado que as amostras de hidrogel obtidas contendo ou não aditivos apresentaram comportamentos semelhantes, como mostram as curvas de intumescimento na Fig. 1. Foi observado também que não houve saída do corante azuleno do hidrogel para a solução tampão (PBS) durante o ensaio.

Os resultados obtidos no ensaio de fração gel estão apresentados na Tab. 2. Não houve diferença significativa entre as formulações contendo ou não o azuleno, cerca de 85% de fração gel, sendo que o hidrogel preparado com sais (PBS) apresentou uma fração gel um pouco menor. Os hidrogéis apresentaram uma boa reticulação independente de conter aditivo ou não. O hidrogel permaneceu colorido após a finalização do ensaio de fração gel.

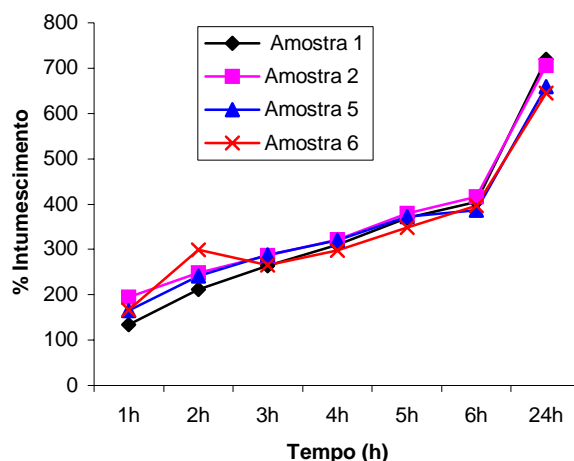


Figura 1. Ensaio de intumescimento das diferentes amostras de hidrogel em PBS pH=7,4. Amostras: 1 (PVA 8% em PBS); 2 (PVA 8% em H₂O); 5 (PVA 8% em H₂O + 0,5% azuleno); 6 (PVA 8% em H₂O + 1,0% azuleno)

Tabela 2. Resultados do ensaio de fração gel dos hidrogéis contendo ou não aditivos.

Amostra no.	mo (g)	mf (g)	% fração gel ± dp
1	0,0519	0,0404	78 ± 2
	0,0588	0,0446	
	0,0371	0,0296	
2	0,0408	0,0358	85 ± 2
	0,0450	0,0391	
	0,0444	0,0355	
5	0,0470	0,0394	84 ± 1
	0,0479	0,0405	
	0,0459	0,0391	
6	0,0500	0,0431	84 ± 2
	0,0530	0,0446	
	0,0495	0,0408	

As curvas de viabilidade celular dos hidrogéis no teste de citotoxicidade estão apresentadas na Fig.2. Foram obtidas pela projeção dos dados de porcentagem de viabilidade celular em função da concentração do extrato. As amostras de hidrogéis apresentaram resultados semelhantes ao controle negativo (*pellets* de PVC atóxicos), não apresentando nenhum efeito tóxico sobre as células. O potencial tóxico foi determinado quantitativamente pelo índice de citotoxicidade (IC_{50%}). O IC_{50%} é a concentração de extrato que provoca a morte da metade da população celular no ensaio. Somente o controle positivo (solução de fenol 0,02%) mostrou toxicidade, com IC_{50%} de 38%, indicando que nesta concentração de 38% houve morte de 50% da população celular no ensaio.

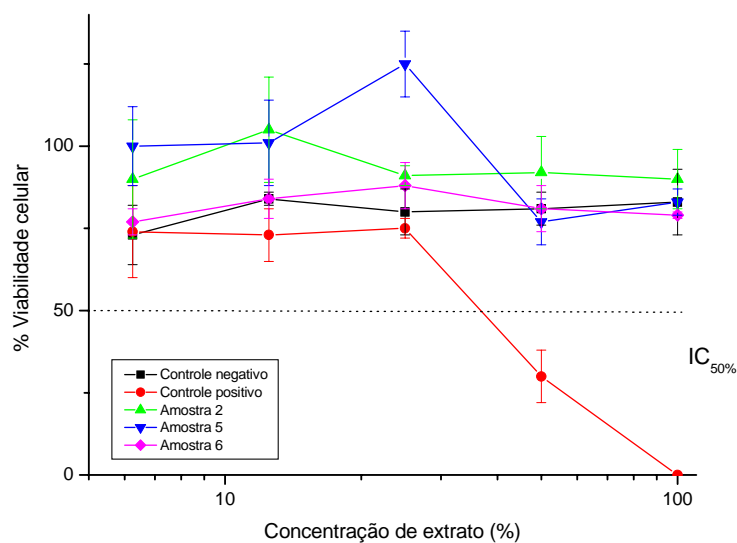


Figura 2. Curvas de viabilidade celular dos diferentes hidrogéis no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro- Amostra 2 (8% PVA em H₂O), amostra 5 (8% PVA em H₂O + 0,5% azuleno) e amostra 6 (8% PVA em H₂O + 1,0% azuleno).

4. CONCLUSÃO

Os hidrogéis obtidos, contendo aditivos ou não, apresentaram perfis de intumescimento e resultados de fração gel semelhantes e no ensaio de citotoxicidade mostraram ser atóxicos. O corante azuleno adicionado nas diferentes concentrações além de não apresentar toxicidade, permaneceu no hidrogel após a realização dos ensaios de intumescimento e fração gel, indicando que este corante pode ser utilizado na formulação de dispositivos com hidrogel de PVA para obtenção de matrizes coloridas.

AGRADECIMENTOS

À empresa Ophtalmos pelo apoio financeiro e à estudante Rezolina Pereira dos Santos do IAL .

REFERÊNCIAS

- Bavaresco, V.P., Machado, L.D.B., Zavaglia, C.A.C., Reis, M.C. (2002) “Caracterização Mecânica de Hidrogéis de PVAL para Serem Utilizados como Cartilagem Articular Artificial Reticulados por Radiação”, *Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento*, 4, 3- parte 2.
- Chen, S.C., Wu, Y.C., Mi, F. L., Lin Y. H., Yu, L.C., Sung, H.W. (2004), “A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery”, *Journal of Controlled Release*. 96, 285-300.
- ISO document 10 993-5, (1992), Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
- Peppas, N.A. (1996) “Hydrogels” in *Biomaterials Science*, Ratner, B., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. Academic Press (ed.), 60-64.
- Rodas, A.C.D. (2004) “Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos” Tese de Doutorado, IPEN/CNEN, São Paulo.

Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Cruz, A.S. (2003), "Biocompatibility study of polymeric biomaterials", *Artificial Organs*, 27, 5, 424-427.

STUDY OF POLY (VINYL ALCOHOL) (PVA) HYDROGEL MATRICES WITH DYE ADDITION

Renata Hage Amaral¹, Sizue Ota Rogero¹, Áurea S. Cruz², Rogério S. Sacramento³, Acácio A. Souza Lima Filho³, Paulo Schor³, Ademar Benévolo Lugão¹

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

Av. Lineu Prestes, 2.242 – Cidade Universitária - 05508-900 - São Paulo, SP, Brasil - sorogero@ipen.br

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

³ Escola Paulista de Medicina – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Rua Morcote, 47 – Vila Clementino - São Paulo, SP, Brasil

Abstract. *Hydrogel polymeric matrices are mostly used in the confection of medical devices as in the ophthalmologic area, in contact lenses, plugs for dry eye syndrome and others. In this work was studied hydrogel of poly (vinyl alcohol) gotten by ionizing radiation crosslinking, with some additives as salts and pigments. The study of physical-chemical characterization was carried out by gel fraction and swelling tests and biocompatibility by in vitro test of cytotoxicity. The addition of salts, as well as the pigment azulén did not modify the gel fraction and swelling of these hydrogels. The added pigment seems to have participated in the crosslinking process. The hydrogels, even the colorful, submitted to the cytotoxicity test showed no evidence of toxicity.*

Keywords: *Delivery system, PVA hydrogel, Cytotoxicity*