

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGEL PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE NEOMICINA

Angélica Tamião Zafalon¹, Vinícius Juvino Santos, Nilton Lincopan², Fernanda Esposito²,
Ademar Benevolo Lugão¹, Duclerc Fernandes Parra¹

¹Dep. De Química e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo (SP), Brasil

²Dep. Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil

E-mail: angelicatamiao@gmail.com

Resumo. Os hidrogéis têm sido empregados na medicina como biosensores, na engenharia de tecidos e como sistema de liberação de fármacos por serem biocompatíveis e atóxicos. Estudos recentes demonstram o uso de hidrogéis como curativos para a liberação controlada de antiinflamatórios, fatores de crescimento e antibióticos para o tratamento tópico de infecções. Com o aumento de casos de bactérias super-resistentes, principalmente *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistente (MRSA), o hidrogel tornou-se uma ferramenta importante para superar esse problema, pois esses fármacos são liberados diretamente na região comprometida aumentando a efetividade do tratamento. Além disso, fornecem um ambiente úmido evitando a adesão ao local da ferida e apresentam boa barreira contra microrganismos. A presença do fármaco não alterou a fração gel. O intumescimento foi realizado com a imersão da membrana em água à temperatura ambiente e pesagem até peso constante. O intumescimento máximo foi atingido após 24 horas de imersão. O intumescimento foi realizado com imersão da membrana em água. A liberação “in vitro” da neomicina foi avaliada empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS/MS). Observou-se que o aumento da dose de irradiação influenciou na absorção de água e na fração gel devido ao aumento da densidade de ligações cruzadas. A presença do fármaco não alterou a fração gel. O intumescimento em solução salina foi 4% maior que o obtido em água. A liberação do fármaco foi avaliada “in vitro” empregando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS). O pico máximo de liberação foi alcançado após 8 horas e permaneceu constante até 48h. O teste microbiológico demonstrou que o hidrogel foi capaz de inibir o crescimento microbiológico.

Palavras-chave: Neomicina, Hidrogel, Poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP).

1. INTRODUÇÃO

As infecções são consideradas problemas comuns em feridas crônicas (Bazzi, 2015; Gainza, 2015). A bactéria *Staphylococcus aureus* é um dos mais comuns microrganismos associados a infecções de feridas (Hub, 2011; Theuretzbacher, 2013; Boekeme, 2013; Pimenta, 2014). Em geral, essas lesões estão localizadas em regiões da pele com interrupção do fornecimento de sangue, como por exemplo em pacientes acamados, queimados, ou com úlceras de pressão ou em decorrência de obesidade e diabetes, e o tratamento sistêmico pode não ser efetivo nesses casos, aumentando o risco de desenvolvimento de resistência bacteriana (Bazzi, 2015, Hub, 2011; Theuretzbacher, 2013; Boekeme, 2013). O aumento da incidência desse patógeno vem preocupando as autoridades sanitárias de todo o mundo. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a prevalência de cepas *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) pode chegar a 80% em pacientes internados nas unidades de terapia intensiva. Para superar esse problema é necessário novas estratégias e agentes alternativos para o tratamento dessas infecções tóxicas (Bazzi, 2015; Hub 2011; Theuretzbacher, 2013; Boekeme, 2013).

Nesse sentido, os biomateriais têm sido amplamente estudados como um sistema de liberação de drogas, na forma de curativos, com a finalidade de liberar o fármaco de forma localizada, controlada, aumentando o tempo de contato da droga com o local afetado,

reduzindo a toxicidade e superando a resistência bacteriana (Gainza, 2015). Os hidrogéis são estruturas tridimensionais insolúveis, com consistência macia e elástica, formadas por polímeros reticulados e com alta capacidade de absorver água, entumecer e podem ser um material promissor para essa aplicação (Peppas, 2000; Peppas, 2000b; Hub, 2011; Theuretzbacher, 2013; Dragan, 2014).

A formação de hidrogéis, por meio de reticulação de polímeros, pode ser obtidas por vários métodos, entre eles a radiação gama de fonte ^{60}Co , que induz à modificação das características reológicas dos polímeros e tem a vantagem de não utilizar iniciadores ou reagentes tóxicos durante o processo (Rosiak, 2003; Lugão, 2007; Kadlubowski, 2010).

Hidrogel de Poli (N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) é um gel biocompatível, formado por polímero sintético de PVP ou em combinação com outros polímero para obter hidrogéis com características específicas, principalmente para desenvolvimento de sistema de liberação de drogas em forma de curativos para tratamento de infecções tópicas (Peppas, 2000b; Kadlubowski, 2010; Villanova, 2010; Dragan, 2014; Halake, 2014).

A Neomicina é um antibiótico de amplo espectro utilizado topicamente para o tratamento e profilaxia das infecções da pele (Bruton, 2006; Korolkovas, 2010).

O objetivo desse estudo foi preparar hidrogéis à base de poli (N-vinilpirrolidona) (PVP), ágar, polietilenoglicol processados por radiação em fonte de cobalto na dose de 25 kGy para liberação controlada de neomicina.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo das membranas de hidrogel

O PVP foi imerso em água por 24h, adicionado Polietilenoglicol (PEG 300), ágar e aquecido a 85°C por 5 minutos até total solubilização dos componentes. A solução foi resfriada a 50 °C, incorporada a neomicina e transferida para moldes de plástico termoformados medindo 100 x 25 mm e selados em sacos plásticos.

2.2 Processo de irradiação das amostras

As membranas foram enviadas para o Centro de Tecnologia das Radiações (IPEN-CTR), onde ocorreu a reticulação e esterilização por radiação ionizante de fonte gama obtido por meio do Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 tipo compacto, com dose de 25 kGy.

2.3 Determinação da fração gel

Para o método de extração que utiliza a técnica do refluxo, foram utilizadas membranas pesando $2\text{g} \pm 0,015$, secas em estufa a $50^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ por 24h. As amostras foram embaladas em bolsas de aço inoxidável com tela de 500 meshes.

Os balões de fundo redondo foram preenchidos com 350mL de água e mantidos por 6h à 100°C. Após esse período as amostras foram retiradas, secas em estufa por 24h e pesadas.

Para o cálculo da fração gel baseou-se na norma ASTM D 2765, utilizando a Eq. 1.

$$FG = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Onde:

FG = fração gel; m_i = massa inicial; m_f = massa após extração

2.4 Intumescimento

As amostras de hidrogel foram secas em estufa a 50 °C por 24 horas (P_i) e imersas em solução salina e soro fisiológico por 24h (P_f). O intumescimento foi calculado pela equação:

$$\text{Intumescimento}(\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

2.5 Liberação de neomicina

As amostras de hidrogel pesando $10,0 \pm 0,5$ g foram imersas em 100 mL de água destilada à temperatura de 37 °C sob agitação de 60 rpm. Alíquotas de 2 mL foram retiradas nos tempos de 15 e 30 min, 1 h, 1,5 ; 2;3 ;4 ;6 ;8 ;24 e 48h, e substituídas pelo mesmo volume de água. As alíquotas foram analisadas por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) Utilizou-se água, acetonitrila e ácido fórmico como fase móvel, fluxo de $250 \mu\text{l min}^{-1}$ e coluna Aquasil C18 (100x2.1) 5μ . O tempo de retenção foi de 3 min para a neomicina. O espectrômetro de massas (MS-MS) foi empregado como detector, equipado com interface eletrospray, e a varredura dos íons formados foi realizada de 250 a 620 m/z.

2.6 Inibição crescimento microbiológico

A eficácia da atividade antibacteriana da do hidrogel foi determinado de acordo com a JIS Z 2801:2010. O microorganismo *S. aureus* foi inoculado em placa de Petri em meio Mueller-Hinton. O hidrogel foi cortado em discos de 5 milímetros de diâmetro e colocados sobre o meio de cultura. A placa de Petri foi incubada por 24 horas a 37 °C. A atividade microbiana foi mensurada pela observação do aparecimento do halo de inibição em volta do hidrogel.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Síntese das membranas

As membranas apresentaram-se, após o processo de irradiação ionizantes, estrutura tridimensional insolúvel, transparência, elasticidade e maciez. Essas características são requeridas para a aplicação como curativos. A técnica de preparo apresentou facilidade no controle do processo, baixo custo de processo e a esterilização concomitante da membrana (Chapiro, 2002; Roziak, 2003; Lugão 2007) [Aiji, 2005; Kadlubowski, 2014].

3.2 Intumescimento

Os hidrogéis sintetizados foram imersos em água destilada e soro fisiológico por 24 horas e pesados. O resultado do intumescimento em soro fisiológico foi 4,62% maior que quando comparado com a água.

3.3 Fração gel

A fração gel é diretamente influenciada pela concentração do polímero, dose de irradiação e presença de agente plastificante, nesse último exemplo, o PEG atua como um sequestrante de radicais livre, o que reduz a reação de reticulação. Estudos realizados Aiji *et al.* (2005) relacionam a influência desses fatores na fração gel do hidrogel. Para o presente trabalho foi utilizado uma concentração de 0,45% de PEG em relação ao peso total da

membrana, acarretando uma fração gel de 96%. A presença do antibiótico neomicina não alterou a reticulação do polímero e conseqüentemente não houve alteração na fração gel quando comparado com o hidrogel sem o fármaco

3.4 Estudo da liberação de neomicina “in vitro”

A determinação de antibióticos pelo método analítico HPLC apresenta alta eficiência e reprodutibilidade e vem sendo utilizados para determinar a concentração da liberação de fármacos de matrizes poliméricas (Ortel, 2004; Stypulkowska, 2013; Apyari, 2013).

A avaliação da liberação da neomicina da membrana está relacionada com o intumescimento da matriz. Quando o hidrogel é imerso em água, ocorre um relaxamento da estrutura tridimensional e o fármaco pode ser liberado do sistema.

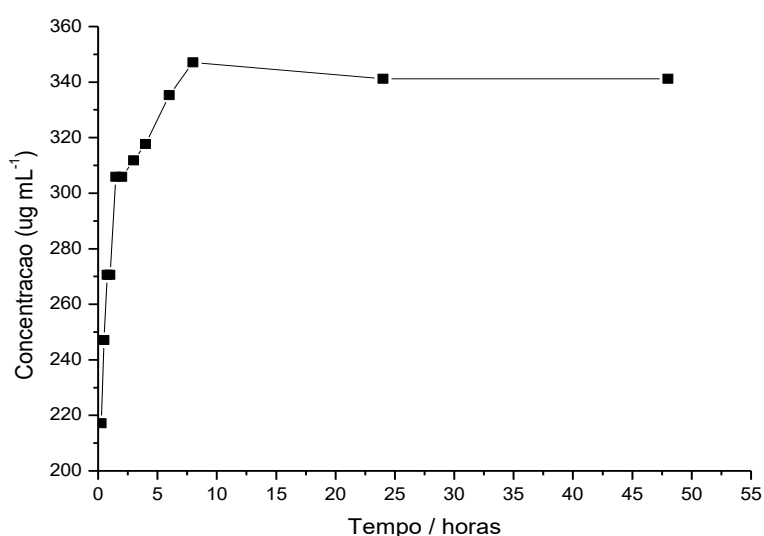


Figura 3 – Curva de liberação de neomicina da membrana de hidrogel.

Pode-se observar uma rápida liberação de neomicina nas primeiras horas de experimento, atingindo o pico máximo de liberação em 8 horas e permanecendo estável até 48 horas.

3.5 Inibição crescimento microbiológico

O teste de inibição do crescimento microbiológico foi determinado pelo teste de difusão em ágar, empregando a bactéria *S. aureus*. Após 24 horas de incubação, foi possível observar o halo de inibição ao redor do hidrogel com neomicina (amostras 2, 3 e 4), enquanto que a amostra de hidrogel sem o fármaco não apresentou diâmetro considerável de halo (amostra 1).

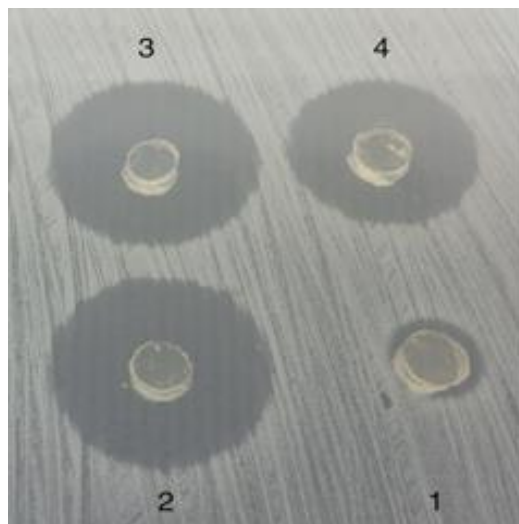


Figura 4: Atividade antimicrobiana do hidrogel com neomicina contra bactéria *S. aureus* ATCC 6538 após 24 horas de incubação. Amostra 1: hidrogel sem neomicina. Amostras 2, 3 e 4: hidrogel com neomicina

Esse resultado indica que a neomicina foi liberada do hidrogel, difundiu-se no ágar e interagiu com o DNA da bactéria causando a lise celular e assim acarretando a inibição do crescimento microbiológico.

4. CONCLUSÃO

As membranas de hidrogel obtidas por radiação gama são muito estudadas devido a potenciais aplicações médicas, inclusive como sistemas de liberação modificadas de fármacos em curativos. Os hidrogéis de PVP/neomicina foram obtidos por radiação ionizante e suas características de intumescimento, fração gel, capacidade de liberar o fármaco em estudo e inibição microbiológica foram mensuradas.

A neomicina foi liberada da membrana durante as primeiras horas e atingiu equilíbrio depois de 8 horas, permanecendo estável até 48 horas, indicando que a formulação é adequada para liberação controlada de fármaco. As análises microbiológicas indicaram que o hidrogel/neomicina foi efetivo contra bactéria *S. aureus* MRSA. Estes resultados foram significativos pois o hidrogel apresentou as características necessárias para o uso como curativo, pois foi capaz de absorver líquido sem perder a integridade e liberou o fármaco de forma controlada. A neomicina é um antibiótico muito utilizado na forma farmacêutica de pomada ou creme para aplicação em pequenos ferimentos e apresentar baixa efetividade contra microrganismos resistentes. Os resultados microbiológicos "in vitro" indicaram que a associação da neomicina com o hidrogel alterou a efetividade do antibiótico que foi capaz de inibir o crescimento de bactéria resistente como o *S. aureus* MRSA. Contudo, para continuação desse estudo, sugere-se novos ensaios "in vivo" para avaliar a utilização destes curativos como uma alternativa para o tratamento tópico convencional.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi financiado pela FAPESP e CAPES.

REFERÊNCIAS

- Ajji, Z.; Othman, I. And Rosiak, J.M. (2005), “Production of hydrogel wound dressing using gamma radiation”, *Nucl. Instr. And Meth. In Phys.*, 229, 375-380.
- Bazzi, A.M., Rabaan, a.A., Fawaroh, M.M., Al-Tawfiq, J.A. (2015). “Prevalence of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*”. *J Infect Public Health*. 8, 364-368.
- Boekema, B.K.H.L. e Pool, I. (2013), “The effect of a honey based gel and silver sulphodiazine on bacterial infections of in vitro burn wounds”, *Burns.*, 39, 754-759.
- Boekema, B.K.H.L.; Pool, L.; Vlrich, M.M.W. (2013). The effect of a honey based gel and silver sulphodiazine on bacterial infections of in vitro burn wounds. *Burns*. 39, 754-759.
- Bruton, L.L.; Lazo, J. S. and Parker, K.L. (2006), “*As bases farmacológicas da terapêutica.*”, McGraw-Hill (ed), Rio de Janeiro.
- Chapiro, A. (2002), “Polymer irradiation: past – presente and future”, *Radiat. Phys. Chem.*, 63, 207-209.
- Dragan, E. S. (2014), “Design and application of interpenetrating polymer network hydrogels. A review”, *Chem. Eng. J.*, 243, 572-590.
- Ferraz, C.C. (2013), “*Desenvolvimento de uma membrana nanoestruturada à base de poliacrilamida para veiculação de proteína*”, Dissertação de Mestrado, IPEN/USP, São Paulo.
- Gainza, G., Chu, W.S., Guy, R.H., Pedraz, J.L., Hernandez, R.M., Delgado, C.B., Igartua, M. (2015). Development and in vitro evaluation of lipid nanoparticle-based dressings for topical treatment of chronic wounds. *Int. J. Pharm.* 490, 404–411.
- Halake, K.; Birajdar, M.; Kim, B.S.; Bae, H.; Lee, C.; Kim, Y.J.; Kim, S.; Kim, H.J.; Ahn, S.; An, S.Y and Lee, J. (2014), “Recent application developments of water-soluble synthetic polymer”, *J. Ind. Eng. Chem.*, 20, 3913–3918.
- Huh, A. J., Kwon, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics: a new paradigm for treating infections diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era”. *J. Control. Release*.156, 128-145.
- Kadlubowski, S.; Henke, A.; Ulanski, P and Rosiak, J. M.(2010), “Hydrogels of polyvinylpyrrolidone (PVP) and poly(acrylic acid) (PAA) synthesized by radiation induced crosslinking of homopolymers”. *Radiat. Phys. Chem.*, 79, 261-266.
- Korolkovas, A. e França, F.F.A.C. (2010), “*Dicionário Terapêutico Guanabara*”, Guanabara Koogan (ed), Rio de Janeiro.
- Lugão, A.B.; Artel, B.W.; Yoshiga, A.; Lima, L.F.C.P.; Parra, D.F.; Bueno, J.; Liberman, S.; Farrah, M.; Tercariol, W.R. and Otaguro, H. (2007), “Production of high melt strength polypropylene by gamma irradiation”, *Radiation Physics and Chemistry.*, 76, 191-1695.
- Oliveira, M.J. A. (2013), “*Obtenção de membrana de hidrogéis para tratamento alternativo da Leishmaniose Tegumentar*”, Tese de Doutorado, IPEN/USP, São Paulo.
- Peppas, N. A.; Huang, T.; Torres-Lugo, M.; Wand, J. H and Zhang, J. (2000), “Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology”, *Ann. Revs. Biomed. Eng.*, 2, 9-29.
- Peppas, N.A.; Bures, P.; Leobandurg, W. And Ichikawa, H. (2000), “Hydrogels in pharmaceutical formulations”, *Eur J Pharm and Biopharm.*, 50, 27-46.
- Persin, Z.; Maver, V.; Pivec, T.; Maver, T. and VESEL, A. (2014), “Novel cellulose based materials for sale and eficiente wound treatment”, *Carbohydr. Polymers.*, 100, 55-64.
- Singh, B. and Bala, R. (2014), “Polysaccharide based hydrogels as controled drug delivery system for GIT cancer”, *Int. J. Biol. Macromol.*, 65, 524-533.
- Singh, D. and Singh, R. (2012), “Papain incorporated chitin dressing for wound debridement sterelized by gamma radiation”, *Radiat. Phys. Chem.*, 81, 1781-1785.
- Sinko, P.J. (2008), “*Físico-farmácia e ciências farmacêuticas*”, Artmed (ed.), Porto Alegre, RS.
- Skorupska, E.; Jeziorna, A.; Kazmierski, S. and Potrzebowski, M.J. (2014), “Recent progress in solid-state NMR studies of drugs confiner within drug delivery systems”, *Solid State Sci.*, 58, 2-16.
- Tae, G.; Kim, Y. J.; Choi, W. I.; Kim, M. and Stayton, P. S. (2007), “Formation of a novel heparina-based hydrogel in the presence of heparina-binding biomolecules”, *Biomacromol.*, 8, 1979-1986.
- Theuretzbacher, U. 2103. Global resistance: the never ending story. *J Glob Antimicrob Resist.* 1, 63-69.
- Villanova, J.C.O.; Rodrigo, L.O. and Armando, S.C. (2010), “Aplicação farmacêutica de polímeros”, *Polímeros.*, 20, 51-64.