

MATRIZES POLIMÉRICAS MODIFICADAS POR RADIAÇÃO GAMA PARA BIOAPLICAÇÕES

L.M. Ferreira^{*}, M.H. Casimiro^{*,†}, J.P. Leal[◇], A.N. Falcão^{*}, M.H. Gil[#]

^{*} Unidade de Física e Aceleradores (UFA), Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN)
Estrada Nac. 10, 2686-953 Sacavém, Portugal

e-mail: ferreira@itn.pt, casimiro@itn.pt, jpleal@itn.pt, falcao@itn.pt, web page: <http://www.itn.pt>

[†] *REQUIMTE*, CQFB, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa, FCTUNL, Universidade Nova de Lisboa
2829-516 Caparica, Portugal

e-mail: maria.casimiro@dq.fct.unl.pt, web page: <http://www.fct.unl.pt>

[◇] Unidade de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas (UCQR), Instituto Tecnológico e Nuclear (ITN)
Estrada Nac. 10, 2686-953 Sacavém, Portugal

e-mail: jpleal@itn.pt, web page: <http://www.itn.pt>

[#] Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de
Coimbra (FCTUC), Universidade de Coimbra

Pólo II, Pinhal de Marrocos, 3030-290 Coimbra, Portugal

e-mail: hgil@eq.uc.pt, web page: <http://www.fct.uc.pt>

Palavras - Chave: Copolimerização de enxerto, Polímeros para bioaplicações, Radiação gama.

Resumo. *A técnica de copolimerização de enxerto induzida por radiação gama proveniente de uma fonte de ⁶⁰Co, foi utilizada como “ferramenta” para modificar as propriedades de superfície de polietileno (PE) e de quitosano. Através do enxerto superficial de cadeias de metacrilato de 2-hidroxiétilo (HEMA) sobre estas matrizes poliméricas foi possível melhorar as suas propriedades hidrofílicas naturais e, conseqüentemente, a biocompatibilidade dos novos materiais assim obtidos. A metodologia otimizada no ITN permitiu já a preparação de 2 novos materiais (quitosano-g-HEMA e PE-g-HEMA), química e mecanicamente estáveis, com boa capacidade de hidratação e níveis insignificantes de hemólise, perspectivando boas aplicações biomédicas para ambos.*

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente na utilização de polímeros no desenvolvimento de materiais para bioaplicações. No entanto, apenas em alguns casos, as propriedades necessárias para essas aplicações são características de um único material polimérico. A copolimerização de enxerto é uma técnica que proporciona um método geral para a alteração das propriedades físicas, químicas e mecânicas dos polímeros. Em particular, a modificação de estruturas macromoleculares por técnicas de irradiação gama tem sido utilizada com sucesso na preparação de novos biomateriais [1]. Deste modo, através do controlo das condições experimentais de preparação (e.g., método de irradiação, fluxo de radiação gama, concentração das espécies reagentes, etc.) é possível, numa única operação, a preparação e esterilização do novo material, sem recurso a operações subsequentes de

isolamento e purificação exaustiva. Destacam-se nesta área os biomateriais copolímeros de matriz natural e os de matriz sintética.

Esta metodologia tem vindo a ser desenvolvida e otimizada na Unidade de Física e Aceleradores do ITN, com o objectivo de preparar membranas para sistemas de libertação contínua de fármacos (sistema copolímero *Quitosano/HEMA*) e em revestimentos hidrófilos sobre matrizes poliméricas hidrófobas com elevada resistência mecânica (sistema copolímero *Polietileno/HEMA*). A caracterização destes dois materiais mostrou a biocompatibilidade e boa adequação funcional a aplicações biomédicas.

2 EXPERIMENTAL

A preparação dos copolímeros de enxerto quitosano-g-metacrilato de 2-hidroxietilo (*Quitosano-g-HEMA*) e polietileno-g-metacrilato de 2-hidroxietilo (*PE-g-HEMA*) foi feita utilizando como matrizes quitosano (Aldrich; $M_w=1,9 \times 10^5$ - $3,1 \times 10^5$ Da; grau de desacetilação entre 75-85%), e filme de polietileno de baixa densidade (LDPE) biorientado (FIBOPE Portuguesa), purificado, com uma densidade de 0,918 e uma espessura de 15 μm . Como monómero enxertante foi usado metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) *p.a.* estabilizado (Acros Organic; grau de pureza 98%). Nos ensaios de imobilização de fármaco sobre as membranas de matriz natural (quitosano-g-HEMA) utilizou-se amoxicilina (Fluka; pureza mínima 97%).

Os copolímeros de enxerto foram preparados por irradiação gama em fonte de ^{60}Co , com débitos de dose de 0,6 $\text{kGy}\cdot\text{h}^{-1}$ (matriz natural) e de 0,3 $\text{kGy}\cdot\text{h}^{-1}$ (matriz sintética), à temperatura ambiente sob atmosfera de azoto. A dose de radiação absorvida, para as diferentes amostras de cada tipo de material, variou até um máximo de 20 kGy .

Para obtenção das membranas de matriz natural, soluções de quitosano de diferentes concentrações (1 e 3% *m/V* de quitosano em ácido acético 1%) foram misturadas com o monómero HEMA (1, 3, e 5% *V/V* da mistura final). Depois de homogeneizadas, as soluções resultantes foram colocadas em placas de vidro tendo-se deixado evaporar o solvente à temperatura ambiente em atmosfera limpa. De seguida os filmes foram neutralizados com NaOH 1% *m/V*, lavados com água e removidos das placas. Antes de se proceder à sua irradiação removeu-se o excesso de água da sua superfície com papel de filtro. Nas membranas com fármaco, previamente à sua irradiação, procedeu-se à imobilização do agente activo mergulhando as membranas em soluções de 1, 10 e 100 mg/cm^3 de amoxicilina em água.

Os filmes copolímeros de matriz sintética foram obtidos a partir da irradiação de tiras de filme de LDPE (8,5x2,5 cm), imersas em 30 cm^3 de solução de monómero ([HEMA]= 15% *V/V* em metanol). Após irradiação, os filmes enxertados foram sujeitos a uma extracção com metanol em *Soxhlet* durante 4 horas, para remoção dos resíduos indesejáveis de monómero e de homopolímero. Finalmente foram secos a 40 °C a baixa pressão (10^{-3} mbar) até peso constante.

O rendimento de enxerto dos materiais foi determinado pelo incremento percentual mássico de acordo com a relação:

$$\text{Rendimento de enxerto}(\%) = [(W_g - W_o) / W_o] \times 100 \quad (1)$$

onde W_o e W_g representam o peso inicial da matriz e do material copolímero final, respectivamente.

A capacidade de hidratação dos materiais em soro fisiológico a 37 °C, foi calculada a partir da seguinte relação:

$$\text{Hidratação}(\%) = [(W_w - W_d) / W_d] \times 100 \quad (2)$$

onde W_w e W_d correspondem ao peso dos copolímeros nos estados seco e molhado, respectivamente. As cinéticas de hidratação/desidratação foram obtidas por técnicas gravimétricas directas e instrumentais, neste caso recorrendo a equipamento de termoanálise (TGA – Dupont 951).

A análise morfológica para avaliação das modificações microestruturais de superfície induzidas nos materiais por exposição à radiação gama, foi realizada por microscopia electrónica de varrimento (SEM), sob amostras desidratadas, utilizando equipamento JEOL (JSM 5310).

A avaliação do efeito hemolítico *in vitro* dos copolímeros preparados foi efectuada pelo método da cianometahemoglobina, em conformidade com as normas ISO 10993-4, 2002 [2]; e ASTM F 756-00, 2000 [3].

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade de hidratação de um material polimérico é de grande importância quando se pretende a sua utilização como biomaterial. O grau de hidratação influencia as propriedades de superfície e os mecanismos de difusão através do suporte polimérico, assim como as suas propriedades mecânicas [4].

As figuras seguintes mostram o comportamento hidrófilo isotérmico de membranas de quitosano-*g*-HEMA não irradiadas e irradiadas (Figura 1), e de filmes PE-*g*-HEMA com diferentes rendimentos de enxerto (Figura 2).

Ambos os materiais copoliméricos revelam um comportamento hidrofílico bem marcado, o qual evolui com o aumento do conteúdo em HEMA (ou rendimento de enxerto). Este facto é especialmente evidente nas membranas quitosano-*g*-HEMA, como resultado da maior concentração natural de grupos funcionais hidrófilos (-OH e -NH₂) presentes na matriz deste copolímero (quitosano), em oposição à matriz hidrofóbica (PE) dos filmes PE-*g*-HEMA.

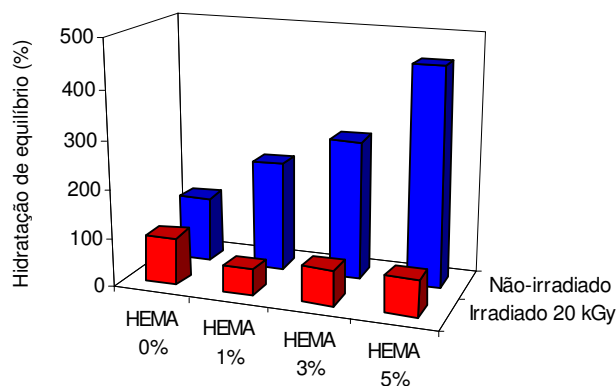


Figura 1: Diferença na hidratação de equilíbrio atingida em filmes de base quitosano (3% *m/V* em ácido acético 1%) irradiados ($DD=0,6 \text{ kGy}\cdot\text{h}^{-1}$) e não irradiados ; (Meio hidratante: soro fisiológico a 37 °C).

No caso dos filmes quitosano-*g*-HEMA, observou-se uma redução na respectiva capacidade de hidratação máxima dos filmes após irradiação, embora este tratamento não

induza alterações significativas na capacidade de hidratação da matriz de quitosano.

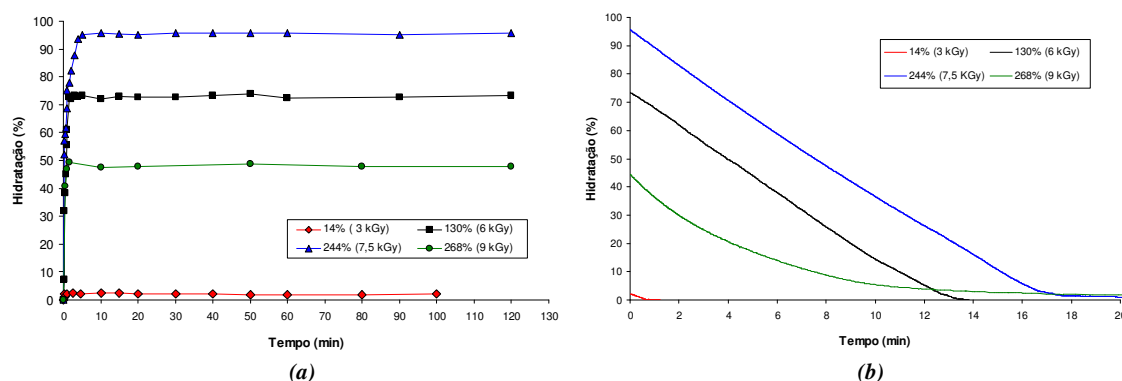


Figura 2: Cinéticas de hidratação (a)/desidratação (b) de filmes de PE-g-HEMA, em soro fisiológico a 37 °C.

Nos filmes PE-g-HEMA a capacidade de hidratação máxima varia em função do rendimento de enxerto. No entanto, tal como verificado com os filmes de matriz natural, independentemente da sua formulação [5], as cinéticas de desidratação são, em média, 5 vezes mais lentas que as correspondentes cinéticas de hidratação e, denunciam alguma limitação difusional na fase final do processo de desabsorção. Este facto foi atribuído a dois factores: *i*) ao aumento da reticulação das matrizes com a dose crescente de radiação absorvida, factor sobretudo importante nas membranas quitosano-g-HEMA, a qual conduz a uma redução da respectiva estrutura porosa [5] e, *ii*) à obstrução gradual da estrutura porosa da camada hidrófila inicialmente constituída sobre as matrizes, devido ao incremento da quantidade de cadeias de poli(HEMA) mais longas e densas, resultantes do aumento do rendimento de enxerto [6]. No entanto, este último factor, particularmente importante nos filmes PE-g-HEMA, é igualmente responsável pelo aumento da sua capacidade de absorção.

Micrografias de SEM mostrando a morfologia da superfície dos dois materiais em estudo (Figuras 3 e 4) confirmam estes dois efeitos. A redução da regusidade e estrutura porosa nas membranas quitosano-g-HEMA, devido à reticulação induzida pela radiação gama, está bem patente na Figura 3.

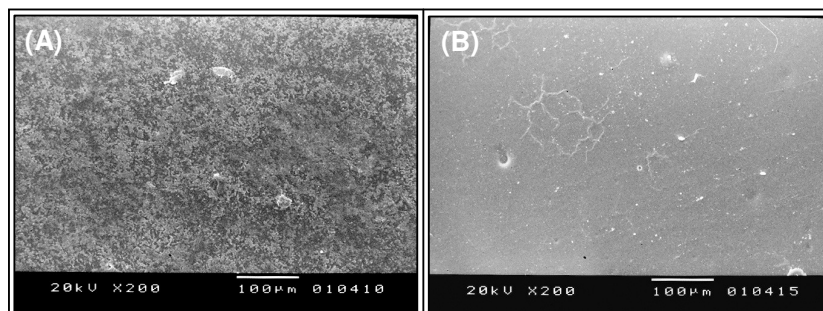


Figura 3: Micrografias obtidas por microscopia electrónica de varrimento da superfície de filmes quitosano-g-HEMA (C3H1): (A) antes de irradiados, (B) após irradiação ($D_{\text{abs}}=20$ KGy; $DD=0,6$ kGy.h⁻¹).

Por outro lado, as micrografias da Figura 4 comprovam a aglutinação parcial da estrutura porosa tridimensional dos filmes PE-g-HEMA, resultante do processo de enxerto inicial, com o aumento do respectivo rendimento da reacção de copolimerização.

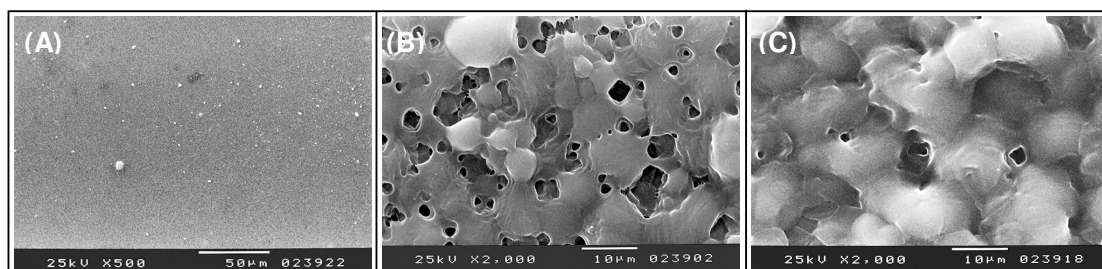


Figura 4: Micrografias obtidas por microscopia electrónica de varrimento da superfície da matriz de LDPE (A), e de filmes copolímeros PE-g-HEMA com: (B) 237% de enxerto (7,5 kGy; e $\approx 30 \mu\text{m}$) e (C) 403% (9,0 kGy; e $\approx 60 \mu\text{m}$).

Um dos principais problemas associados à utilização de biomateriais em contacto com o sangue é a lise das células sanguíneas (hemáceas). Os testes de contacto com o sangue, nomeadamente a determinação do índice hemolítico (*HI*), constituem assim os primeiros testes de biocompatibilidade de materiais/dispositivos num programa estruturado de avaliação biológica [2]. De acordo com a norma ASTM F 756-00 [3], para valores de *HI* entre 0 e 2%, os materiais são classificados como “não hemolíticos”. Entre 2 e 5% o material é considerado “ligeiramente hemolítico”. Para valores de hemólise superiores a 5%, o material é classificado “hemolítico”.

Os estudos de hemocompatibilidade *in vitro* realizados sobre os dois novos materiais (Figura 5) revelaram que os filmes PE-g-HEMA apresentam predominantemente um comportamento não hemolítico ($HI \leq 2\%$). No caso das membranas quitosano-g-HEMA, todas as amostras irradiadas com carga farmacológica clinicamente útil revelaram-se não hemolíticas ou ligeiramente hemolíticas.

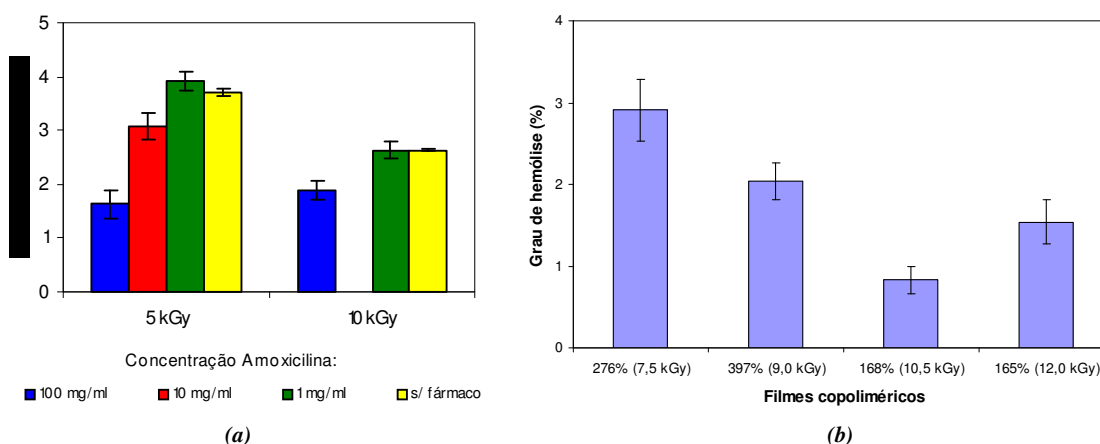


Figura 5: Grau de hemólise obtido para *a*) filmes Quitosano-g-HEMA irradiados, com e sem fármaco imobilizado e, *b*) filmes PE-g-HEMA preparados com tempos de irradiação de 25, 30, 35 e 40 horas; (média \pm desvio padrão; $n=3$).

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem-nos considerar que estes dois novos materiais são adequados para contacto directo com o sangue. Este factor associado às boas propriedades morfológicas, estabilidade química e mecânica [5-7], acentuam as suas potencialidades de aplicação biomédica em áreas como a libertação controlada de fármacos e na preparação de implantes biomédicos.

5 REFERÊNCIAS

- [1] R.S. Benson, “Use of radiation in biomaterials science”, *Nucl. Instr. Meth. B*, 191 (1-4), 752-757 (2002).
- [2] ISO 10993-4 (International Standard): Biological evaluation of medical devices – Part 4: Selection of tests for interaction with blood, 2nd edition (2002).
- [3] ASTM F 756-00: Standard Practices for Assessment of Haemolytic Properties of Materials, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA (2000).
- [4] F.A. Makhlis, *Radiation Physics and Chemistry of Polymers*, a Halsted Press Book – John Wiley & Sons, Inc., Jerusalem (1975).
- [5] M.H. Casimiro, J.P. Leal, M.H. Gil, “Characterization of gamma irradiated chitosan/pHEMA membranes for biomedical purposes”, *Nucl. Instr. Meth. B*, 236, 482-487 (2005).
- [6] L.M. Ferreira, A.N. Falcão, M.H. Gil, “Elemental and topographic characterization of LDPE copolymeric films obtained by gamma irradiation”, *Nucl. Instr. Meth. B*, 265, 193-197 (2007).
- [8] M.H. Casimiro, M.H. Gil, J.P. Leal, “Drug release assays from new chitosan/pHEMA membranes obtained by gamma irradiation”, *Nucl. Instr. Meth. B*, 265, 406-409 (2007).
- [7] L.M. Ferreira, *Modificação de Polietileno de Enxerto Induzida por Radiação Gama – Sua Aplicação na Área dos Biomateriais*, Tese de Doutoramento em Química, Especialidade em Química Tecnológica, Universidade de Lisboa, Lisboa (2008).