

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS DE POLIETILENO GLICOL E ALGINATO PARA A LIBERAÇÃO CONTROLADA DE BROMELINA

M. F. CAVENAGUE¹, P. G. MAZZOLA²; B. ZANCHETTA³; E. B. TAMBOURGI³;
E. SILVEIRA¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica

² Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas

³ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

E-mail para contato: maria.fernanda1994@yahoo.com.br

RESUMO – Os hidrogéis têm sido amplamente utilizados para inúmeras aplicações biológicas, médicas e tecnológicas, por possuírem algumas características peculiares, como atoxicidade; capacidade de intumescer em água e fluído biológicos; consistência elastomérica, o que minimiza o atrito entre tecidos e o hidrogel; alta permeabilidade, facilidade de obtenção em diferentes formas; incorporação e liberação controlada de fármacos de diferentes polaridades. Os hidrogéis podem ser formados por polímeros naturais, naturais modificados ou sintéticos. A bromelina é uma proteína encontrada nos vegetais da família *bromeliaceae*, e possui diversos usos na produção de fármacos, na indústria alimentícia, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, no preparo de colágenos hidrolisados, nas indústrias têxteis, para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes. O estudo visou a formulação de hidrogéis a base de polietileno glicol (PEG) e alginato, avaliando a absorção de água nos hidrogéis formulados e analisando a incorporação e liberação de bromelina em diferentes temperaturas para a liberação controlada de drogas, encontrando como formulação ideal uma concentração de 2% de PEG e 2% de alginato em pH 7 e temperatura ideal para liberação de bromelina, em concentrações de 0,2%, 25°C.

1. INTRODUÇÃO

Hidrogéis podem ser definidos como sistemas hidrofílicos formados por dois ou mais componentes unidos por ligações covalentes e/ou eletrostáticas dispostos em uma ou mais redes tridimensionais estruturadas envoltas por moléculas de um determinado solvente, geralmente água.

Segundo Moura (2005) os hidrogéis possuem algumas características peculiares, por exemplo: atoxicidade; capacidade de intumescer em água e fluído biológicos; consistência elastomérica, o que minimiza o atrito entre tecidos e o hidrogel; alta permeabilidade, o que permite o fluxo de fluídos corpóreos pelo hidrogel; facilidade de obtenção em diferentes formas; incorporação e liberação controlada de fármacos de diferentes polaridades.

Os hidrogéis podem ser formados por polímeros naturais (Boucard et al., 2007) tais como ácido hialurônico, alginato, quitosana; por polímeros naturais modificados (Coviello et al., 2007), por exemplo dextrana reticulada, galactomanana metacrilatada; e por polímeros sintéticos (Sedláková *et al.*, 1998) tais como polietileno glicol (PEG), poliacrilamida (PAAm), poli(hidroxiethyl metacrílico) (HEMA), poli(*N*-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), entre outros.

Hidrogéis sintéticos a base de PEG possuem alto equilíbrio de conteúdo de água, o que deve fornecer transporte rápido de moléculas pequenas através do gel. O ambiente aquoso dos hidrogéis a base de PEG é apropriado para a imobilização de várias biomoléculas, tais como: proteínas, ácidos nucleicos, e até células inteiras. Além disso, hidrogéis a base de PEG têm demonstrado serem biocompatíveis (Lee et al., 2007). O que os tornam bastante eficazes nas aplicações farmacêuticas, biológicas e bioquímicas, principalmente na liberação controlada de drogas.

Dentre os vários polímeros de origem natural existentes, destaca-se o alginato, o qual é obtido a partir do ácido algínico, encontrado nas paredes das células de algas marrons (Wang e Spencer, 1998). O hidrogel a base de alginato é comumente usado para aplicações endovasculares, no transplante de células, imobilização de enzimas, entre outras (Li et al., 2002). Sua aplicação na área biomédica deve-se a comprovada biocompatibilidade, hidrofilicidade e baixo custo (Hurteaux et al., 2005).

A bromelina é um conjunto de isoenzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromeliaceae, da qual o abacaxi (*Ananas comosus*) é o mais conhecido (Borracini, 2006). Esta proteína tem diversos usos, todos baseados em sua atividade proteolítica. A sua importância econômica está relacionada com a produção de fármacos e sua utilização na indústria alimentícia (na clarificação de cervejas, na fabricação de queijos, no amaciamento de carnes, no preparo de alimentos infantis e dietéticos, entre outros), no pré-tratamento de soja, no tratamento de distúrbios digestivos, feridas e inflamações, preparo de colágenos hidrolisados, no tratamento do couro, nas indústrias têxteis, para amaciamento de fibras e também na produção de detergentes (Draetta e Giacomelli, 1993).

Um grande número de estudos clínicos sustenta o uso de extratos contendo bromelina para o tratamento anti-inflamatório. Além da atividade anti-inflamatória, a bromelina possui ação comprovada na inibição de agregação plaquetária (Rowan et al., 1990); atividade fibrinolítica (Taussig e Nieper, 1979); antitumoral (Jeung e Foster, 1980); modulação de citocininas e do sistema imune (White et al., 1988); adjuvante na absorção de drogas (Morita et al., 1979); propriedades mucolíticas; assistência da digestão; adjuvante da cicatrização; e aumento da capacidade cardiorrespiratória (Silveira, 2007).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo dos hidrogéis

Polietileno glicol (PEG) e alginato foram misturados em tampão fosfato de sódio com diferentes pH. A solução foi colocada em contato com uma solução de cloreto de cálcio em isopropanol em uma concentração de 10%, a fim de promover a polimerização do gel. Em

seguida, a solução foi lavada com água destilada, a fim de remover o cloreto de cálcio. Foram testadas diferentes concentrações de PEG e alginato.

2.2 Absorção de água

Para os testes de absorção de água o hidrogel foi seco em estufa por 24 horas e pesado em balança analítica, em seguida foi hidratado com água destilada e pesado novamente. Para estimar a porcentagem de água absorvida dividiu-se o peso do gel seco pelo peso do gel hidratado.

2.3 Incorporação da bromelina no hidrogel

Primeiramente, o hidrogel foi preparado nas concentrações de PEG e alginato que melhor absorveram água, juntamente com a bromelina em concentrações 0,1% e 0,2%. Em seguida, o hidrogel foi polimerizado em solução de 10% de cloreto de cálcio em isopropanol. Após a polimerização do hidrogel, este foi liofilizado e em seguida incubado em tampão PBS a temperaturas de 25°C, 37°C e 39°C.

Posteriormente, colheu-se amostras nos tempos 0,1,2,3,4,5,10,20 e 30 minutos para realizar os testes de atividade da proteína. A atividade da bromelina foi analisada pela absorbância no espectrofotômetro.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram preparados hidrogéis com diferentes porcentagens de PEG e alginato e em diferentes pH como apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações de PEG e alginato em diferentes pH

	PEG (%)	Alginato (%)	pH
4	3,0	3,0	6,0
9	2,0	2,0	7,0
1	1,0	1,0	6,0
2	3,0	1,0	6,0
3	1,0	3,0	6,0
5	1,0	1,0	8,0
7	1,0	3,0	8,0
8	3,0	3,0	8,0
11	2,0	2,0	7,0

Os resultados da absorção de água para as diversas formulações de hidrogel estão expostos na tabela 2.

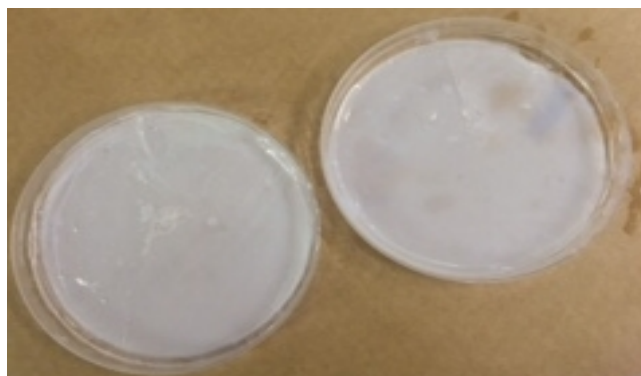
Tabela 2 – Absorção de água e degradação do hidrogel

Gel seco (g)	Gel hidratado (g)	Porcentagem (gel seco/gel hidratado) %
--------------	-------------------	--

4	0,4241	0,8878	2,093
9	0,3897	2,6793	6,875
1	0,2682	0,9142	3,408
2	0,3973	0,7624	1,918
3	0,4674	2,5261	5,404
5	0,4537	2,836	6,250
7	0,6489	4,345	6,695
8	0,7911	4,806	6,075
11	0,4502	3,0822	6,8462

Todas as formulações dos hidrogéis polimerizaram e absorveram água sem perder sua conformação conforme mostra a figura 1. Porém, os hidrogéis nas concentrações de 2:2 em pH 7 e 3:3 em pH 8 foram os mais eficazes na absorção de água, ou seja, eles conseguiram absorver uma grande quantidade de água mantendo a sua formação polimérica. Assim, a taxa de absorção desses hidrogéis foram altas indicando que nessas concentrações, eles são biocompatíveis e propícios no desenvolvimento do hidrogel imobilizado com a bromelina. O hidrogel utilizado nos métodos seguintes foi o de concentração de 2% de PEG e 2% de alginato em pH 7.

Figura 1 – Hidrogel Polimerizado.



Os resultados obtidos pela absorbância no espectrofotômetro para as diferentes concentrações de bromelina estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Atividade da Bromelina 0,1%

Bromelina 0,1%			
	25°C	37°C	39°C
t0	0,055	0,025	0,022
t1	0,041	0,022	0,023
t2	0,037	0,034	0,020
t3	0,042	0,017	0,025
t4	0,045	0,017	0,026
t5	0,047	0,014	0,023
t10	0,065	0,013	0,032
t20	0,067	0,021	0,029

t30	0,079	0,036	0,027
-----	-------	-------	-------

Tabela 4 - Atividade da Bromelina 0,2%

Bromelina 0,2%			
	25° C	37° C	39° C
t0	0,001	0,043	0,005
t1	0,017	0,054	0,009
t2	0,026	0,058	0,016
t3	0,048	0,064	0,028
t4	0,037	0,072	0,030
t5	0,048	0,066	0,031
t10	0,038	0,102	0,046
t20	0,070	0,114	0,110
t30	0,103	0,108	0,023

Com base nos resultados obtidos, a temperatura que a proteína Bromelina em ambas as concentrações teve maior atividade nos determinados tempo foi a de 25°C. A concentração de maior atividade foi de 0,2% de Bromelina. Este resultado indica que a Bromelina foi incorporada com eficiência no hidrogel e desempenha sua atividade proteica nas determinadas concentrações e temperaturas.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do trabalho sugere que os hidrogéis a base dos polímeros sintético PEG e natural alginato sejam eficientes no processo de entrega controlada de drogas, uma vez que o mesmo apresentou alta taxa de biocompatibilidade e eficiência na incorporação da bromelina, a qual possui diversas aplicações terapêuticas.

5. REFERÊNCIAS

- BORRACINI, H. M. P. *Estudo do processo de extração da bromelina por micelas reversas em sistema descontinuo*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p.76, 2006.
- BOUCARD, N.; et al. *Biomaterials*, ed. 28, p. 3478, 2007.
- COVIELLO, T.; et al. *J. Controlled Release*, 119, p.5, 2007
- DRAETTA, I. S.; GIACOMELLI, E. J. Ocorrência da bromelina e cultivares de abacaxizeiro. *Colet. ITAL*, Campinas, v.23, n.1, p.44-55, 1993.
- HURTEAUX, R.; et al. *Eur. J. Pharm. Sci*, ed.24, p.187, 2005.

- JEUNG, A.; FOSTER, S. *Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs, and cosmetics*. New York, USA: John Wiley & Sons, 1980.
- LEE, W.; LEE, T.G.; KOH, W. Grafting of Poly(acrylic acid) on the Poly(ethylene glycol) Hydrogel Using Surface-initiated Photopolymerization for Covalent Immobilization of Collagen. *Journal of Industrial Engineering and Chemistry*, v. 13, n.7, p. 1195-1200, 2007.
- LIN, C.; METTERS, A. T. *Adv. Drug Delivery Rev.*, ed.58, p.1379, 2006.
- MORITA, A.H.; UCHIDA, D.A.; TAUSSIG, S.J. Chromatographic fractionation and characterization of the active platelet aggregation inhibitory factor from bromelain. *Arch Inter Pharm Ther*, v.239, p.340-350, 1979.
- MOURA, M. R. de. *Caracterização de Matriz Polimérica de Hidrogel Termosensível Sintetizada a Partir de Alginato-Ca²⁺ e Poli(N-isopropil acrilamida), do Tipo IPN e Semi-IPN*. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.
- ROWAN, A.D.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. *Biochem. J.*, v.266, p.869-875, 1990.
- SEDLÁKOVÁ, Z.; BOUCHAL, K.; ILAVSKÝ, M. *Polymer Gels and Networks*, ed.6, p. 163, 1998.
- SILVEIRA, E. *Purificação e Caracterização de Bromelina a Partir do Extrato Bruto de Ananas comosus por Adsorção em Leito Expandido*. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p. 74, 2007.
- TAUSSIG, S.J.; NIEPER, H.A. Bromelain: its use in prevention and treatment of cardiovascular disease, present status. *J IAPM*, v.6, p.139-151, 1979.
- WANG, X.; SPENCER, G. *Polymer*, ed.39, p.2759, 1998.