

Estudio de hinchamiento “*in vitro*” y evaluación preliminar de biocompatibilidad de hidrogeles de poli(acrilamida-co-ácido metacrílico)

JORGE LUIS ESCOBAR IVIRICO¹, LISSETTE AGÜERO LUZTONÓ¹
DIONISIO ZALDIVAR SILVA¹ Y ELENA RAMÍREZ².

¹Grupo de Hidrogeles, Departamento de Química Macromolecular, Centro de Biomateriales,
Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba,

²Laboratorio clínico, Hospital Clínico Quirúrgico “Manuel Fajardo”, Ciudad de La Habana, Cuba.

Resumen

Los hidrogeles son redes poliméricas compatibles con el agua, los cuales pueden aumentar varias veces su volumen sin perder su forma. Las aplicaciones de este tipo de material dependen del grado de hinchamiento máximo y de las propiedades mecánicas que presentan.

En el presente trabajo se describe la síntesis de los hidrogeles mediante la copolimerización radicalica de Ácido metacrílico (AM) con Acrilamida (AA), en solución acuosa a 60°C utilizando persulfato de potasio como iniciador y N,N'-metilenoisacrilamida como entrecruzante. El objetivo principal del trabajo fue estudiar la influencia de la composición de los copolímeros sobre el proceso de hinchamiento en condiciones fisiológicas y la evaluación preliminar de biocompatibilidad de estos materiales en suero humano. Los resultados indican que para los primeros tiempos de hinchamiento las muestras cumplen satisfactoriamente el modelo Fickiano de la difusión y para los tiempos superiores la cinética de difusión de segundo orden propuesta por Schott.

Por otro lado también ha sido investigada la biocompatibilidad de los hidrogeles determinando algunos parámetros bioquímicos de suero humano. Para el análisis de las muestras, éstas fueron incubadas en 10 diferentes sueros humanos por 48 horas a la temperatura de 10°C. Se determinaron los parámetros antes del estudio, después de sumergidas las muestras en el suero a las 24 horas y posteriormente a las 48 horas. Los resultados obtenidos nos permiten afirmar que no hay diferencias significativas entre las muestras antes y después del estudio y pudiendo concluir que los hidrogeles obtenidos son biocompatibles.

Summary

The hydrogels are compatible polymeric nets with water, which can increase several times their volume without losing their form. The applications of this type of material depend on the degree of swelling maximum and on the mechanical properties that they present.

In this work it is described the synthesis of the hydrogels by means of the radicalic copolymerization of methacrylic acid (MA) with Acrylamide (AA), in watery solution at 60°C using potassium persulfate like initiator and N,N'-methyleneisacrilamide like cross-linker. The main objective of the work is to study the influence of the copolymer composition on the swelling process in physiologic conditions and the preliminary evaluation of biocompatibility of these materials in human serum. The results indicate that in the first steps of swelling the samples complete satisfactorily the Fickian behavior of the diffusion and for the superior times the diffusion kinetics of second order proposed by Schott.

On the other hand the hydrogels biocompatibility has also been investigated determining some biochemical parameters of human serum. To make analysis of the samples, these were incubated in 10 different human serums for 48 hours at the temperature of 10°C. The parameters were determined before the study, after having submerged the samples in the serum at the 24 hours and later at the 48 hours. The results obtained allow us to say that there are not significant differences before the samples or after so we conclude that the hydrogels obtained are biocompatible.

Keywords: Swelling, Hydrogels, Methacrylic Acid, Acrylamide, Biocompatibility

Introducción

Los polímeros en la actualidad pertenecen al grupo más amplio de los biomateriales debido a su gran versatilidad y a la amplia gama de propiedades que ofrecen, los cuales han mostrado gran biocompatibilidad en sangre, tejidos, células etc., en el cuerpo humano. Dentro de los biomateriales juegan un papel relevante los polímeros hidrofílicos (hidrogeles)¹⁻¹⁰ materiales con características blandas y porosas. Estos materiales absorben grandes cantidades de fluidos, hinchándose hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento. Estos hidrogeles se aplican principalmente en áreas como la *Medicina, Bioingeniería, Industria Farmacéutica y la Agricultura* donde existen grandes intereses en desarrollar hidrogeles que permitan liberar sustancias activas de la forma más eficiente. Muchos hidrogeles son obtenidos a partir de polímeros sintéticos que muestran una alta biocompatibilidad pudiendo ser usados como sistemas de liberación controlada de principios activos.

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de biocompatibilidad de los sistemas copoliméricos de Acrilamida (AA) y Ácido Metacrílico (AM), preparados mediante polimerización radicalica en solución acuosa, para su evaluación futura como sistema de liberación controlada de principios activos.

Materiales y métodos

Las reacciones de copolimerización se llevaron a cabo en ampulas de vidrio selladas a vacío utilizando como monómeros acrilamida (Fluka) y ácido metacrílico (Fluka). La concentración de los monómeros en solución fue de 2.3 mol/L. En la mezcla de reacción se añadió persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) (Fluka) como iniciador a una concentración 0.0074 mol/L y N,N'-metilen-bis-acrilamida (Fluka) como agente entrecruzante a la concentración de 0.013 mol/L (1%). Dicha reacción se realizó en solución acuosa a $60 \pm 0.1^\circ C$. A partir de los hidrogeles obtenidos se prepararon discos de 2 mm de espesor y 2 cm de diámetro. Las muestras se

lavarón en agua destilada durante 15 días y se secarón a temperatura ambiente hasta peso constante.

Los discos preparados, se sumergieron en 10 mL de buffer a $37^\circ C$. El estudio se llevó a cabo midiendo gravimétricamente la ganancia de solución buffer con el tiempo de inmersión. Durante el proceso de hinchamiento se observó un incremento considerable de las dimensiones de los discos. Los valores de hinchamiento reportados son los promedios de tres mediciones realizadas.

Para el estudio de biocompatibilidad las muestras fueron incubadas en 10 diferentes sueros humanos por 48 horas a la temperatura de $10^\circ C$. Se determinaron diferentes parámetros bioquímicos del suero humano antes del estudio, después de sumergidas las muestras en el suero a las 24 horas y posteriormente a las 48 horas.

Resultados y discusión

El grado de hinchamiento fue seguido gravimétricamente como indica la siguiente ecuación:

$$W = \frac{W_w - W_0}{W_0} \quad (1)$$

donde: W es el grado de hinchamiento, W_w es el peso de la película en el tiempo y W_0 es el peso de la película seca.

En la Tabla 1, se muestra la composición de mezcla de alimentación de todos los hidrogeles preparados. En dicha tabla es notable destacar el efecto de la composición del hidrogel sobre el grado de hinchamiento. Por ejemplo la muestra de composición M_1 presenta un grado de hinchamiento de 27.8 y la muestra de composición M_3 presenta un grado de hinchamiento de 20.0. Estos comportamientos pueden estar relacionados con el fuerte carácter hidrofílico proporcionado por la introducción de unidades de AM en las cadenas de copolímero. Además es importante señalar que el grupo ácido es muy soluble en agua, formando asociados moleculares por puentes de hidrógeno.

Con el objetivo de caracterizar el proceso de hinchamiento se aplicó la forma diferencial de la Ley de Fick¹¹ para películas delgadas, despreciando la difusión a través de los bordes puede expresarse como una función reducida de W_t / W_∞ y $t^{1/2}$ según la ecuación 2:

$$\frac{W_t}{W_\infty} = 4 \sqrt{\frac{Dt}{\pi l^2}} \quad (2)$$

Correspondencia:

Jorge Luis Escobar Ivirico
Grupo de Hidrogeles, Dpto. Química Macromolecular,
Centro de Biomateriales
Univ. de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba
Fax (53) 335863
E-mail jlescobar@biomat.uh.cu

Tabla 1. Composiciones de las mezclas de alimentación, grado de hinchamiento y coeficientes de difusión de los hidrogeles preparados.

MUESTRAS	% DE AM	W	COEFICIENTES DE DIFUSIÓN D (CM ² /SEG)
M ₁	95	27.8	9.89 x 10 ⁻⁶ ± 0.02172
M ₂	90	23.1	7.84 x 10 ⁻⁶ ± 0.00234
M ₃	84	20.0	6.97 x 10 ⁻⁷ ± 0.00541

donde, W_t es la ganancia de agua a un tiempo t , W_∞ es la ganancia de agua máxima, D es el coeficiente de difusión, t es el tiempo y l es el espesor de la película.

De las pendientes de las rectas de la Figura 1 se calcularon los coeficientes de difusión para cada una de las muestras sintetizadas, los cuales se ilustran en la tabla 1.

Cuando se aplicó el tratamiento de Fick para tiempos mayores de 100 horas, se observó que en todos los casos hay desviaciones de éste comportamiento. Esto concuerda con los trabajos de Schott¹² y para ello ha propuesto un modelo teórico para el hinchamiento en las películas poliméricas rígidas, ya que ha grandes hinchamientos obviamente, el espesor de la película no permanece constante y el primer orden no es aplicable. Sin embargo se ha demostrado que para el segundo orden cinético, el recíproco del average de hinchamiento (t/W) está relacionado con el tiempo de tratamiento según la ecuación 3:

$$\frac{t}{W_t} = A + Bt \quad (3)$$

En esta ecuación, A y B son dos constantes.

La Figura 2 representa el comportamiento anterior y los resultados obtenidos indican que el proceso de hinchamiento de los tiempos superiores no está gobernada por la difusión, sino por la relajación de las cadenas poliméricas.

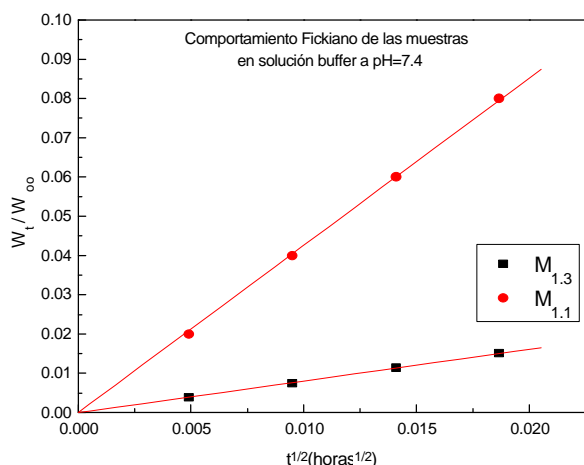


Figura 1. Tratamiento Fickiano de las muestras.

Estudio de biocompatibilidad

En el estudio de la biocompatibilidad¹³ de los hidrogeles se midió la variación de varios parámetros bioquímicos de suero humano como son: glucosa, colesterol, nitrógeno ureico en sangre, creatinina, total de proteínas, albúmina, TGP, TGO, bilirrubina directa e indirecta, sodio y potasio, al ponerlo en contacto con las muestras preparadas.

Se utilizaron 10 muestras de suero humano de diferentes individuos sanos y se les determinaron los parámetros mencionados antes de introducir el hidrogel y después a las 24 y 48h de introducido. El hidrogel se incubó a una temperatura de 10°C y los datos del estudio son un promedio de las 10 muestras de suero con tres repeticiones por cada variable. Los valores obtenidos se reportan en la Tabla 2.

Los parámetros Skewnees y Kurtosis deben estar dentro del rango de -2 y $+2$ si se trata de una distribución normal. En este caso en particular los resultados indican que las muestras se caracterizan por presentar una población con una distribución normal, lo que nos da una confiabilidad del análisis estadístico posterior.

En este caso se representa la desviación estándar y las medias. Se hicieron las pruebas de comparación de medias y la comparación de las desviaciones de todos los resultados, los cuales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras. Después de haber expuesto estos resultados pode-

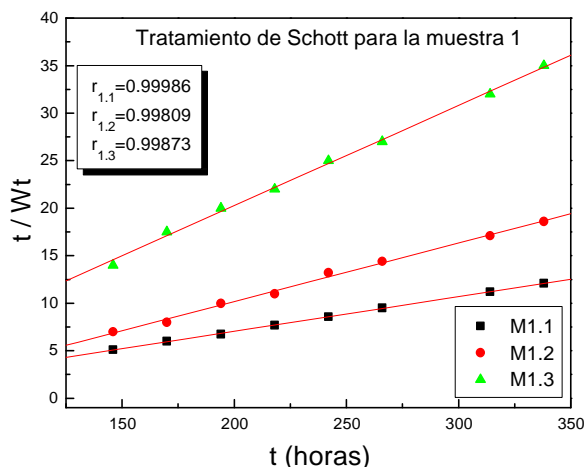


Figura 2. Tratamiento de Shott de segundo orden.

Tabla 2. Valores obtenidos de la evaluación de biocompatibilidad y su estudio estadístico

Parámetros bioquímicos	Rango de valores	Media de los valores obtenidos			Desviación Estándar		
		VN	24h	48h	VN	24h	48h
Glucosa ¹	3.3-5.5	4.80±0.337	4.88±0.281	4.90±0.282	0.4714	0.3938	0.3944
Colesterol ¹	3.8-6.5	4.67±0.231	4.94±0.313	4.96±0.175	0.3233	0.43767	0.2455
N ureico en sangre ¹	1.7-8.3	2.49±0.621	2.57±0.524	2.61±0.546	5.1380	4.2739	4.6916
Creatinina ¹	44-132	68.9±7.825	69.5±7.830	68.9±8.304	0.6690	0.8666	0.8085
Total de proteínas ²	66-87	73.9±1.667	73.8±1.297	73.5±1.079	1.5606	1.68408	1.4596
Albumina ²	38-44	42.8±3.675	43.4±3.057	43.3±3.356	10.938	10.948	11.608
TGP ³	Hasta 31	6.4±1.624	6.50±1.400	7.40±0.904	0.8685	0.7334	0.7636
TGO ³	Hasta 31	24.4±1.398	24.8±0.941	24.6±1.822	2.3309	1.8135	1.5092
Bilirrubina D ⁴	Hasta 4.3	2.79±0.747	2.90±0.619	2.76±0.578	1.9550	1.31656	2.5473
Bilirrubina I ⁴	Hasta 17	5.10±1.116	5.05±1.204	4.88±1.044	2.2705	1.2649	1.9578
Potasio (K) ¹	3.5-5	4.18±0.546	4.53±0.510	4.50±0.558	2.1108	2.079	1.7795
Sodio (Na) ¹	135-145	138±1.509	149±1.487	139±1.272	0.7641	0.7134	0.7803

mos afirmar que nuestro hidrogel presenta una buena biocompatibilidad en el período de 48 horas para ser utilizado en diferentes aplicaciones médicas.

Conclusiones

Se demostró que el grado de hinchamiento en el sistema copolimérico Acrilamida (AA) y Ácido Metacrílico (AM) se incrementa con el contenido de AM en la mezcla de alimentación. Además se pudo comprobar que el proceso de hinchamiento para todas las composiciones estudiadas en los primeros tiempos de inmersión se ajusta al modelo *fickiano* de la difusión y se observó que para tiempos superiores de inmersión obedece una cinética de difusión de segundo orden propuesta por Schott. Los resultados estadístico reportados sobre los diferentes parámetros del suero humano nos indican que nuestras muestras en un periodo de 48 horas presentan una buena biocompatibilidad.

Bibliografía

1. **Woerly S, Plant G W, Harvey A R.** Neurosci Lett, 1996, 205:197.
2. **Rill R L., Locke B R., Liu Y., Dharia J.** Electrophoresis, 1996,17:1304,.
3. **Tamburic S., Craing D.Q.** Pharm Res, 1996,13:279.
4. **Bell C L., Peppas N A.** Biomaterials, 1996,17:1203.
5. **Cauch-Rodríguez J., Deb V., Smith S R.** Biomaterials, 1996,17:2259.
6. **Plant G W., Woerly S., Harvey A R.** Exp Neural, 1997,143:287.
7. **Blanco M D., García O., Trigo R M., Teijón J M., Katime I.** Biomaterials, 1996,17:1061.
8. **Lopour P, Janatov V.** Biomaterials, 1995,16:633.
9. **Dong L C., Hoffman A S., Yan Q.** J Biomater Science Polym Ed, 199,45:473.
10. **Khare A R., Peppas N A.** J Biomater Science Polym Ed, 1993,4:275.
11. **Crank J.** The Mathematics of Diffusion. Clarendon, Oxford, (1978), p 239.
12. **Schott H J.** Macromolecular Science-Physics 1992:31.
13. **Karadag G E., Saraydin D., Centikaya S.** Biomaterial, 1996,17:67.