

AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE HIDROGÉIS DE PVP COM ÓLEO DE AÇAÍ

Ana Carolina H. R. Machado¹, Sizue O. Rogero¹, Lígia L. Miyamaru², Maria C. Santa Bárbara², Ademar B. Lugão¹

¹Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN/CNEN-SP, São Paulo (SP), Brasil.

²Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (SP), Brasil.

Resumo. O Óleo de Açaí é conhecido pela sua rica composição em ácidos graxos essenciais, principalmente o ácido oléico e o ácido linoléico, que participam do processo de regeneração da pele. Hidrogéis de Poli-vinil-pirrolidona (PVP) são utilizados como curativos por possuírem vantagens como: barreira contra microorganismos, permeabilidade, absorção da exsudação, entre outros. Aliando esses benefícios foram preparadas duas diferentes formulações de hidrogel de PVP contendo Óleo de Açaí e este trabalho objetivou avaliar a biocompatibilidade dos hidrogéis obtidos através do teste *in vitro* de citotoxicidade em cultura de células de tecido conectivo de camundongos e do teste *in vivo* de irritação cutânea primária na pele de coelhos. Os dispositivos de hidrogel de PVP contendo óleo de açaí, estudados neste trabalho, mostraram-se biocompatíveis nos testes *in vitro* de citotoxicidade e *in vivo* de irritação cutânea primária demonstrando que esses dispositivos não apresentaram toxicidade e nem irritação cutânea, indicando a possibilidade de serem utilizados em processos de regeneração de pele.

Palavras-chave: Óleo de Açaí, Biocompatibilidade, Citotoxicidade, Irritação Cutânea Primária.

1. INTRODUÇÃO

Açaí é uma palmeira nativa do Brasil utilizada como fonte de alimento devido a sua composição nutricional, rica em fitoesteróis, antocianinas, ácidos graxos essenciais (principalmente ácido linoléico e ácido oléico) e vitamina C (Lubrano *et al.*, 1994). O óleo de açaí (*Euterpe oleracea pulp oil*) possui as mesmas propriedades que o fruto e tem sido amplamente pesquisado para fins cosméticos devido ao seu poder de regeneração do tecido epitelial através da ação antioxidante, hidratante, reguladora de lipídeos e estimulante do processo de cicatrização.

Hidrogéis poliméricos são materiais caracterizados por sua grande capacidade de absorver água e diferentes fluídos biológicos que contenham grande quantidade de água. (Escobar *et al.*, 2002). Os hidrogéis de poli-vinil-pirrolidona (PVP), pela boa biocompatibilidade, podem ser utilizados na pele por apresentarem vantagens como absorver exsudação, promover barreira contra microorganismos, permitir a permeabilidade do oxigênio e controlar a liberação de agentes ativos, entre outros (Rogero *et al.*, 2003).

O teste de citotoxicidade é o primeiro teste a ser realizado para avaliar a biocompatibilidade de qualquer biomaterial. Consiste em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se alterações celulares (Rogero *et al.*, 2003). As culturas celulares indicam maior sensibilidade, reprodutibilidade, rapidez e menor custo em relação aos testes em animais (Miyamaru *et al.*, 2006).

O teste de irritação cutânea primária consiste na avaliação do potencial irritante do dispositivo na pele, através da observação e quantificação das reações que podem surgir após uma única aplicação do produto sobre a pele de coelhos (Draize *et al.*, 1944).

Associando as vantagens dos biomateriais com os benefícios do açaí, esse trabalho apresenta uma avaliação da biocompatibilidade de duas diferentes formulações de hidrogel de PVP contendo óleo de açaí, através do teste *in vitro* de citotoxicidade e do teste *in vivo* de irritação cutânea primária.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os diferentes dispositivos de hidrogel de PVP, submetidos aos testes de citotoxicidade e de irritação cutânea primária, foram obtidos por radiação ionizante, na dose de 15kGy, dos seguintes compostos: PVP K90 da GAF Corporation, Poli (etileno glicol) 300 (PEG 300) da Oxiteno, Glicerina da Oxiteno, Agar da Oxoid, Estearato de gliceril + Estearato PEG 100 (agente emulsionante) da Beraca e Óleo de Açaí da Beraca, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Composição das formulações de hidrogel de PVP.

Composição	Fórmula 1 (% p/p)	Fórmula 2 (% p/p)
PVP K90	6,0	20,0
PEG 300	1,5	-
Glicerina	-	5,0
Agar	0,5	-
Estearato de gliceril + Estearato PEG 100	0,4	-
Óleo de Açaí	1,0	1,0
Água destilada	90,6	74,0

2.1 Teste de Citotoxicidade

Para avaliar a toxicidade ou reatividade biológica dos dispositivos foi realizado o teste *in vitro* de citotoxicidade através do Método de Incorporação do Vermelho Neutro, utilizando células do tecido conectivo de camundongo NCTC da linhagem L929 da American Type Culture Collection (ATCC). *Pellets* de PVC (policloreto de vinila) foram usados como controle negativo, e como controle positivo uma solução de fenol 0,02% (Rogerio *et al*, 2003).

As células foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,1 mM de aminoácidos não essenciais e 1 mM de piruvato de sódio. Uma suspensão de células foi preparada e distribuída na microplaca de 96 poços.

No ensaio foram preparados extratos das amostras e dos controles, de acordo com a norma ISO 10993-5 e diluições destes extratos foram colocadas em contato com a cultura de células preparada na microplaca. Verificou-se a viabilidade celular através do corante vital vermelho neutro adicionado no ensaio e realizou-se a leitura de densidade óptica (DO) de cada poço num espectrofotômetro leitor de ELISA da Tecan, em 540nm.

2.2 Teste de Irritação Cutânea Primária

O teste de irritação cutânea primária foi realizado na Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene do Instituto Adolfo Lutz, segundo o Método de Draize (1944), as Normas Nacionais (INCQS/RJ, 1999) e as Normas Internacionais (ASTMF, 1996), conforme habilitação pelo protocolo PME - SQA3- 001 - Revisão 02- Ensaio de Irritação Cutânea Primária, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Utilizaram-se 6 coelhos da raça Nova Zelândia. Os animais foram tricotomizados em duas áreas de 6,25cm², 24h antes do procedimento, sendo uma das

áreas utilizada como controle. Aplicou-se homogeneamente 0,5g do produto sobre a área tricomizada, a qual foi coberta com gaze e fixada com esparadrapo, mostrado na Fig. 1. Em seguida, cobriu-se todo o corpo do animal com uma gaze. Mantiveram-se as amostras em contato com o animal durante 4 horas. Após o período de exposição o produto foi removido com água destilada. Realizou-se a análise das áreas testadas após 24 e 72 horas do início do ensaio, sendo avaliada a formação de eritema e de edema.

Na área controle não foi administrado nenhum tipo de produto.

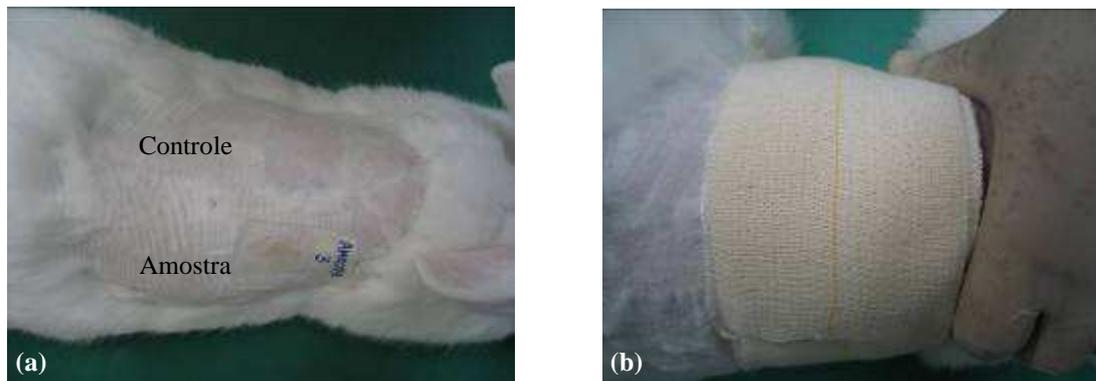


Figura 1: (a) e (b) fotografias do teste de irritação cutânea primária em pele de coelhos, fixação das amostras das formulações 1 e 2.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a média da DO de cada diluição do extrato foi calculada a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células, considerado 100% de viabilidade.

Gráficos da porcentagem de viabilidade celular em função da concentração dos extratos foram traçados e através da curva de viabilidade celular obtida é possível verificar o índice de citotoxicidade $IC_{50\%}$, que indica a concentração do extrato que provoca lise ou morte de 50% das células. Todas as amostras que apresentarem curva de viabilidade celular acima da linha do $IC_{50\%}$ são consideradas não tóxicas e aquelas que cruzarem ou estiverem abaixo da linha $IC_{50\%}$ são consideradas tóxicas e o $IC_{50\%}$ é obtido na intersecção da curva de viabilidade celular com a linha do $IC_{50\%}$.

As formulações de hidrogel de PVP contendo óleo de açaí analisadas neste estudo mostraram comportamento semelhantes ao controle negativo, apresentando as curvas de viabilidade celular acima da linha do $IC_{50\%}$, ou seja, apresentaram comportamento não citotóxico. Quanto ao controle positivo foi observado que a curva de viabilidade celular cruzou a linha do $IC_{50\%}$, e na intersecção pode ser obtido o valor do índice de citotoxicidade de 39%. Os controles são utilizados para confirmar o desempenho do teste e a toxicidade do material. As curvas de viabilidade celular dos dispositivos de hidrogel de PVP com óleo de açaí estão apresentadas na Fig. 2.

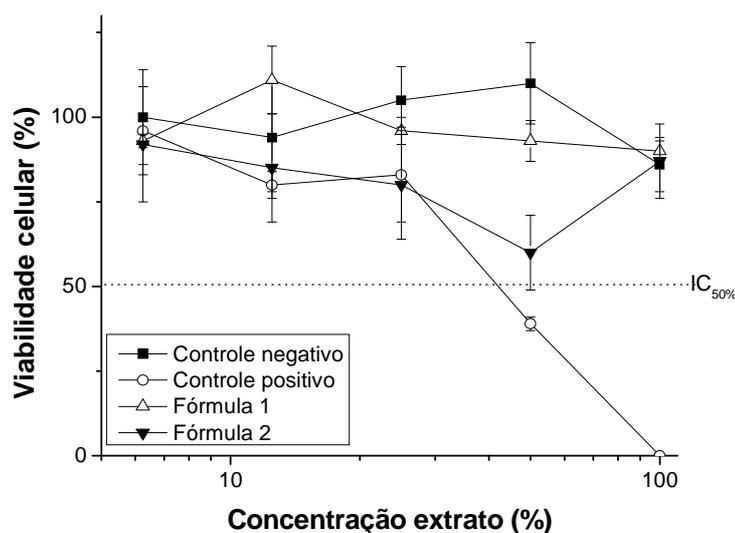


Figura 2: Curvas de viabilidade celular dos hidrogéis de PVP com óleo de açaí no teste de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

A biocompatibilidade foi verificada também no teste de irritação cutânea primária, onde de acordo com o Método de Draize, o grau de eritema e o grau de edema foram iguais à zero, o que significa pele normal e ausência de edema, respectivamente.

A similaridade dos resultados demonstra uma importante correlação entre os métodos utilizados, ressaltando a importância dos testes *in vitro* para a redução ou exclusão do uso de animais nesses testes.

4. CONCLUSÃO

Os dispositivos de hidrogel de PVP contendo óleo de açaí, estudados neste trabalho, mostraram-se biocompatíveis nos testes *in vitro* de citotoxicidade e *in vivo* de irritação cutânea primária demonstrando que esses dispositivos não apresentaram toxicidade e nem irritação cutânea, indicando a possibilidade de serem utilizados em processos de regeneração de pele.

AGRADECIMENTOS

Beraca, CNPQ e CAPES.

REFERÊNCIAS

Alencastre, J.B., Bentley, M.V.L.B., Garcia, F.S., Moragas, M. de, Viladot, J.L., Marchetti, J.M. (2006), Estudo das características e propriedades da permeação *in vitro* de micropartículas de CMC/Quitosana como sistema de liberação cutânea de vitamina E, *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 42, n. 1. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322006000100007&script=sci_arttext&tlng=en>. Acesso em: 20 de setembro de 2006.

ASTMF – American Society for Testing and Materials (1996), Standard practice for testing biomaterials in rabbits for primary skin irritation, p. 719-781.

Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944), Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 83, p. 377-390.

Escobar, J.L., Garcia, D.M., Zaldivar, D., Katime, I. Hidrogeles. Principales Características em el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos, *Rev. Ibero Americana Polímeros*, v. 3, n. 3, 2002. p. 1-25.

INCQS/RJ – Quality Health Control National Institute / Rio de Janeiro, Brasil (1999), Manual of quality, POP (standard operacional procedure) # 653330.003. Primary skin irritation assay.

ISO 10993-5 (1992), International Standard: Biological valuation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods.

Lubrano, C., Robin, J. R., Khaiat, A. (1994), Composition em acides grãs, stérols et tocophérols d'huiles de pulpe de fruits de six espèces de palmiers de Guyane. *Oléagineux*, v. 49, n.2, p. 59-65.

Miyamaru, L. L., Santa Bárbara, M. C., Cruz, A. S., Ikeda, T. I., Sakuma, H.; Zenebon, O. (2006), Estudo comparativo entre os métodos *in vivo* e *in vitro* na análise toxicológica de produtos de higiene descartáveis e sua avaliação microbiológica, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v. 5, n. 2, p. 118-122.

Rogero, S.O., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Cruz, A.S. (2003), Teste *in vitro* de Citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias, *Mat. Research*, v. 6, n. 3, p. 317-320.

Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Miyamaru, L., Cruz, A.S. (2003), Biocompatibility study of polymeric biomaterials, *Artif. Organs*, v. 27, n. 5, p. 424-427.

BIOCOMPATIBILITY STUDY OF PVP HYDROGELS WITH ACAI OIL BERRY

Ana Carolina H. R. Machado¹, Sizue O. Rogero¹, Lígia L. Miyamaru², Maria C. Santa Bárbara², Ademar B. Lugão¹

¹Centro de Química e Meio Ambiente, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, São Paulo, Brasil.

²Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

E-mail: acmachado@ipen.br

Abstract. *Acai oil berry has been known by its rich composition in essentials fatty oils mainly oleic acid and linoleic acid which participate in the skin regeneration process. Poly-vinyl-pyrrolidone (PVP) hydrogels are used as wound dressing since these materials show advantages as: microorganisms barrier, oxygen permeability, exudates absorption and others. Joining these benefits two different PVP hydrogel formulations had been prepared by incorporation of acai berry oil and the aim of this work was to evaluate those hydrogel devices biocompatibility by *in vitro* assay of cytotoxicity utilizing mouse connective tissue cell culture and *in vivo* assay of primary dermal irritation test in rabbit skin. The results of biocompatibility assay as no toxicity in the cytotoxicity assay and no skin irritation in primary dermal irritation test demonstrated that these devices of immobilized acai oil berry in PVP hydrogel showed the possibility to be used in the skin regeneration process.*

Palavras-chave: *Acai oil berry, Biocompatibility, Cytotoxicity, Skin Irritation.*