

BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* DE MEMBRANAS DE HIDROGÉIS PREPARADAS EM DIFERENTES FONTES DE RADIAÇÃO

S.O.Rogero¹, O.Z. Higa¹, M.B.Mathor², L.D.B.Machado³, A.B.Lugão², L.G.Andrade e Silva³.

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP

¹Coordenadoria de Bioengenharia, ²Coordenadoria de Engenharia Química e Ambiental, ³Coordenadoria de Aplicações na Engenharia e na Indústria

Travessa R no. 400 - Cidade Universitária - 05508-900 - Cx. Postal 11049 - SP

RESUMO

Os hidrogéis para uso tópico em queimaduras ou ulcerações de pele foram introduzidos no mercado europeu e norte-americano há mais de uma década e recentemente vem ganhando grande aceitação no mercado brasileiro. O IPEN desenvolve um projeto em cooperação com a AIEA para se obter o domínio do processo de produção de uma membrana de hidrogel à base de polivinilpirrolidona (PVP), poli(etileno glicol) (PEG) e ágar, reticulados por radiação ionizante (gama e elétrons) e que apresenta a propriedade de reter quantidades significativas de água. Foram preparadas membranas de composição única (8% PVP, 1,5% PEG, 1% ágar e água), irradiadas na dose de 25 kGy. A radiação ionizante, além de promover a reticulação do PVP, simultaneamente a esteriliza. Foram utilizadas as duas fontes industriais clássicas - raios gama de fonte de Co-60 (taxa de dose baixa) e elétrons provenientes de aceleradores eletrostáticos (taxa de dose alta, cerca de 5000 vezes maior) - com o propósito de se qualificar as membranas para ambas as opções de produção industrial. Neste trabalho são apresentados os resultados de qualificação da membrana quanto à biocompatibilidade "in vitro". Os resultados obtidos a partir dos extratos aquosos das membranas não apresentaram toxicidade nos testes realizados com células de mamíferos em cultura, independentemente da taxa de dose de irradiação utilizada na preparação das mesmas.

Palavras chave: polivinilpirrolidona, hidrogel, biocompatibilidade *in vitro*, citotoxicidade

I. INTRODUÇÃO

Os hidrogéis para uso tópico em queimaduras ou ulcerações de pele foram introduzidos no mercado europeu e norte-americano há mais de uma década e recentemente vêm ganhando grande aceitação no mercado brasileiro. O IPEN desenvolve um projeto em cooperação com a AIEA para obter o domínio do processo de produção de uma membrana de hidrogel, desenvolvida por J.M.Rosiak e colaboradores(1), que apresenta as características únicas de ser produzida a partir de polímeros comuns, portanto baratos e de processamento extremamente simples.

As membranas de hidrogel assim constituídas têm sido usadas como curativo de queimaduras e ulcerações de pele em virtude de seu conjunto excepcional de propriedades, tais como:

- contato agradável com a pele queimada, propiciando um alívio imediato da dor;
- permeabilidade ao oxigênio, favorecendo a cura;
- impermeabilidade às bactérias, impedindo a passagem destas do meio exterior para a pele lesionada;

- transparência, permitindo a avaliação da lesão sem remoção da bandagem;
- absorção de exsudato, mantendo a ferida limpa;
- aderência à pele sã e não aderência ao tecido em cicatrização, propiciando uma troca indolor e sem perda de tecido epitelizado.

O produto já se encontra em fase avançada de desenvolvimento, tendo sido atingidas propriedades físicas similares às dos demais do mercado. Houve, naturalmente, uma grande preocupação em adaptar o produto às especificações do mercado. Vários aperfeiçoamentos foram propostos, principalmente para melhorar as suas propriedades mecânicas.

Estabelecidas as condições de preparo das membranas de hidrogel para uso tópico e efetuadas as caracterizações físico-químicas(2-7), o IPEN está realizando a sua avaliação biológica utilizando testes de biocompatibilidade. A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material funcionar em uma aplicação específica frente a uma resposta apropriada do hospedeiro(8). Esta resposta apropriada, na maioria dos

casos, significa nenhuma resposta adversa de um sistema vivo na presença de tal material.

A caracterização de materiais biocompatíveis implica na obrigatoriedade do teste de citotoxicidade. A toxicidade de um material pode ser avaliada por testes *in vitro*, em animais de experimentação, incluindo testes de uso, e por estudos clínicos em seres humanos. Os testes *in vitro* são efetuados principalmente para avaliar a citotoxicidade, isto é, os danos causados pelo material às células. Dentre os vários testes de toxicidade para biomateriais, o teste de citotoxicidade é o mais sensível e sua sensibilidade depende da linhagem celular, do tipo de aplicação dos materiais no teste e da interpretação da resposta celular. O método utilizado neste trabalho compara a capacidade de formação de colônias numa cultura celular em contato com extratos dos materiais em teste, pela medida da citoletalidade. É um método simples e barato, comparado com outros de avaliação da resposta celular como dosagem de proteínas totais, dosagem de atividade enzimática, mudança morfológica da célula, que requerem experiências muito mais específicas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar a biocompatibilidade das membranas de hidrogel obtidas por radiação gama e por feixe de elétrons. O teste *in vitro* de citotoxicidade consistiu em incubar o material indiretamente numa cultura de células de mamíferos.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Preparo das membranas

Foram preparadas membranas de composição única (8% de polivinilpirrolidona, 1,5% de poli(etileno glicol), 1% de ágar e água), irradiadas na dose de 25 kGy. A radiação ionizante, além de promover a reticulação do PVP, formando a rede tridimensional que propicia a estabilidade física à membrana, simultaneamente a esteriliza. Foram utilizadas as duas fontes industriais clássicas: radiação gama de fonte de ⁶⁰Co (Membrana 1), com taxa de dose de 2,27Gy/s, e elétrons provenientes de aceleradores eletrostáticos (Membrana 2) com taxa de dose de 11,35kGy/s, com o propósito de qualificar as membranas para ambas as opções de produção industrial. As membranas foram caracterizadas anteriormente quanto às suas propriedades físicas e químicas.

Teste de Citotoxicidade(9, 10)

O método para avaliação de citotoxicidade das membranas de hidrogel utiliza uma cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO), da American Type Culture Collection, CHO k-1.

O teste foi realizado, colocando-se diluições dos extratos das membranas em contato com a cultura de células CHO em placa de Petri de 15x60 mm, utilizando-se como controle positivo uma solução de fenol 0,02% e como controle negativo um extrato de polietileno de alta densidade (HDPE). Os extratos foram preparados,

utilizando-se cerca de 1,4 cm² do material para cada mL do meio de cultura RPMI-FCS (RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de uma solução de penicilina e estreptomicina), e incubados por 24 h em estufa a 37°C. Foram feitas diluições seriadas (50, 25, 12,5, 6,25%) dos extratos das membranas, do HDPE e da solução de fenol 0,02%. As células CHO foram cultivadas em garrafa de plástico, em RPMI-FCS, em estufa com atmosfera úmida e 5% CO₂ a 37°C, até obtenção de uma monocamada com crescimento confluyente. O desprendimento das células da garrafa foi feito com a tripsinização das mesmas e foi preparada uma suspensão de 100 células/mL. Foram distribuídos 2 mL dessa suspensão em cada placa de Petri e incubadas por cerca de 5 h para adesão das células. Após esse período, o meio de cultura foi removido, e nessas placas foram adicionados 5 mL do extrato puro e de cada diluição seriada. Na placa de controle de CHO foi adicionado 5 mL do meio fresco (RPMI-FCS). Foram feitas triplicatas de cada concentração dos extratos testados. As placas foram incubadas em estufa úmida com 5% CO₂, 37°C por 7 dias. Decorrido esse tempo, o meio foi removido e as colônias formadas foram fixadas em formol 10% em salina 0,9% e coradas com corante de Giemsa. As colônias visíveis em cada placa foram contadas e comparadas com o número de colônias da placa controle de CHO. O potencial citotóxico do material avaliado foi expresso em índice de citotoxicidade (IC_{50(%)}) que corresponde à concentração do extrato que suprime 50% de formação de colônias em relação ao controle.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a porcentagem média do número de colônias visíveis em cada placa em relação à placa controle de CHO, em função da diluição do extrato. Lançando-se esses valores num gráfico semilogarítmico, pode-se calcular quantitativamente o potencial citotóxico, expresso como IC_{50(%)}, como mostra a Figura 1.

Tabela 1 - Teste de citotoxicidade das membranas de hidrogel: número de colônias visíveis nas placas de CHO, em relação à placa controle.

Concentração do extrato (%)	% número de colônias			
	Controle negativo	Controle positivo	M-1	M-2
6,25	94	87	89	78
12,5	103	73	97	96
25	106	47	80	71
50	93	26	73	78
100	98	1	68	71

M-1= membrana de hidrogel exposta a radiação gama, M-2= membrana de hidrogel irradiada com feixe de elétrons

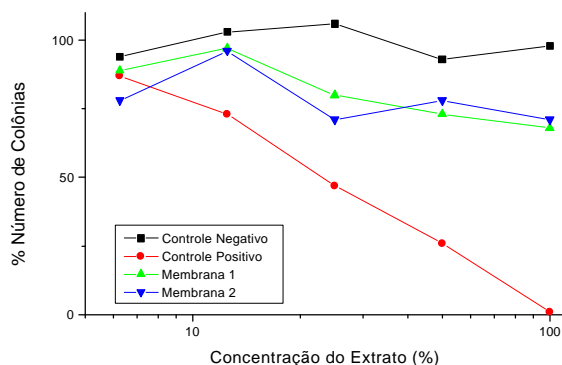


Figura 1: Curva de Supressão de Colônias.

Como se pode verificar na Fig.1, o controle positivo apresentou $IC_{50(\%)} = 23$, isto é, a solução de fenol, na diluição de 23% mata 50% das células na cultura. Por outro lado, o controle negativo, como era esperado, apresentou $IC_{50(\%)} > 100$, significando nenhuma toxicidade para as células em cultura. As membranas testadas, reticuladas tanto pela radiação gama como pelo feixe de elétrons (M1 e M2), apresentaram $IC_{50(\%)} > 100$, portanto, não citotóxicas, uma das provas *in vitro* de sua biocompatibilidade.

IV. CONCLUSÕES

O resultado do teste de citotoxicidade das membranas de hidrogel reticuladas tanto pela radiação gama, com baixa taxa de dose, como por feixe de elétrons, com taxa de dose cerca de 5000 vezes maior, demonstrou que as membranas, independentemente da fonte de radiação, não apresentaram toxicidade quando testadas em cultura de células.

Para complementar os testes *in vitro* de biocompatibilidade, será realizado o ensaio de hemólise e, em seguida, serão procedidos os ensaios *in vivo*, em animais.

REFERÊNCIAS

[1] Rosiak, J.; Rucinska-Rybus, A.; Pekala, W. - Polish Patent No.151581; US Patent No. 4871490; FRG Patent No. 3744289; GDR Patent No. 273000; UK Patent No. 2200643; Hungarian Patent No. 204866.

[2] Alvarez, M.R.; Lugão, A.B.; Miranda, A.; Nakahira, H.U.; Miranda, L.F.; Souza, A.; Moreira, E.G.; Oliveira, G.B.; Andrade e Silva, L.G., **Desenvolvimento de hidrogéis. Estudo do comportamento mecânico em função da concentração de poli(óxido de etileno)**. III Encontro Nacional de Biomateriais, 1996, São Paulo, CD-rom.

[3] Miranda, L.F.; Miranda, A.; Nakahira, H.U.; Andrade e Silva; Lugão, A.B.. **Influência da concentração de agar nas propriedades mecânicas das membranas hidrofílicas**. III Encontro Nacional de Biomateriais, São Paulo; 1996, CD-rom.

[4] Machado, L.D.B.; Siemens, R.; Lugão, A.B.; Ribeiro, G.B.; Penteadó, L.C.; Andrade e Silva, L.G.. **Desidratação isotérmica de membranas de hidrogel**. Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Química, São Paulo, 1996, AT26.

[5] Miranda, L.F.; Miranda, A.; Lugão, A.B.; Andrade e Silva, L.G.. **Estudo comparativo de diferentes normas para ensaios de tração aplicados em membranas hidrofílicas obtidas por irradiação**. Anais do VI Congresso Geral de Energia Nuclear, Rio de Janeiro, 1996, CD-rom.

[6]-Machado, L.D.B.; Miranda, L.F.; Penteadó, L.C.; Lugão, A.B.; Andrade e Silva, L.G.; Forti, M.L.; Hutzler, B.W.. **Estudo da influência da composição e da dose de radiação na desidratação de hidrogéis à base de polivinilpirrolidona**. Proceedings of 4th Meeting on Nuclear Applications, Poços de Caldas, vol..2, p.1207-1211, 1997

[7] Lugão, A.B.; Machado, L.B.B.; Miranda, L.F.; Alvernaz, M.R.; Rosiak, J.M.. **Study of wound dressing structure and hydration/dehydration properties**. Radiat. Phys. Chem., 1998, in press.

[8] Williams, D.F.. **Definitions in biomaterials. In: Progress in Biomedical Engineering**, Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5,1986.

[9] International Standard: Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10 993-5, 1992.

[10] Campos, V. E., Rogero, S. O., Higa, O. Z. And Guedes, S. M. L., **Cytotoxicity of Vulcanized Natural Rubber Latex Films by the Conventional Process with Sulphur and by the Alternative Process with Ionizing Radiation**. Proceedings of the 5th. Latin American and 3rd. Ibero American Polymer Symposium, Mar del Plata, Argentina, 2-5 December, 1996 p. 289-299.

ABSTRACT

Hydrogels to be used as wound burn dressings were introduced in European and American market more than one decade ago and recently have been succeeded in the Brazilian market. IPEN has been developing a production process under IAEA support to obtain a hydrogel membrane composed by polyvinylpyrrolidone

(PVP), polyethyleneglycol (PEG) and agar, crosslinked by ionizing radiation (gamma and electron beam), which possess the property of retaining significant amount of water. Membranes were prepared in a basic composition (8% PVP, 1.5% PEG, 1% agar and water), and irradiated at a dose of 25 kGy. Besides the PVP crosslinking the ionizing radiation promotes simultaneously the sterilization. Two classical industrial sources were used - gamma radiation from a Co-60 irradiator (low dose rate) and electrons from electrostatic accelerator (high dose rate, about 5000 times higher) - with the purpose of qualifying the membranes for the two industrial production options. In this work were presented the evaluation of the membranes in a biocompatible study *in vitro*. The results obtained from aqueous extracts of membranes did not show toxicity in the test carried out with mammal cells in culture, independently of dose rate employed in the preparation of the hydrogel membranes.