

ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE MEMBRANAS À BASE DE POLI(N-VINIL-2-PIRROLIDONA) PRODUZIDAS POR RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA.



Lílian C.Lopérgolo^{*1,2}; Janaína A.G Barros²; Sizue O. Rogero¹; Áurea S. Cruz³; Tamiko I. Ikeda³; Lígia L. Miyamaru³; Ademar B. Lugão¹; Luis H. Catalani²

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN, sorogero@net.ipen.br, São Paulo, Brasil

² Instituto de Química - USP, liliancl@net.ipen.br, São Paulo, Brasil

³ Instituto Adolfo Lutz, auracruz@ial.sp.gov.br, São Paulo, Brasil

Biocompatibility study for PVP hydrogels produced ultraviolet radiation

A hydrogel has been defined as a polymeric material that exhibits the ability to swell in water and retains a significant fraction of water within its structure, but it will not dissolve in water. Hydrogels composed of PVP produced by ultraviolet radiation are used mainly as wound dressing. In this work, hydrogels prepared in different conditions were tested and their characteristics as biocompatibility were investigated. The results showed that the hydrogels can be considered as non toxic and non hemolytic to the cell.

Introdução

Os hidrogéis são polímeros hidrofílicos reticulados por radiação que, na presença de água, absorvem uma significativa quantidade desta formando um gel elástico¹. Rosiak e colaboradores³ desenvolveram um sistema polimérico hidrófilo à base de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), polietilenoglicol (PEG) e agar, reticulado por feixe de elétrons de alta energia, com excelentes características para ser utilizado como curativo principalmente em queimaduras. Na prática clínica foi observado que a manipulação desta membrana é dificultada devido a sua baixa resistência mecânica, pois o sistema polimérico sendo composto exclusivamente por polímeros hidrófilos tende a ser fragilizado à medida que a membrana absorve água. Como melhoria das propriedades mecânicas, a utilização de reforço de fibras de polipropileno, na forma de “no-woven”, enxertadas com metacrilato de metila se mostrou adequada⁵. Como melhoria do processo, temos investigado metodologias que substituam a radiação ionizante, viabilizando sua produção por indústrias de pequeno/médio porte. Neste sentido temos estudado o comportamento do poli(N-vinil-2-pirrolidona) à ação da luz ultravioleta e a reação

de Fenton⁶. O objetivo deste trabalho foi estudar a biocompatibilidade de hidrogéis à base de PVP preparados em diferentes condições por radiação ionizante e ultravioleta e por reação de Fenton. Foram realizados teste *in vitro*, de citotoxicidade e *in vivo*, de irritação dérmica primária, para verificar a biocompatibilidade desses hidrogéis.

Experimental

Preparação dos Hidrogéis

O PVP utilizado neste trabalho foi da ACROS ORGANICS com massa molar média ponderal nominal de $M_w = 1,2 \times 10^6$. A concentração da solução aquosa de PVP foi de 80mg/mL. A irradiação procedeu em um sistema de irradiação PCQ-X1 da Ultra-Violet Products com $\lambda_{emissão} = 254\text{nm}$. As amostras foram irradiadas com dose entre 2,02 a 13,44J. Foram produzidos, também hidrogéis por reação de Fenton. As amostras foram colocadas em um extrator Soxhlet por aproximadamente 36 horas. Após a extração as membranas foram submetidas a secagem, em estufa à

60°C, até massa constante. A fração *sol* e a fração *gel* foram obtidas por meio das seguintes relações:

$$S(\%) = \left[\frac{W_g - W_o}{W_g} \right] \times 100 \quad e$$

$$G(\%) = 100 - S$$

onde: S(%) = porcentagem da fração *sol*; G(%) = porcentagem da fração *gel*; W_g = massa inicial de PVP na amostra; W_o = massa do gel seco.

Análises de Biocompatibilidade

Para o estudo da biocompatibilidade dos hidrogéis obtidos foram realizados: teste *in vitro* de citotoxicidade e teste *in vivo* de irritação dérmica primária.

No ensaio de citotoxicidade foram utilizadas células da linhagem celular NCTC-clone 929 de tecido conectivo de camundongo, originária da American Type Culture Collection [ATCC-(CCL1)]. O meio de cultura foi o de Eagle (MEM) com adição de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio (Meio-uso). Volumes de 0,2 ml de uma suspensão celular de 2×10^5 células /ml foram distribuídas em cada poço da microplaca de 96 wells. A placa foi incubada em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por cerca de 24h, para que as células obtenham confluência desejada. O teste foi realizado colocando-se o extrato do hidrogel a ser analisado em contato com as células em cultura e a toxicidade foi determinada pela medida da viabilidade celular através da incorporação do vermelho neutro.

A preparação do extrato do material a ser testado foi realizada de acordo com a norma ISO 10993-5 de 1992⁷, 0,1g do material a ser testado para cada mL do meio de cultura utilizado. No teste propriamente dito o extrato do material foi diluído em série, com o meio de cultura Meio-uso e 0,2mL de cada diluição foi colocado em contato com as células aderidas em cada poço, em triplicata. Controles positivo e negativo receberam o mesmo procedimento da amostra. A placa foi mantida em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por 24h. Decorrido este período os meios foram trocados por Meio-uso fresco contendo 50µg do corante vermelho neutro/mL⁸ e incubados por 3h para a captação do corante. A placa foi lavada com a solução de CaCl₂ em formaldeído e em seguida cada poço recebeu 0,2mL da solução de ácido acético em etanol. Após agitação por 10min foi feita medida da incorporação do vermelho neutro num leitor de ELISA com filtro de 540nm.

O ensaio de irritação dérmica primária⁹ foi realizado em coelhos albinos de raça Nova Zelândia, machos de peso corpóreo acima de 2kg, na região dorsal tricotomizada. As amostras foram aplicadas na região superior (áreas 1 e 2), e a região inferior (áreas 3 e 4) serviu de controle. Todas as áreas foram cobertas com gaze estéril e fixadas ao animal com fita adesiva hipo-

alergênica. As leituras de edema e eritema foram efetuadas após 24 e 72h.

Resultados e Discussão

Soluções aquosas de PVP submetidas a radiação UV sofrem um aumento da viscosidade. Inicialmente, este aumento é lento e quando se aproxima da dose de gelificação torna-se mais acentuado. Prosseguindo-se o processo de irradiação, observa-se a formação de uma fração polimérica insolúvel(gel). Rosiak e colaboradores demonstraram que quando esta fração insolúvel chega a 80-90%, o gel adquire propriedades físicas adequadas ao manuseio¹. A Tabela 1 mostra os resultados das análises *sol-gel* para soluções aquosas a 8% de PVP.

Tabela 1. Comportamento da fração *sol-gel* em relação a dose de radiação ultravioleta.

Dose (J)	Fração Sol(%)	Fração Gel (%)
2,02	81,65 ± 2,15	18,35 ± 2,15
2,69	76,18 ± 2,20	23,82 ± 2,20
5,37	38,85 ± 5,00	61,15 ± 5,00
8,06	23,68 ± 1,27	76,32 ± 1,27
10,75	15,40 ± 0,62	84,60 ± 0,62
13,44	20,26 ± 1,39	79,74 ± 1,39

Observa-se que com dose acima de 10,75J o hidrogel de PVP sofre uma queda na porcentagem de gel, revelando sinais de degradação.

A porcentagem relativa de viabilidade celular em diferentes concentrações do extrato das membranas foi calculada e está representada na Figura 1. A concentração de extrato que danifica a metade da população celular é conhecido como índice de citotoxicidade, expresso como IC_{50%}. O controle negativo PVC não apresentou efeito tóxico (IC_{50%} > 100) e o controle positivo, solução de fenol 0,02% apresentou toxicidade (IC_{50%} ~ 20). Todos os hidrogéis foram considerados estéreis. O hidrogel com reforço de polipropileno enxertado com 50% de metacrilato de metila⁵, também não apresentou efeito tóxico, nem mesmo em altas concentrações de extrato.

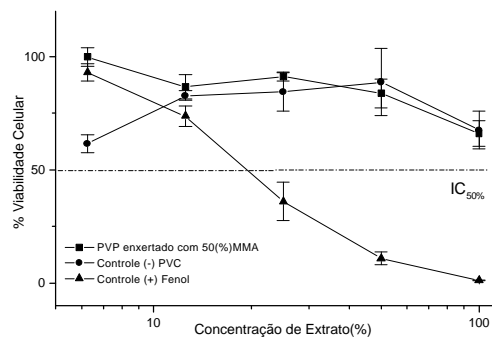


Figura 1. Curva de incorporação do vermelho neutro no ensaio de citotoxicidade do hidrogel à base de PVP, agar e PEG produzido via radiação ionizante, descrito em trabalhos anteriores⁵

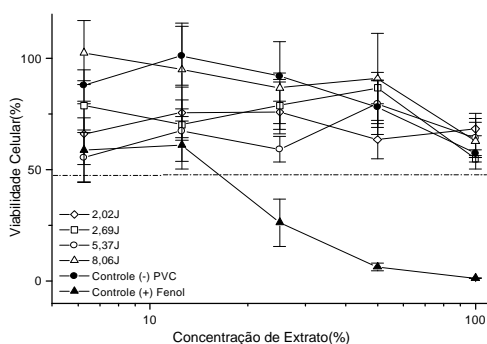


Figura 2. Curva de incorporação do vermelho neutro no ensaio de citotoxicidade de hidrogéis de PVP irradiados por UV em diferentes doses. Concentração de PVP 80mg/mL.

A Figura 2 mostra a viabilidade celular em diferentes concentrações de extrato dos hidrogéis produzidos por radiação ultravioleta. Todos os hidrogéis submetidos a diferentes doses de irradiação foram considerados não citotóxicos, pois apresentaram $IC_{50\%} > 100$. A Figura 3 ilustra os hidrogéis produzidos por reação de Fenton e também foram considerados não citotóxicos.

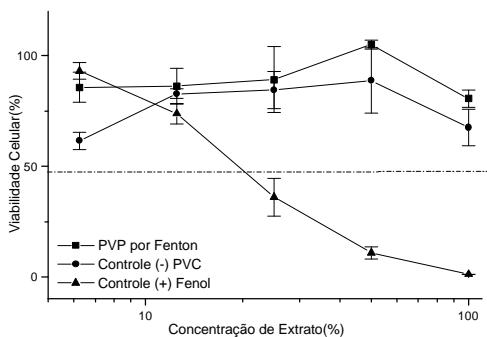


Figura 3. Curva de incorporação do vermelho neutro no ensaio de citotoxicidade do hidrogel de PVP produzido por reação de Fenton⁶. Concentração de PVP de 80mg/mL.

As amostras de hidrogel submetidas ao teste de irritação dérmica primária apresentaram índice de irritação dentro da faixa considerada satisfatória ($I = 0,0 - 0,9$), ou seja, não irritante.

Conclusões

Todas as amostras de hidrogel obtidas neste trabalho mostraram ser não tóxicas, estéreis e não irritantes à derme.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pelo apoio financeiro deste projeto.

Referências Bibliográficas

1. Rosiak, J. M., *Journal of Controlled Release*, 31, 9-19, 1994.
2. Rosiak, J., Ulasnski, P. *Radiat. Phys. Chem.*, 55, 139-151, 1999.
3. Rosiak et al. U.S.PATENT. 4,871,490. *Method of Manufacturing Hidrogel Dressings*, 1989.
4. Baccaro, L.A.; Pajewski, G. Scoccia, R. Volpe, J.M. Rosiak., *Nucl. Instrum. Meth B 105*: (1-4) 100-102, 1995.
5. Lopérgolo, LC; Catalani, LH; Machado, LDB; Lugão, AB; Rela, PR. *Radiat. Phys. Chem.*, 57, (3-6), 451-454, 2000.
6. Barros, J.A.G.; Lopérgolo, L.C.; Lugão, A.B.; Catalani, L.H. *Produção de hidrogéis a base de PVP induzida por reação de Fenton*. 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química-SBQ, Anais, 2001, *in press*.
7. ISO document 10 993-4, 1992 Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
8. Ciapetti, G.; Granchi, D.; Verri, E.; Savarino, L.; Cavedagna, D.; Pizzoferrato, A. *Biomaterials*, 17, 1259-1264, 1996.
9. Draize, J.H., Wooddard, G.; Calvery, H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 83:377-390, 1944 in Manual de Qualidade do INCQS/FIOCRUZ-RJ, POP no. 653330.003 Ensaio de Irritação Cutânea Primária, 1999.

