

TESTE DE BIOCOMPATIBILIDADE DE FILMES DE PVP COM ADIÇÃO DE SEO [POLI(DIMETILSILOXANO)-CO-POLI(OXIDO DE ETILENO)]

Sizue O. Rogero; Áurea de Souza-Bazzi e Olga Z. Higa

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP
Supervisão de Radiobiologia - TBR
Travessa R 400 - Cidade Universitária - 05508-900 - Cx. Postal 11049

RESUMO

Filmes constituídos por polivinilpirrolidona (PVP), ágar e água reticulados por radiação ionizante, com a adição de copolímeros podem ter melhoradas suas propriedades mecânicas. Devido também à propriedade hidrofílica e supostamente biocompatível, adicionou-se o copolímero poli(dimetilsiloxano-co-óxido de etileno) (SEO) em diferentes concentrações, no preparo de filmes de PVP por meio da irradiação em acelerador de elétrons a uma dose de 25 kGy. Para testar a biocompatibilidade desses filmes foi utilizado preliminarmente o teste “in vitro” de citotoxicidade, utilizando-se células de ovário de hamster chinês (CHO). Os filmes, entretanto, mostraram uma característica tóxica em cultura celular, proporcional à quantidade de SEO presente na formulação.

Palavras-chave: hidrogel, citotoxicidade, biocompatibilidade, polivinilpirrolidona

I. INTRODUÇÃO

Membranas constituídas por poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), ágar e poli(etileno glicol) (PEG), reticuladas e esterilizadas por radiação ionizante, vêm sendo comercializadas como dispositivos médicos para uso tópico. Entretanto, as membranas por serem basicamente constituídas de água (90%), apresentam baixa resistência mecânica, o que restringe bastante a sua utilização[1]. A adição de um outro polímero pode tornar as membranas mecanicamente mais resistentes através do aumento do grau de reticulação. Para este fim, foi escolhido o copolímero poli(dimetilsiloxano)-co-poli(óxido de etileno) (SEO) para substituir o PEG pois o SEO vem sendo utilizado na indústria de cosméticos e na fabricação de lentes de contato[2]. A presença da cadeia poli(óxido de etileno) no SEO confere hidrofiliabilidade ao copolímero, uma das características necessária para a confecção de membranas de PVP. Além disso, por tratarem-se de dispositivos médicos, as membranas devem apresentar propriedades biocompatíveis, significando que elas não devem provocar reações tóxicas.

No estudo da biocompatibilidade de biomateriais deve-se realizar ensaios de avaliação biológica que incluem testes *in vitro* e testes *in vivo*. Um dos primeiros ensaios *in vitro* a serem realizados é o teste de avaliação da toxicidade do biomaterial, pelo ensaio de citotoxicidade. Este ensaio consiste em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de

mamíferos e verificar a inibição do crescimento de colônias nesta cultura.

O objetivo deste trabalho foi verificar a biocompatibilidade de filmes de PVP com diferentes concentrações de SEO, utilizando-se o teste *in vitro* de citotoxicidade.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das membranas

Os reagentes utilizados foram o PVP K-90, proveniente da GAF Corporation, com massa molar $3,6 \times 10^5$ g/mol; o copolímero SEO L7604 doado pela Osi Specialties, com massa molar 4×10^3 g/mol e o ágar técnico nº 03, sob o código L.13, proveniente da Oxoid.

Foram preparadas 5 tipos de membranas onde as concentrações de PVP e de ágar foram fixadas em 6% e 0,4%, respectivamente. A concentração de SEO variou de 0 - 4,5%. As soluções aquosas de PVP, SEO e ágar foram preparadas separadamente e misturadas a uma temperatura aproximada de 60°C e colocadas em placas de Petri. Após a gelificação, as placas foram cobertas com filmes de PVC e irradiadas com uma dose de 25kGy no acelerador de elétrons Dynamitron, com energia de 1,5MeV e taxa de dose de 22,4kGy/s. Ao término da irradiação, as amostras ficaram em repouso por 24h para atingir o equilíbrio.

Teste de Citotoxicidade[3,4]

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 incubadas por 24h em estufa a 37°C. Foram feitas diluições seriadas dos extratos das membranas, do HDPE e da solução de fenol 0,02% (50, 25, 12,5, 6,25%). 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 camada de células com crescimento confluyente. O desprendimento das células da garrafa foi feito com a tripsinização das mesmas e a suspensão foi ajustada para 100 células/mL. Foram distribuídas 2mL dessa suspensão em cada placa de Petri e incubadas por cerca de 5h para adesão das células. Após esse período o meio de cultura foi removido e nessas placas foram adicionados 5mL do extrato puro e de cada diluição seriada. Na placa de controle de CHO foi adicionado 5mL 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 é a concentração do extrato que suprime 50% de formação de colônias em relação ao controle.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Souza, A. e cols[5] mostraram que a presença do SEO aumenta o grau de reticulação na membrana e o aumento da reticulação torna o material mecanicamente mais resistente.

No teste de citotoxicidade a porcentagem do número de colônias em cada placa de Petri foi calculada em relação à placa controle de CHO e é apresentada na Tabela 1. Através destes dados pode-se calcular quantitativamente o índice de citotoxicidade, projetando-se os valores da Tabela 1 num gráfico. O índice de citotoxicidade representado por IC_{50(%)}, é a concentração do extrato do material analisado que inibe em 50% a formação de colônias.

Tabela 1 - Teste de citotoxicidade das membranas de PVP-SEO: contagem do número de colônias de células CHO, em relação à placa controle.

Conc.Extr.	% Número de Colônias				
	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
Contr. Negat.	84	103	78	93	87
Contr. Posit.	76	69	52	19	1
Memb.1	88	93	94	101	97
Memb.2	83	88	86	60	3
Memb.3	79	65	19	0	0
Memb.4	15	3	0	3	0
Memb.5	17	9	0	3	3

Na Fig.1 podemos observar que a membrana de PVP, sem a presença de SEO apresenta IC_{50(%)} > 100, indicando não ser citotóxica, como o controle negativo. À medida que se aumenta a concentração de SEO na formulação, é aumentada a citotoxicidade da membrana. Estes dados indicam que a adição de SEO na formulação torna a membrana citotóxica.

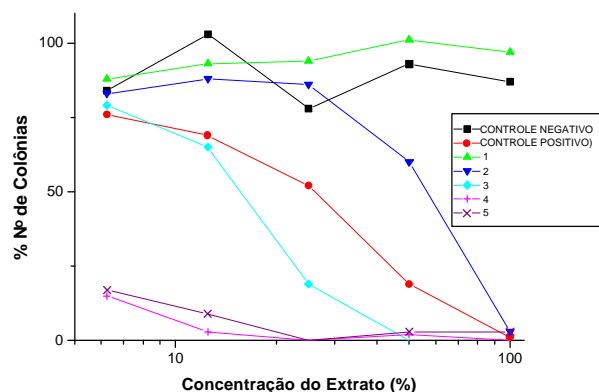


Figura 1: Curva de supressão de colônias. 1- 0% SEO; 2- 0,5% SEO; 3- 1,5% SEO; 4- 3,5% SEO e 5- 4,5% SEO.

IV. CONCLUSÕES

Apesar do SEO favorecer o aumento do grau de reticulação das membranas de PVP, melhorando a resistência mecânica das mesmas, sua adição torna as membranas citotóxicas.

AGRADECIMENTOS

- CNPq pela bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- [1] Rosiak, J.M.; Olejniczak, J.. **Medical application of radiation formed hydrogels.** Radiat.Phys.Chem. 42(4-6): 903-906, 1993.
- [2] Silwet Surfactants, Osi Specialties, p.1-20, 1994.
- [3] International Standard: Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10 993-5, 1992.
- [4] 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 1996, Mar del Plata, Argentina, 2nd.-5th December, 1996 p. 289-299.
- [5] Souza, A; Miranda, A; Hutzler, B; Andrade e Silva, L.G; Nunes, S.P; **Influência da Adição dos Copolímeros de Dimetilsiloxano e Óxido de Etileno (SEO) na Tensão de Ruptura (Tb), na porcentagem de Gel e de Intumescimento de Filmes de Poli(N-Vinil-2-Pirrolidona) (PVP) Reticulados por Feixes de Elétrons.** IV Encontro Nacional de Aplicações Nucleares, Poços de Caldas, Minas Gerais, 18-22 de Agosto, 1997 Vol. 2, p.1252-5.

ABSTRACT

Membranes composed by polyvinylpirrolidone (PVP), agar and water crosslinked by ionizing radiation, can have the mechanical properties improved by the addition of copolymers. Due to the hydrophilic property and also by the medical grade as it is supplied, the copolymer poly(dimethylsiloxane)-co-poly(ethylene oxide) (SEO) was added to the PVP membranes. Varied concentrations of SEO were used in the preparation of PVP membranes by electron beam irradiation at dose rate of 25 kGy. For testing the biocompatibility of the SEO composed membrane the *in vitro* assay of cytotoxicity, with Chinese Hamster Ovary cells (CHO), was carried out. However, the membranes showed a cytotoxic characteristic in cell culture, which was stronger as the amount of SEO increased in the composition.