

# CITOTOXICIDADE EM BLENIDAS DE QUITOSANA E POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) RETICULADAS

Felipe N. Ambrosio\*, Caue d S. Souza\*, Gustavo N. Nunes\*, José C. Moreira\*, Ana P. Romani\*,  
Christiane B. Lombello\*

\*Centro de Engenharia, Modelagem e Ciências Sociais Aplicadas (CECS) da Universidade Federal do ABC (UFABC), São Bernardo do Campo (SP), Brasil

e-mail: felipe.nogueira@ufabc.edu.br

**Abstract** – *For this work it was studied the influence of chemical cross-linking polymeric blends of 3:1 chitosan (QTS) and poly(vinyl alcohol) (PVOH) with glutaraldehyde and glyoxal at 1% and 5% of mass. The methodology adopted was the in vitro cytotoxicity assay by liquid extract, using the reduction of tetrazolium (MTT) salt to formazan crystals as means to measure cell viability. The extracts were prepared from the cross-linked blends and from the non cross-linked. The results showed that the non cross-linked blend had a cytotoxic potential, while the cross-linked ones were not cytotoxic, with no apparent variation between the cross-linking agents and its proportions for the present conditions. In conclusion, the chemical cross-linked QTS-PVOH (3:1) blends seems to have a good potential for medical uses, for example in wound dressings to promote faster healing, but others essays are required to properly assess this.*

**Palavras-chave:** *Citotoxicidade, Dispositivos Biomédicos, Poli(álcool vinílico), Quitosana, Reticulação.*

## Introdução

Lesões teciduais podem ser provocadas em acidentes, por patologias ou até mesmo como resultado de uma intervenção cirúrgica e a velocidade e eficiência de reparo dependem da extensão da lesão e do tipo do tecido afetado. O uso de dispositivos biomédicos implantáveis, como biomateriais, vem sendo cada vez mais estudado como uma forma de auxiliar na regeneração tecidual [1]. Uma dificuldade, porém, no uso de dispositivos biomédicos implantáveis é o risco de infecções por microorganismos presentes no dispositivo, o que leva à necessidade do desenvolvimento de técnicas que garantam sua esterilidade e de biomateriais que possuam naturalmente propriedades antimicrobianas [2].

Dentre os biomateriais poliméricos, membranas, ou filmes, a base de quitosana

(QTS) ou de poli (álcool vinílico) (PVOH) são candidatos para o uso em recobrimento de lesões, devido suas características mecânicas, que permitem sua conformação em diferentes morfologias para se adequarem ao tecido alvo, além de serem polímeros biocompatíveis, que não elucidam efeitos citotóxicos ou imunológicos [3-6]. Além disso a QTS ainda apresenta efeitos antimicrobianos que podem auxiliar na prevenção de infecções nas áreas lesionadas [7].

Os polímeros QTS e PVOH podem ser formados em blendas, de modo a aproveitar as propriedades mecânicas e biológicas de cada um. Essas blendas podem, ainda, serem associadas a diferentes tipos de biomoléculas e fármacos de modo a aprimorar suas propriedades biológicas para o auxílio na regeneração de lesões ou ainda trazendo novos benefícios [8].

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico *in vitro* de blendas de QTS-PVOH com reticulação química a base de glutaraldeído e glioxal e de uma blenda não reticulada.

## Materiais e métodos

**Biomateriais:** Para os biomateriais estudados foram utilizadas amostras de blendas de QTS-PVOH (3:1) não reticulada e reticuladas com 1% e com 5% em relação à massa de glutaraldeído ou de glioxal.

A QTS foi fornecida pela empresa Polymar, com massa molar ponderal média (Mw) da ordem de 100.000 g/mol e grau de desacetilação de  $80,0 \pm 5\%$ , enquanto que o PVOH foi fornecido pela empresa Celanese, conhecido como Celvol® 205, com 88% de grau de hidrólise e de massa molar numérica média Mn = 23.000 g/mol (massa molar ponderal média de Mw = 50.000 g/mol).

**Linhagem celular:** Para os ensaios *in vitro* foi utilizada a linhagem de células Vero, dependente de ancoragem e obtida originalmente a partir de tecido epitelial renal de um macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). A

cultura celular foi mantida com meio de cultura HAM-F10 suplementado com soro fetal bovino (SFB) e antibiótico, em condições recomendadas de temperatura a 37° C e com 5% de atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> [9]. Os procedimentos de troca de meio de cultura e subcultura foram realizados conforme necessário.

**Citotoxicidade por método de MTT:** O potencial citotóxico dos biomateriais foi avaliado seguindo os procedimentos descritos na norma ISO 10993-5 referentes ao ensaio *in vitro* de citotoxicidade por extrato utilizando a redução de tetrazólio (MTT) em cristais de formazam provocada pelo metabolismo celular. O preparo dos extratos seguiram a norma ISO 10993-12 [10-13].

Os extratos dos biomateriais foram preparados mantendo-os submersos em meio de cultura por 24 horas a 37° C.

Em uma placa de 96 poços foram inoculadas cerca de 10.000 células por poço e cultivadas até atingirem semi-confluência, momento o qual o meio de cultura foi substituído pelos extratos dos biomateriais.

A placa com as células e os extratos foi mantida por um período de 24 horas em condições normais de cultura, para, então, os extratos serem removidos dos poços, que foram lavados com solução tampão fosfato (PBS) 0,1 M e em cada poço foi adicionada uma solução de 0,5 mg/mL de MTT solubilizado em meio de cultura não suplementado com SFB.

A placa foi mantida com a solução de MTT em condições de cultura por 3 horas. Depois disso o MTT foi removido, os poços lavados com PBS 0,1 M e foi adicionado uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) para lisar as células e solubilizar os cristais de formazam contidos nelas. A intensidade da coloração final em cada poço é medida através de uma leitora Elisa para uma absorvância em 570 nm e é correlacionada com a viabilidade celular.

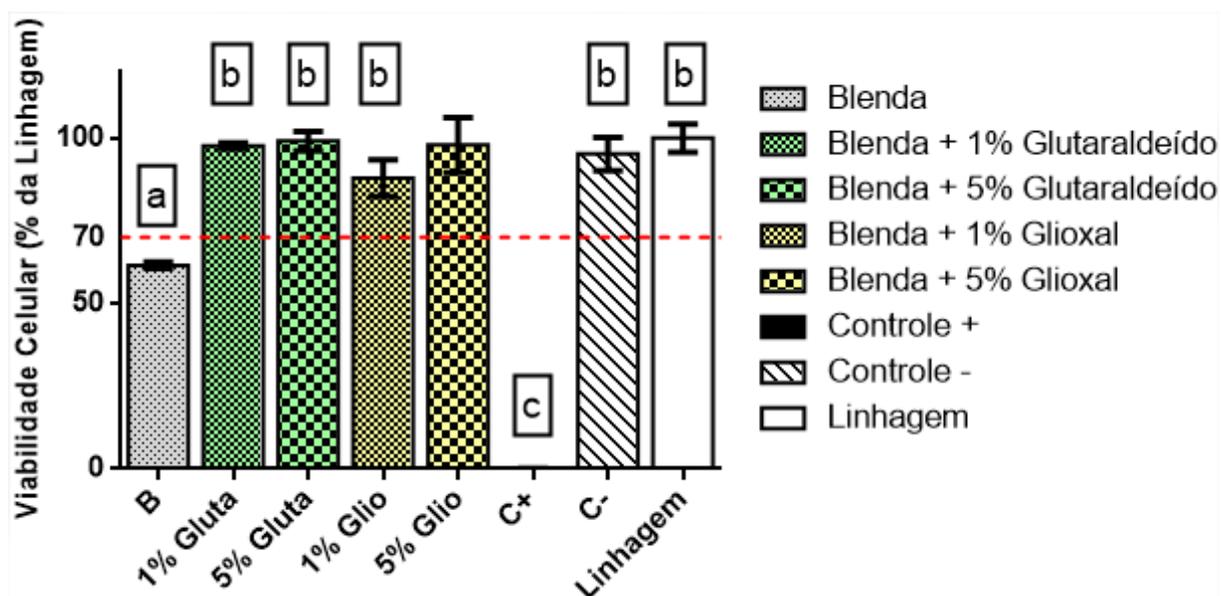
Seguindo a norma, a amostra do biomaterial testado é considerada citotóxica caso o seu extrato resulte em uma viabilidade inferior à 70% em relação ao controle.

Como controle positivo citotóxico foi utilizado látex, enquanto que para o controle negativo não citotóxico foi usado papel filtro. Também foi analisada a linhagem celular sem a adição de nenhum biomaterial, ou seja, em condição normal de crescimento.

O ensaio foi desenvolvido com as amostras em triplicata.

## Resultados

Os dados obtidos a partir da leitura da redução do MTT nas culturas celulares foram analisados pelo método estatístico ANOVA, com  $p < 0,05$ , de modo a identificar os grupos com variações estatisticamente significativas. Os resultados foram, então agrupados no Gráfico 1, mostrado a seguir.



**Gráfico 1:** Viabilidade celular da linhagem Vero após 24 horas de contato com extratos dos biomateriais das blendas de QTS-PVOH (3:1) reticuladas e não reticulada. As letras acima de cada barra indicam os grupos estatisticamente diferentes.

O extrato preparado a partir da blenda de QTS-PVOH (3:1) não reticulada causou uma diminuição da viabilidade celular abaixo de 70% em relação da linhagem celular, o que significa que teve um efeito citotóxico. Já as células que estiveram em contato com o extrato das blendas reticuladas apresentaram viabilidade similar ao controle negativo e são, portanto, não citotóxicas.

## Discussão

As blendas reticuladas não mostraram potencial citotóxico, enquanto que a não reticulada mostrou.

A reticulação química pode ser responsável por uma maior estabilidade das cadeias poliméricas nas blendas [4], o que pode ser responsável pela diminuição do potencial citotóxico, como observado no Gráfico 1.

Também observa-se que não houve variação significativa na viabilidade em relação ao agente reticulante usado e sua concentração. Pode-se propor a realização de ensaios mecânicos para determinar se dentre as diferentes condições de reticulação, uma delas se destaca como sendo mais atrativa do que as outras. No momento, porém, as quatro condições parecem trazer o mesmo benefício.

Sendo que tanto o glutaraldeído quanto o glioxal apresentam um potencial tóxico [14], é importante observar que o seu uso como agentes reticulantes não parece ter deixado resíduos tóxicos nas blendas, porém, ensaios de espectroscopia Raman e por FTIR para a observação do processo de degradação das blendas em meio fisiológico a longo prazo ainda são necessários para poder garantir a segurança do seu uso em aplicações clínicas (estudos em desenvolvimento).

## Conclusões

Através deste trabalho, o que se constatou foi que a blenda de QTS-PVOH (3:1) apresenta um potencial para ser utilizada em aplicações clínicas, tais como no recobrimento de lesões, ou ainda como biomateriais capazes de serem utilizados em dispositivos biomédicos implantáveis com a finalidade de auxiliar na prevenção de contaminação por microorganismos.

Conclui-se que as blendas reticuladas apresentaram um menor potencial citotóxico do que a blenda não reticulada e que as quatro condições de reticulação tiveram o mesmo desempenho do ponto de vista da citotoxicidade.

Para trabalhos futuros será buscada a avaliação dos efeitos da interação a longo prazo entre os biomateriais e as culturas celulares, bem como a identificação dos elementos liberados pelas blendas, o que dará maiores informações quanto à possibilidade de utilizá-las em aplicações clínicas.

## Agradecimentos

Agradecimentos à Universidade Federal do ABC (UFABC) pela disponibilização da infraestrutura laboratorial para o grupo de pesquisa.

Os autores também são gratos à Central Experimental Multiusuários (UFABC) pelo apoio experimental e aos grupos de pesquisa dos professores José Carlos Moreira e Ana Paula Romani pelo auxílio com a síntese dos biomateriais.

## Referências

- [1] NASCIMENTO MHMD, LOMBELLO CB. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. *Polímeros* 2016; 26(4):360–370.
- [2] DE CUETO-LOPEZ M, *et al.* Microbiological diagnosis of medical device-associated infections. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* Dez 2016; 34(10): 655–660.
- [3] BANORIYA D, PUROHIT R, DWIVEDI RK. Advanced Application of Polymer based Biomaterials. *Materials Today: Proceedings* 2017; 4(2): 3534–3541.
- [4] BHATTARAI N, GUNN J e ZHANG M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* Jan 2010;62(1):83–99.
- [5] PANDELE AM *et al.* Synthesis, characterization, and in vitro studies of graphene oxide/chitosan-polyvinyl alcohol films. *Carbohydrate Polymers* Fev 2014;102:813–820.
- [6] PARK SY, JUN ST e MARSH KS. Physical properties of PVOH/chitosan-blended films cast from different solvents. *Food Hydrocolloids* Jul 2001;15(4–6):499–502.
- [7] TAVARIA FK *et al.* A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica* 2013;29(1):110-120.
- [8] LEÓN K e SANTIAGO J. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de

sangre de grado. Revista de la Sociedad Química del Perú Jul 2007;73(3):158-165.

[9] ATCC. Vero (ATCC® CCL-81TM) [internet]. Available from: <<https://www.atcc.org/products/all/CCL-81.aspx>>. Acessado: 15 jul 2017.

[10] ISO. ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009

[11] ISO. ISO 10993-12:2007 - Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials. 2008

[12] MASSON AO. Estudo comparativo de ensaios de citotoxicidade aplicados à biomateriais : metodologias e condições de ensaio [Dissertação de Mestrado]. São Bernardo do Campo: Universidade Federal do ABC; 2016.

[13] FERRARAZ DC. Plasma rico em plaquetas e gelatina/soro fetal bovino: estudo comparativo de substratos e suplementação para cultura de células da linhagem Vero [Dissertação de Mestrado]. Santo André: Universidade Federal do ABC; 2015.

[14] KIEĆ-SWIERCZYŃSKA M *et al.* Occupational allergy to aldehydes in health care workers. Clinical observations. Experiments. Int J Occup Med Environ Health 1998;11(4):349-358.