

Universidad de La Habana

EVALUACIÓN QUÍMICO-BIOLÓGICA DE DIFERENTES MATERIALES UTILIZADOS COMO ENVASES DE ADHESIVOS QUIRÚRGICOS

Lic. María Elena Cañizares Graupera, Dr. Víctor Manuel Rodríguez Sosa, Dr. Juan Mariano Carral Novo y Dra. Leysis McCook Noa

RESUMEN

Se unificaron métodos de la química analítica mediante el uso de la espectroscopia infrarroja y evaluación gravimétrica de los materiales antes y después de entrar en contacto con el adhesivo y se evaluó el resultado estadísticamente mediante el análisis de la varianza y utilizando la *t* de Student. Se aprovechó el experimento para evaluar la adhesión e histotoxicidad sobre el tejido tratado. El objetivo fue implementar un método sensible y sencillo para evaluar estas interferencias. De los resultados se prevé que estos materiales no serán útiles para el envase, pues todos presentan variación significativa del peso. Se concluyó que el método es sensible y resulta adecuado para posteriores evaluaciones de otros materiales. El uso de técnicas interdisciplinarias en un mismo experimento permite integrar resultados y así obtener mayor información con un mínimo de animales de experimentación. El resultado pudiera ser de utilidad para la toxicología regulatoria, pues no se dispone de normas vigentes para este tipo de evaluación.

Palabras clave: Cianoacrilatos, adhesivos, histotoxicidad, envases.

Los alquil cianoacrilatos se han utilizado tradicionalmente como adhesivos del tejido durante más de 5 décadas en numerosos tipos de intervenciones quirúrgicas, aunque los fabricantes lo recomiendan sobre todo para cirugía estética. La tendencia durante estos largos años de experiencia ha sido aumentar el largo de la cadena alquímica, prefiriéndose el *n*-butilo, isobutilo y *n*-octilo por sus mejores resultados estéticos y disminuir los riesgos de índole toxicológica.¹⁻⁴

En la actualidad se dispone de un producto de fabricación nacional, el tisucryl, que obtuvo el registro para uso en piel con resultados similares a los análogos internacionales que emplean *n*-butilo en su composición (Cañizares ME. Tisucryl, adhesivo tisular. Tesis de Maestría en Bioquímica Básica. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, 1999).⁵ Este producto ha sido evaluado internamente mediante el uso de diferentes técnicas biológicas que siguen los patrones establecidos por las normas

internacionales para fármacos, implantables o materiales estomatológicos; sin embargo, la característica de ser un adhesivo impone restricciones y medidas especiales que hacen novedosas estas evaluaciones.

Un parámetro establecido para garantizar la calidad de los productos de la industria farmacéutica y de alimentos es conocer si existen reacciones químicas u otro tipo de interacción entre el contenido y el recipiente que los contiene, incluidas sus tapas, que pueda dañar o variar las propiedades del envase o terapéuticas del fármaco, o introducir elementos tóxicos a los productos.⁶ Las normativas para evaluar los envases para equipos médicos no han sido todavía aprobadas, por lo que no existen regulaciones vigentes al respecto.

El presente trabajo constituye una propuesta para resolver esta dificultad con metodologías de fácil desarrollo para estimular su validación. Se desarrolló un método que permitió recoger diferentes informaciones en un corto período de tiempo, el cual incluye detección de migrantes por gravimetría, influencia del envase sobre la adhesividad, deterioro del material de envase o la aparición de cuadros tóxicos al nivel del tejido seleccionado.

El objetivo es disponer de un método aplicable al control de la calidad de los envases para este tipo particular de adhesivos de uso farmacológico, sobre la base de las normativas existentes para el estudio de la biodegradación de equipos médicos.⁷

Este tipo de evaluación es fundamental cuando no se tienen conocimientos del comportamiento del envase frente al producto que contendrá o en los casos que se cambie el proveedor de los materiales de envase.

MÉTODOS

En la tabla 1 se ofrecen los datos comerciales y la procedencia de los

polietilenos evaluados como candidatos para elaborar los envases para adhesivos.

TABLA 1. Diferentes polietilenos evaluados

Número	País	Denominación
1	México	PEAD 65050 (PADMEX)
2	USA	PEBD EF-412 5M
3	México	PEBD PEMEX 170 70L
4	USA	PEAD CHERON 9412
5	USA	PEAD hay-012
6	USA	Formolene LH-012
7	USA	PEBD DOW 7008
8	USA	PEAD DOW plastics
9	México	PEBD Pemex 98 3200 351 loteM
10	México	PEAD Rigidex
11	México	PEAD Cheron 60 R texas.

Ampolletas certificadas de paredes neutras de vidrio blanco de primera clase hidrolítica con ensayo de alcalinidad entre 5,8 y 6,0, que fueron previamente evaluados por diferentes ensayos preclínicos⁸ y se acepta como apropiado.

Se erosionó cada polietileno con una lima para obtener muestras pulverizadas que permitieran la evaluación espectroscópica infrarroja por la técnica de transmisión y se prepararon pastillas de KBr que contenían entre 0,5 y 1 mg de muestra, las cuales se analizaron en un espectrofotómetro FT/IR ATI NASSON en la zona comprendida entre 4 000 y 400 cm⁻¹. Para la evaluación gravimétrica, las muestras se pesaron previamente hasta la cuarta cifra en balanza analítica *Sartorius Analytic A 120* de 4 cifras; se prepararon 6 réplicas para cada muestra y cada una se colocó dentro de una ampolleta de vidrio, se cubrieron con 2 mL del adhesivo y se dejaron permanecer selladas en frío (entre 4-8 °C) por espacio de 1 mes. Pasado este tiempo, las ampolletas se abrieron, se extrajo la muestra de polietileno, que se lavó exteriormente con dietil acetona Merk pura para análisis y se secó con papel de filtro. Se pesó y secó en

dsecadora de vacío a temperatura ambiente hasta peso constante.^{7,8}

Para la evaluación biológica se emplearon 72 ratas Wistar machos de 200 g de peso corporal procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) con sus certificados de calidad y se mantuvieron durante 6 d en el vivario, cumpliéndose las normas establecidas por la institución, acerca del cuidado y el uso de los animales de experimentación.

Se utilizaron 6 animales para cada tipo de envases, conformándose 12 grupos, 11 experimentales y un grupo control. Previo pesaje de los animales, se anestesiaron con pentobarbital sódico a razón de 60 mg/kg de peso por vía intraperitoneal y se rasuraron en la región ventral del abdomen en un área de 4 x 4 cm, desinfectándose la zona con etanol 70 %.

Los animales fueron marcados con cuidado de forma individual con ácido pícrico en regiones visibles para evitar confusiones. A todos los grupos, se les practicó una incisión en la piel en la línea media abdominal de aproximadamente 3 cm de longitud y se procedió de inmediato a cerrar la herida utilizando para cada grupo el adhesivo envasado en los diferentes polietilenos a evaluar, desplazando por encima de los bordes de la herida, la punta roma de un agitador de vidrio diseñado al efecto después de su inmersión en cada adhesivo. Se evaluaron a diario el estado general, dehiscencias, infecciones de la herida y cambios de conducta, por un período de 1 mes. Se midió la evolución del aspecto macroscópico de las heridas, adaptación de los bordes, resistencia a las infecciones o formación de edema o eritema. Al cabo de este tiempo los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia y se tomó una muestra del tejido de la piel que se conservó en formol neutro 10 % para su

evaluación histológica. Se eximieron del estudio biológico aquellos materiales que presentaron hinchamiento en la evaluación química porque no tenían posibilidades como candidatos para el envase.

Las muestras del tejido tratado se incluyeron en parafina, se cortaron a 1 mm, se colorearon con hematoxilina/eosina y se analizaron al microscopio binocular de luz, Olympus BH-2, con lente 100x. La técnica de histomorfometría, para el examen de las muestras, se llevó a cabo a ciegas por el mismo anatomopatólogo.

RESULTADOS

En el estudio espectroscópico se encontraron muy pocas señales. En todos los polietilenos aparecía una señal en $1\,600\text{ cm}^{-1}$, así como una señal en $2\,900\text{ cm}^{-1}$. En los polietilenos marcados como 2, 9, 10 y 11 se encontró una señal en $3\,400\text{ cm}^{-1}$. No se encontraron otras señales indicativas de otros grupos funcionales.

En cuanto al estudio gravimétrico, como puede apreciarse en la tabla 2, en todos los casos la *t* calculada resultó superior a la *t* crítica para un error α de 5 %, manifestándose como hinchamiento o disolución del polímero en el líquido que constituye el producto.

La incorporación de algún componente del material de los envases al adhesivo repercutió en la adhesión del producto, lo cual se reflejó en la aparición de dehiscencias de las heridas. De todos los materiales estudiados (tabla 1), solo se mantienen selladas las heridas de los animales tratados con las muestras 2, 10 y el control.

La evaluación macroscópica de las heridas fue satisfactoria en los casos donde no se produjeron dehiscencias. Los bordes quedaron bien adaptados sin aparición de edemas, eritemas o infecciones en ninguno de los casos. En la evaluación histológica

TABLA 2. Resultados del estudio gravimétrico del polietileno como material para el envase de tisucryl. Cada muestra se refiere al promedio entre 6 replicas, t crit. = 2,57 para un error a de 5 %

Muestra de las heridas	P ₁	P ₂	T de Student calculada	Dehiscencia
1*	0,0485 ± 0,008	0,0559 ± 0,006	2,82	No procede
2	0,0571 ± 0,004	0,0514 ± 0,007	2,66	0
3	0,1009 ± 0,003	0,0887 ± 0,017	2,89	4
4	0,0504 ± 0,006	0,0361 ± 0,011	4,69	6
5	0,0511 ± 0,010	0,0370 ± 0,018	2,81	4
6	0,0631 ± 0,007	0,0546 ± 0,007	3,37	4
7*	0,0846 ± 0,008	0,1025 ± 0,013	4,86	No procede
8*	0,0800 ± 0,012	0,0913 ± 0,009	3,13	No procede
9*	0,0638 ± 0,003	0,0752 ± 0,003	11,4	No procede
10	0,0569 ± 0,003	0,0515 ± 0,004	4,32	0
11*	0,0630 ± 0,0006	0,0560 ± 0,004	6,54	2
control	-	-	-	0

*: materiales que presentaron hinchamiento, **: material semipolarizado en el envase, P₁: peso de la muestra, previo al experimento, P₂: peso de la muestra, después del experimento.

no se encontraron daños al tejido que indicaran rechazo al material en la zona evaluada.

DISCUSIÓN

Las señales que se encontraron en el IR son esperables en el material que se está evaluando. La señal en 1 600 cm⁻¹ corresponde a los grupos vinilo residuales de la polimerización del polietileno y la señal en 2 900 cm⁻¹ es característica de las vibraciones de valencia de los enlaces carbono-hidrógeno del esqueleto de la cadena carbonada. La señal en 3 400 cm⁻¹, típica de la frecuencia de estrechamiento -NH de aminas puede deberse a los residuos incorporados del par amina-peróxido iniciador de la polimerización radicalica, mediante la cual se obtienen estos polímeros. No se encontraron otras señales indicativas de otros grupos funcionales presentes, por lo que cualquier otro aditivo en los polietilenos debe estar por debajo de 3 % en la muestra y no se detecta por este método. Casualmente se encontró que aquellos polietilenos que no interfirieron con la adhesión, coin-

ciden con los que presentan mayor concentración de amina en su composición.

La evaluación gravimétrica puso de manifiesto la pérdida o ganancia del peso de la muestra de polietileno en contacto con el adhesivo, lo cual indicó que algún componente del envase migró al adhesivo o que el adhesivo penetra e hincha el envase. El hinchamiento constituye una limitante importante a considerar, porque refleja la filtración del producto a través de los poros del envase con derrame de líquido al exterior. Aunque la pérdida del peso también pudiera llegar al extremo del deterioro a largo plazo del envase utilizado, se prefirió continuar el estudio con estos materiales. Este resultado es solo un aviso negativo, pero no definitorio. Se hace necesario confeccionar un lote pequeño de envases para verificar este parámetro antes de tomar una decisión definitiva en cuanto al uso o no de estos 2 tipos de polietilenos como envases del adhesivo.

En la evaluación histológica microscópica no se manifestaron síntomas de toxicidad al nivel evaluado. La morfología del tejido tratado fue normal al nivel de la der-

mis, que es la zona de interés para un adhesivo cutáneo. Aunque pudieran utilizarse los polietilenos 2 y 10 para confeccionar los envases, es indispensable continuar investigando otros materiales poliméricos hasta encontrar alguno donde no se detecte pérdida de peso debido al contacto con el adhesivo, ni afecte ninguno de los otros parámetros considerados.

Se concluyó que la toxicología regulatoria para equipos médicos cuenta con el juego de normas ISO 10993, pero no aparece aprobada aún ninguna para la evaluación de los envases, por lo que el presente trabajo es una propuesta para salvar esta deficiencia entre tanto se apruebe la normativa.

La metodología seleccionada requiere pocos recursos para su montaje, por lo que puede aplicarse con facilidad en diferentes laboratorios y permite evaluar los casos que

cambie el proveedor del envase. Al incorporar el estudio histológico, no requiere de gran número de animales de laboratorio para obtener resultados confiables y permite en una primera aproximación si los envases son útiles o no.

Hace posible resolver en un mismo ensayo diferentes aspectos de importancia práctica, como son la detección de migrantes, hinchamiento o degradación del envase, interferencias con la adhesión y aparición de síntomas primarios de toxicidad del tejido tratado, debido a la incorporación de los migrantes.

Se sugiere validar la metodología para utilizarla siempre que se cambien los proveedores del envase, porque la metodología industrial para la obtención de los polímeros puede ser diferente, con el uso de diferentes plastificantes u otros aditivos que puedan modificar los resultados.

SUMMARY

Analytical chemistry methods were unified by using infrared spectroscopy and gravimetric evaluation of the materials before and after getting in touch with the adhesive. The results were statistically evaluated by analyzing the variance and using the t student test. The experiment was availed to evaluate the adhesion and histotoxicity in the treated tissue. The objective was to implement a sensitive and simple method to assess these interferences. According to the results, these materials are not useful for the container, since they all present a significant weight variation. It was concluded that the method is sensitive and adequate for further evaluations of other materials. The use of interdisciplinary techniques in the same experiment allows to integrate results and obtain more information with a minimum of lab animals. The result could be useful for the regulating toxicology, since there are no standing norms for this type of evaluation.

Key words: Cyanoacrylates, adhesives, histotoxicity, and containers.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quinn J, Wells G, Sutcliffe T, Jarmuske M, Maw J, Stiell I, et al. A randomized trial comparing octylcyanoacrylate tissue adhesive and sutures in the management of lacerations. *Jama* 1997;277(19):1527-30.
2. Quinn J, Wells G, Sutcliffe T, Jarmuske M, Maw J, Stiell I, et al. Tissue adhesive versus suture wound repair at 1 year: randomized clinical trial correlating early, 3-month, and 1-year cosmetic outcome. *Ann Emerg Med* 1998;32(6):645-9.
3. Toriumi DM, O'Grady K, Desai D, Bagal A. Use of octyl-2-cyanoacrylate for skin closure in facial plastic surgery. *Plast Reconstr Surg* 1998;102(6):2209-19.

4. Davis SC, Eaglstein WH, Cazzaniga AL, Mertz PM. An octyl-2-cyanoacrylate formulation speeds healing of partial-thickness wounds. *Dermatol Surg* 2001;27(9):783-8.
5. Cañizares, ME, Carral JM, de la Torre E. Recomendaciones para el uso del adhesivo tisular Tisuacryl. *Rev Cubana Med Mil* 2000;29(1):57-61.
6. Castiñeiras M. Control de medicamentos I. La Habana:Editorial Pueblo y Educación; 1989.
7. ISO/10993-13 (1998) Identification and quantification of degradation products from polymeric medical devices. 1998.
8. Toriumi MD, Wasim FR, Friedman M, Tardy E. Variable histotoxicity when used in a subcutaneous site: An experimental Study. *Laryngoscope* 1991;10:339-43.

Recibido: 11 de junio de 2004. Aprobado: 8 de septiembre de 2004.

Lic. *María Elena Cañizares Graupera*. Avenida Universidad s/n, entre Ronda y G, CP 10400, El Vedado, municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono 870-05-94. Correo electrónico: mcanizares@est.allende.co.cu