

# ESTUDO DE MATRIZES POLIMÉRICAS DE PVP (poli-vinil pirrolidona) PARA LIBERAÇÃO DE RESVETROL<sup>®</sup>

Roberta G. R. A. P. Momesso<sup>1</sup>, Carolina S. Moreno<sup>1</sup>, Sizue O. Rogero<sup>1</sup>,  
Tamiko I. Ikeda<sup>2</sup>, José Roberto Rogero<sup>1</sup>, Ademar B. Lugão<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN- CNEN/SP  
Av. Lineu Prestes, 2.242 – Cidade Universitária - 05508-900 - São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo, SP, Brasil  
[robertapassarelli@yahoo.com.br](mailto:robertapassarelli@yahoo.com.br)

**Resumo.** Características como a biocompatibilidade, possibilidade de incorporação de princípio ativo de natureza diversa e não toxicidade contribuíram para a ampla utilização de hidrogéis poliméricos no desenvolvimento de formulações para liberação controlada de fármacos. Resvetrol<sup>®</sup> (trans-3, 4', 5 trihidroxi estilbeno) é um polifenol, que faz parte do conjunto das fitoalexinas produzidas em resposta ao estresse por alguns espermatófitos, como as videiras. Este princípio ativo apresenta vários benefícios à saúde, como capacidade antioxidante, antiinflamatória e proteção contra doenças cardiovasculares. Este trabalho visa à obtenção de matrizes de PVP, contendo PEG ou Glicerol, reticuladas por radiação gama para serem utilizadas em sistema de liberação de Resvetrol<sup>®</sup>. As propriedades físico-químicas foram avaliadas pelos ensaios de intumescimento e fração gel. Avaliação da biocompatibilidade iniciou-se com teste in vitro de citotoxicidade. Foi realizada determinação in vitro da toxicidade de Resvetrol<sup>®</sup>, obtendo-se a dose letal 50% de 50µM.L<sup>-1</sup>. Resultados de intumescimento, fração gel e citotoxicidade das matrizes poliméricas demonstraram serem adequadas para compor um sistema de liberação. Estudos devem ser continuados para incorporação do Resvetrol<sup>®</sup> nas matrizes poliméricas estudadas.

**Palavras-chave:** Liberação controlada, PVP, Resvetrol<sup>®</sup>, Citotoxicidade.

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse pelos hidrogéis se baseia em suas características que, entre outras, podem ser destacadas a biocompatibilidade e a não toxicidade (Aouda, 2005). As propriedades apresentadas pela membrana de hidrogel, como boa adesão à pele e baixa adesão a feridas ou cicatrizes, facilidade de aplicação associadas à capacidade de incorporação de diferentes ingredientes ativos e de propiciar liberação controlada dos mesmos, permitem a ampla utilização deste tipo de matriz polimérica para aplicações biomédicas e farmacêuticas.

Uma variedade de hidrogéis obtida de materiais sintéticos ou naturais tem sido estudada para ser utilizada em dispositivos de liberação controlada de ingredientes ativos (Rogero *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004).

Em dispositivos de liberação controlada, o ingrediente ativo é liberado de forma controlada e contínua mantendo a concentração em níveis desejáveis por longos períodos, sem alcançar níveis tóxicos ou ficar abaixo do nível mínimo efetivo (Heller, 1996).

Em 1976, Langcake e Pryce detectaram em videiras (*Vitis vinifera*) a presença de um composto denominado Resveratrol (3, 4', 5-trihidróxiestilbeno). Este composto faz parte do conjunto das fitoalexinas, produzidas por alguns espermatófitos em resposta ao estresse causado por estímulos exógenos, como a radiação ultravioleta, dano mecânico ou ataque por fungos patogênicos (principalmente *Botrytis cinérea*) (Fremont, 2000; Gusman *et al.*, 2001).

Resvetrol<sup>®</sup> trata-se do trans-3, 4', 5-trihidróxiestilbeno na forma trans pura padronizada 100% ativa. Dentre as várias propriedades apresentadas por este princípio ativo, citamos a atividade antioxidante exercendo efeitos protetores em certas formas de danos oxidativos e a

capacidade antiinflamatória (Fremont, 2000; Sautter *et al.*, 2005). Propriedades estas, que tornam interessante a imobilização de Resvetrol<sup>®</sup> em membranas de hidrogel, com a finalidade de serem utilizadas topicamente em tratamentos dermatológicos, como por exemplo, no pós-pelling.

No presente trabalho foi realizado um estudo utilizando matrizes poliméricas preparadas com PVP (poli-vinil pirrolidona) e PEG (polietilenoglicol) 300 ou Glicerol, reticuladas por radiação gama, com o objetivo de obtenção de matrizes adequadas para incorporação de Resvetrol<sup>®</sup>. Estudos devem ser continuados no sentido de imobilizar o princípio ativo nas membranas estudadas e avaliar a liberação de Resvetrol<sup>®</sup>, para obtenção de um sistema de liberação que possa ser utilizado em tratamentos dermatológicos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados no preparo das matrizes foram o PVP K-90 (Kollidon<sup>®</sup>) proveniente da BASF, PEG 300 e Glicerol da Oxiteno, Agar da Oxoid, e Resvetrol<sup>®</sup> da Attivos Magistrais.

### 2.1. Preparo das matrizes poliméricas

Foram avaliados dois tipos de matrizes poliméricas com PVP K90 contendo PEG 300 ou Glicerol, conforme a Tabela. 1. As membranas foram obtidas, vertendo-se cerca de 5 ml da formulação em moldes, que foram selados e enviados para irradiação em uma fonte de raios gama de Co-60 na dose de 25kGy.

**Tabela 1.** Formulações utilizadas no preparo de matrizes poliméricas de PVP.

Matriz	Componentes	(%)
1	PVP K90	6,0
	PEG 300	1,5
	Ágar	0,5
2	PVP K90	20,0
	Glicerol	5,0

As membranas de hidrogel obtidas foram caracterizadas pelos ensaios de intumescimento, fração gel e citotoxicidade.

### 2.2. Ensaio de Intumescimento

Os ensaios de intumescimento foram realizados em triplicata utilizando solução tampão fosfato salina (PBS) pH 5 (pele) para imersão das amostras. As amostras foram imersas em 30mL de PBS durante 24h e a capacidade de absorção verificada a cada hora durante as 6 primeiras horas do ensaio e após 24h. Para o cálculo do grau de intumescimento foi utilizada a Eq. (1):

$$\% \text{ Int} = \frac{mf - mo}{mo} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

mo = massa inicial desidratada

mf = massa final

### 2.3. Ensaio de Fração Gel

Os ensaios de fração gel foram realizados em triplicata. A extração da fração solúvel foi feita em extrator Soxhlet durante 40h, utilizando água destilada como solvente. Após a extração, as amostras foram secas em estufa à temperatura de 50°C até obtenção de peso constante. Para o cálculo da fração gel foi utilizado a Eq. (2):

$$\% \text{ fração gel} = \frac{mf}{mo} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

mo = massa inicial desidratada

mf = massa final seca

### 2.4. Avaliação Preliminar de Biocompatibilidade

O ensaio *in vitro* de citotoxicidade é o primeiro teste realizado para avaliar a biocompatibilidade de um material para uso em dispositivos médicos. Depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do material pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários *in vivo*. (ISO 10993-5, 1992)

A avaliação *in vitro* da citotoxicidade foi realizada pelo método de incorporação do vermelho neutro seguindo normas internacionais (ISO 10993-5, 1992) e metodologia descrita anteriormente (Rogerio et al, 2003). Utilizou-se cultura de células da linhagem NCTC Clone 929, da American Type Culture Collection (ATCC), colocando-se os extratos dos controles positivo e negativo e das amostras de polímeros, diluídos em série em contato com uma monocamada de células cultivadas em microplaca de 96 poços. Os extratos foram obtidos pela imersão da amostra em meio de cultura celular MEM (meio mínimo de Eagle) adicionados de soro fetal bovino e aminoácidos não essenciais. Como controle positivo foi utilizada uma solução de fenol 0,02% e como controle negativo pellets de PVC (policloreto de vinila).

Os extratos após 24h de contato com as células na microplaca foram substituídos por MEM contendo o corante vital vermelho neutro, corante este que é incorporado pelas células vivas. A viabilidade celular foi calculada pelas leituras de DO em espectrofotômetro leitor de ELISA Sunrise da Tecan, em 540 nm, em relação ao controle de células no ensaio (100% viabilidade).

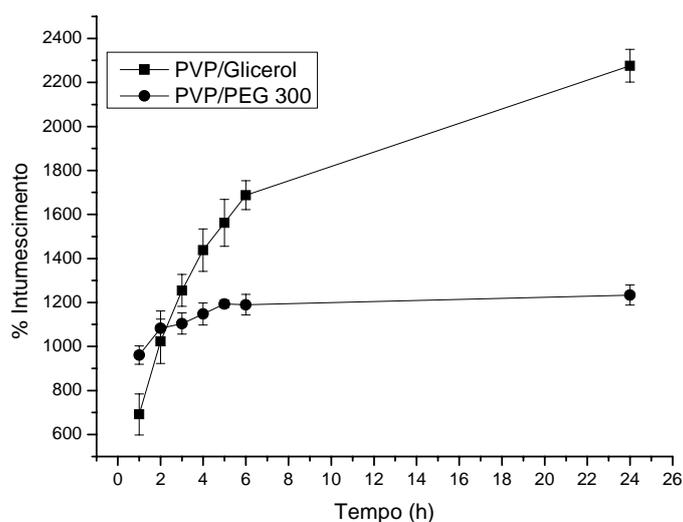
### 2.5. Verificação do nível de toxicidade do Resvetrol<sup>®</sup>

A toxicidade *in vitro* do Resvetrol<sup>®</sup> foi verificada pelo ensaio em microplaca de 96 poços contendo células de mamíferos em cultura utilizando a metodologia descrita no item 2.4, método de incorporação do corante vermelho neutro. Foram realizadas diluições em série da solução alcoólica de Resvetrol<sup>®</sup> (250µMol.L<sup>-1</sup>) em meio de cultura celular MEM (meio mínimo Eagle) e distribuídas 200µL em cada poço da microplaca. Após 24hs de incubação em estufa úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, as soluções foram substituídas por MEM contendo corante vital vermelho neutro e incubadas por mais 3hs. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas e 200µL de uma solução de extração composta por ácido acético e etanol foi adicionada em cada poço. A leitura de DO da microplaca foi efetuada no espectrofotômetro leitor de ELISA, modelo RC Sunrise da Tecan em 540nm.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As membranas obtidas após a irradiação apresentaram propriedades adequadas ao seu manuseio, transparente, com boa elasticidade e muito confortável ao toque.

Na Fig. 1 estão apresentadas as curvas de intumescimento das matrizes de PVP/PEG e PVP/Glicerol. Pode-se observar que até duas horas a membrana de PVP/PEG intumescceu mais rapidamente que a de PVP/Glicerol. A matriz de PVP/Glicerol continuou intumescendo, enquanto que o intumescimento da matriz de PVP/PEG estabilizou em torno de 6 horas e após 24h o grau de intumescimento da membrana PVP/Glicerol foi cerca de duas vezes maior. Estes resultados indicam que será possível incorporar maior quantidade do princípio ativo na membrana de PVP/Glicerol pelo método de intumescimento.



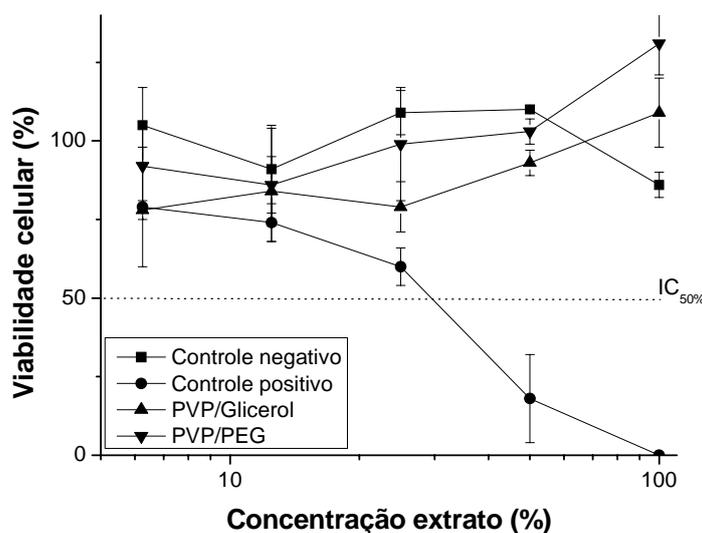
**Figura 1.** Curvas de intumescimento das matrizes poliméricas de PVP/PEG e PVP/Glicerol.

Os resultados do ensaio de fração gel estão apresentados na Tabela 2 onde pode ser observado que as matrizes de PVP/PEG e PVP/Glicerol apresentaram porcentagem de fração gel semelhantes, de 66,7 e 63,0% respectivamente, isto é, apresentaram mesmo nível de reticulação.

**Tabela 2.** Resultados dos ensaios de fração gel das matrizes de PVP/PEG e PVP/Glicerina

Amostras	Mo	mf	% fração gel
PVP/PEG	0,0798	0,0538	66,7 ± 0,6
	0,0833	0,0559	
	0,0813	0,0534	
	0,1452	0,1537	
PVP/Glicerol	0,2011	0,1351	63,0 ± 7,0
	0,1954	0,1160	

A medida da citotoxicidade das membranas de hidrogel em estudo foi realizada pela viabilidade celular que foi calculada em relação ao controle de células no ensaio, correspondente à 100%. Colocando-se em gráfico a porcentagem de viabilidade celular em função da concentração do extrato foram obtidas as curvas de viabilidade celular, apresentadas na Fig. 2. Neste gráfico pode ser obtido o índice de citotoxicidade  $IC_{50\%}$  que é a concentração do extrato que reduz em 50% a viabilidade celular no ensaio. As curvas de viabilidade celular que estiverem acima da linha do  $IC_{50\%}$  são consideradas não citotóxicas e as que cruzarem ou estiverem abaixo da linha do  $IC_{50\%}$  são consideradas tóxicas. Na Fig. 2 pode ser observado que as matrizes estudadas mostraram comportamento semelhante ao controle negativo, ou seja, não toxicidade. Somente o controle positivo, solução de fenol 0,02%, apresentou-se tóxico, com  $IC_{50\%}$  de 38 significando que a solução do controle positivo na concentração de 38% provocou a morte de 50% da população celular no ensaio.



**Figura 2.** Curvas de viabilidade celular das matrizes poliméricas de PVP/PEG e PVP/Glicerol no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

No ensaio de verificação da toxicidade do Resvetrol<sup>®</sup> foi calculada a porcentagem de sobrevivência celular em relação ao controle de células no ensaio (100% de viabilidade) semelhante ao ensaio de citotoxicidade realizado nas matrizes.

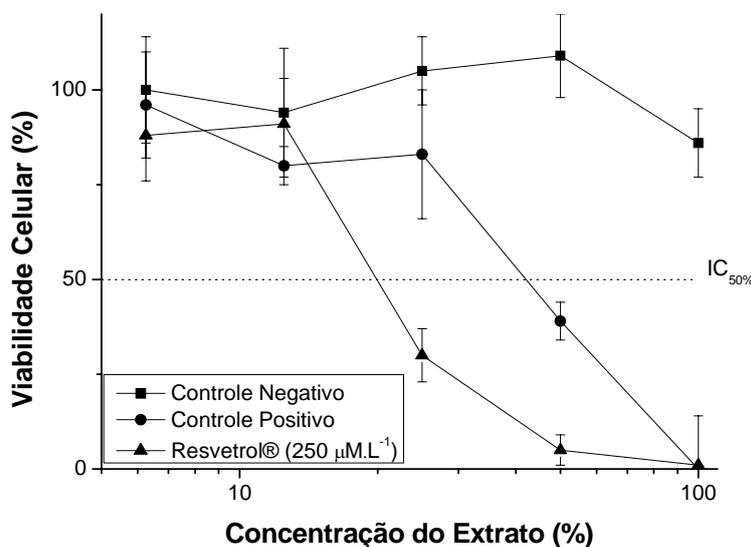
O índice de citotoxicidade ( $IC_{50\%}$ ) foi estimado em gráfico, traçando a viabilidade celular (%) em função da concentração do extrato (%), e indica qual a concentração do composto que induz 50% de morte celular.

A Fig. 3 apresenta as curvas de viabilidade celular do Resvetrol<sup>®</sup> e dos controles positivo e negativo, obtidas através do ensaio *in vitro* de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Os controles são utilizados para verificação da eficácia do ensaio. O controle negativo apresentou uma curva acima do  $IC_{50\%}$  indicando não citotoxicidade. O controle positivo apresentou  $IC_{50\%}$  cerca de 44, portanto citotoxicidade. O Resvetrol<sup>®</sup> na concentração de  $250\mu\text{Mol.L}^{-1}$  apresentou curva de viabilidade celular semelhante ao controle positivo com  $IC_{50\%}$  de 20, que corresponde a dose letal 50% (DL50) de  $50\mu\text{Mol.L}^{-1}$ .

Estudos recentes sobre a toxicidade do Resveratrol em linhagens celulares normais de diferentes origens histogenéticas de mamíferos, utilizando método de análise com MTT, apresentaram valores entre  $20\text{-}90\mu\text{M.L}^{-1}$  (Sgambato *et al.*, 2001, Clément, *et al.*, 1998).

Portanto o nível de toxicidade do Resvetrol<sup>®</sup> obtido neste trabalho está dentro da faixa de valores encontrada na literatura, sendo muito importante para a realização de estudos posteriores de incorporação do princípio ativo nas membranas avaliadas.



**Figura 3.** Curvas de viabilidade celular obtidas no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro para obtenção da DL50 do Resvetrol<sup>®</sup>.

#### 4. CONCLUSÃO

As matrizes poliméricas compostas de PVP/PEG 300 e PVP/Glicerol apresentaram características físico-químicas e ensaios preliminares de biocompatibilidade *in vitro* adequadas para comporem um sistema de liberação de Resvetrol<sup>®</sup>. O ensaio de citotoxicidade do Resvetrol<sup>®</sup> permitiu a determinação *in vitro* da dose letal 50%. Estudos serão continuados no sentido de estabelecer a capacidade e o processo de incorporação de Resvetrol<sup>®</sup> nas matrizes poliméricas de PVP/PEG e PVP/Glicerol.

#### AGRADECIMENTOS

À Embrarad pela irradiação das amostras e à estudante Rezolina Pereira dos Santos (IAL) pelo preparo das células em microplacas.

#### REFERÊNCIAS

- Aouda, F.A. (2005), “Síntese e caracterização óptica, morfológica e mecânica de hidrogéis de poliacrilamida com material eletro-óptico confinado: polímero condutor e cristais líquidos”, Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Chen, S.C., Wu, Y.C., Mi, F. L., Lin Y. H., Yu, L.C., Sung, H.W. (2004), “A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery”, *Journal of Controlled Release*. 96, 285-300.
- Clément, M.V., Hirpara, J.L., Chawdhury, S.H., Pervaiz, S. (1998), “Chemopreventive agent Resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells”, *Blood*, 92, 996-1002.
- Fremont, L. (2000), “Biological effects of resveratrol”, *Life Sciences*, 66, 8, 663-673.
- Gusman, J., Malonne, H., Atassi, G. (2001), “A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol”, *Carcinogenesis*, 22, 8, 1111-1117.

- Heller, J. (1996), "Drug Delivery Systems" in *Biomaterials Science*, Ratner, B., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E. Academic Press (ed.), 346-356.
- ISO document 10 993-5, (1992), Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
- Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Cruz, A.S. (2003), "Biocompatibility study of polymeric biomaterials", *Artificial Organs*, 27, 5, 424-427.
- Rogero, S.O., Sousa, J.S., Alário Júnior, D., Lopérgolo, L., Lugão, A.B. (2005), "Silicone crosslinked by ionizing radiation as potential polymeric matrix for drug delivery", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 236. In Proceeding of the 6<sup>th</sup> International Symposium on Ionizing Radiation & Polymers (IRaP 2004), Houffalize, Belgium, 2004, 521-525.
- Sautter, C.K., Denardin, S., Alves, A.O., Mallmann, C.A., Penna, N.G., Hecktheuer, L.H. (2005), Determinação de resveratrol em sucos de uva no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 3.
- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F.I., Cittadini, A. (2001), "Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage", *Mutation Research*, 496, 171-180.

## PVP (poly-vinyl pyrrolidone) POLIMERIC MATRICES STUDY FOR RESVETROL<sup>®</sup> RELEASE

Roberta G. R. A. P. Momesso<sup>1</sup>, Carolina S. Moreno<sup>1</sup>, Sizue O. Rogero<sup>1</sup>,  
Tamiko I. Ikeda<sup>2</sup>, José Roberto Rogero<sup>1</sup>, Ademar B. Lugão<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN- CNEN/SP  
Av. Lineu Prestes, 2.242 – Cidade Universitária - 05508-900 - São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz – Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo, SP, Brasil  
[robertapassarelli@yahoo.com.br](mailto:robertapassarelli@yahoo.com.br)

**Abstract.** *Biocompatibility, possibility of incorporation of different kind of active ingredient and non toxicity contributed to the wide polymeric hydrogels utilization in the development of controlled release formulations. Resvetrol<sup>®</sup> (trans-3, 4', 5 trihidroxi estilbeno) is a polyphenol, a type of phytoalexin produced by some spermatophytes, such as grapevines in response to injury. This active ingredient presents some benefits to the health, as antioxidant activity, anti-inflammatory and protection against cardiovascular illnesses. This work aims the development of PVP matrices, with PEG or Glycerol, cross-linked by gamma radiation to be used in Resvetrol<sup>®</sup> release systems. The physical-chemical properties were evaluated by the swelling and gel fraction assays. Evaluation of the preliminary biocompatibility was performed by in vitro test of cytotoxicity. The Resvetrol<sup>®</sup> was analyzed and the in vitro toxicity was determined, obtaining the lethal dose 50% of 50µM.L<sup>-1</sup>. Swelling, gel fraction and cytotoxicity polymeric matrices results demonstrated to be adequate to compose a release system. Studies have to be continued aiming the Resvetrol<sup>®</sup> immobilization, in the studied polymeric matrices.*

**Keywords:** *Controlled release, PVP, Resvetrol<sup>®</sup>, Cytotoxicity.*