

INCORPORAÇÃO DE RESVERATROL EM HIDROGÉIS POLIMÉRICOS

Roberta G. R. A. P. Momesso, Sizue O. Rogero, José Roberto Rogero, Ademar B. Lugão
Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN- CNEN/SP
Av. Lineu Prestes, 2.242 – Cidade Universitária - 05508-900 - São Paulo, SP, Brasil
robertapassarelli@yahoo.com.br

Resumo. *Resveratrol (3, 4', 5 trihidroxiestilbeno) é um polifenol produzido por uma grande variedade de plantas e que apresenta diversos benefícios à saúde, como a capacidade antioxidante, relacionada à prevenção do envelhecimento precoce e do câncer de pele. No entanto, este princípio ativo apresenta baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral, o que torna interessante sua aplicação tópica. As propriedades apresentadas pela membrana de hidrogel, como boa adesão à pele, biocompatibilidade e capacidade de incorporação de diferentes ingredientes ativos, permitem a ampla utilização deste tipo de matriz polimérica como sistemas de liberação de fármacos. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de dispositivos de resveratrol para serem utilizados topicamente contra o desenvolvimento de desordens cutâneas. Os dispositivos foram obtidos pela incorporação de 0,05% de resveratrol em hidrogéis poliméricos de PVP, contendo PEG ou Glicerina, e irradiados a 20 kGy. As matrizes e dispositivos foram caracterizados pelos ensaios de intumescimento e fração gel e a biocompatibilidade avaliada in vitro pelo teste de citotoxicidade. Os resultados obtidos demonstraram um alto grau de reticulação, capacidade de intumescimento e não-citotoxicidade para as matrizes estudadas. Os dispositivos mantiveram as características físico-químicas apresentadas pelas matrizes e mostraram-se não citotóxicos após incorporação do resveratrol.*

Palavras-chave: *Resveratrol, PVP, Citotoxicidade.*

1. INTRODUÇÃO

Resveratrol (3,4',5'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol, que faz parte do conjunto das fitoalexinas, substâncias produzidas em resposta ao estresse causado por estímulos exógenos, como a radiação ultravioleta, dano mecânico e ataque por fungos patogênicos (Frémont, 2000). A capacidade antioxidante recebe destaque por estar relacionada a uma série de propriedades farmacológicas, medicinais e terapêuticas apresentadas pelo resveratrol, como a prevenção e diminuição da progressão de doenças cardiovasculares, diversos tipos de câncer e do envelhecimento precoce da pele.

Apesar de diversos estudos demonstrarem a potente eficácia de resveratrol *in vitro*, tendo em vista sua baixa biodisponibilidade por via oral a aplicação tópica tem sido testada contra o desenvolvimento de desordens cutâneas como o envelhecimento precoce e o câncer de pele (Afaq *et al.*, 2003; Reagan-Shaw *et al.*, 2004).

Os hidrogéis poliméricos são materiais formados por redes de polímeros hidrofílicos, que possuem configuração tridimensional e capacidade de absorver elevada quantidade de água sem se dissolver ou perder sua forma. O interesse pelos hidrogéis na composição de sistemas de liberação de princípios ativos para aplicação tópica se baseia em suas características, das

quais podemos destacar a consistência macia e elástica, o elevado conteúdo de água, boa adesão à pele e capacidade de incorporação e liberação de diversos ativos (Rosiak, 1991; Hamidi *et al.*, 2008).

O objetivo do presente trabalho foi a incorporação de resveratrol em matrizes poliméricas compostas por poli(*N*-vinil-2-pirrolidona) (PVP) e poli(etileno glicol) (PEG) ou propano-1,2,3-triol (Glicerina) irradiadas à 20 kGy, obtendo-se dispositivos para liberação de resveratrol para serem utilizados topicamente contra o desenvolvimento de desordens cutâneas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados foram PVP K-90 (Kollidon[®]) proveniente da BASF, PEG 300 e glicerina da Oxiteno, agar da Oxoid, etanol da Vetec e resveratrol da Attivos Magistrais.

2.1. Preparo das matrizes poliméricas e dispositivos

As matrizes poliméricas foram compostas por PVP K90 contendo PEG 300 ou Glicerina, conforme apresentado na Tabela 1. Os dispositivos foram obtidos pela incorporação direta de 0,05% de resveratrol durante a preparação da matriz polimérica (PVP-RES 0,05 e GLI-RES 0,05).

Tabela 1. Composição das matrizes poliméricas.

Matriz	Componentes	(%)
PVP-PEG-OH	PVP K90	6,0
	PEG 300	1,5
	Ágar	0,5
	Álcool etílico	2,0
PVP-GLI-OH	PVP K90	20,0
	Glicerol	5,0
	Álcool etílico	2,0

As membranas e dispositivos foram obtidos, 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 20 kGy. Após obtenção foram caracterizados pelos ensaios de fração gel e intumescimento e a biocompatibilidade preliminar verificada *in vitro* pelo teste de citotoxicidade.

2.2. Ensaio de Intumescimento

A capacidade de intumescimento das matrizes e dispositivos foi verificada pela imersão de cada amostra seca em 50 mL de solução tampão fosfato salina (PBS) pH 5 (pele) durante 24 horas. A determinação do grau de intumescimento foi verificada a cada hora durante as primeiras 6 horas de ensaio e após 24 h. 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 utilizando amostras das matrizes e dispositivos (triplicata) secas em estufa até massa constante. A extração da fração solúvel foi feita em extrator Soxhlet durante 40 h, utilizando água destilada como solvente. Após a extração, as amostras foram secas em estufa 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

A biocompatibilidade preliminar dos dispositivos foi verificada *in vitro* utilizando o método de incorporação do vermelho neutro, seguindo normas internacionais (ISO 10993-1, 10993-5 1992) e metodologia padronizada (Rogerio *et al.*, 2003). *Pellets* de policloreto de vinila (PVC) foram utilizados como controle negativo e solução de fenol 0,02% como controle positivo.

Para obtenção dos extratos, as amostras e os controles foram imersos em meio mínimo de Eagle (MEM) adicionado de soro fetal bovino e aminoácidos não essenciais e incubados durante 24h. Os extratos obtidos foram diluídos em série e colocados em contato com uma monocamada de células da linhagem NCTC Clone 929 do American Type Culture Collection (ATCC) durante 24 h e após este período substituídos por solução de corante vermelho neutro, corante este que é incorporado pelas células vivas.

A toxicidade foi verificada pela viabilidade celular no ensaio pela medida da quantidade do corante vermelho neutro incorporado nas células vivas. A quantificação do corante foi realizada em espectrofotômetro modelo Sunrise da Tecan, em 540 nm e o cálculo da viabilidade celular foi feito em relação ao controle de células no ensaio (100% de viabilidade).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As matrizes poliméricas obtidas após a irradiação apresentaram propriedades adequadas ao manuseio, boa adesividade à pele e transparência. O método direto, no qual a incorporação é realizada durante a preparação da matriz polimérica mostrou ser um método eficaz para incorporação do resveratrol e os dispositivos obtidos apresentaram-se muito semelhantes às matrizes, com propriedades visuais e táteis adequadas para serem utilizados como um sistema de liberação de resveratrol.

No ensaio de intumescimento as matrizes e dispositivos foram avaliados quanto à capacidade de absorção de água. Na Fig. 1 estão apresentadas as curvas de intumescimento, podemos observar que as matrizes e dispositivos apresentaram boa capacidade de intumescimento e que durante as seis primeiras horas o intumescimento foi rápido. A matriz PVP/PEG/OH atingiu equilíbrio após 24 horas de ensaio, o que não foi observado para o

hidrogel PVP/GLI/OH que continuou intumescendo, indicando que provavelmente a presença de glicerina diminuiu a densidade de reticulação, possibilitando maior capacidade de absorção de água.

Em estudo realizado por Ajji *et al.* (2005), hidrogéis contendo 6% de PVP e irradiados a 25 kGy apresentaram grau de intumescimento de aproximadamente 1800% após 24 horas. Estes resultados foram semelhantes ao da matriz PVP/PEG/OH, cujo valor de intumescimento foi próximo a 2000%.

Os dispositivos também apresentaram capacidade de intumescimento adequada, permitindo a difusão do PBS pelo hidrogel. Os resultados foram próximos aos valores de intumescimento apresentados por suas respectivas matrizes, indicando que a presença de resveratrol não alterou o perfil de intumescimento.

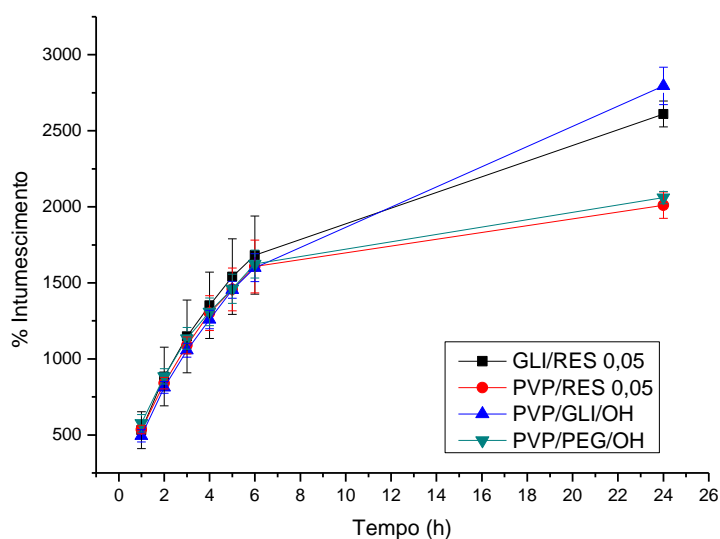


Figura 1. Curvas de intumescimento das matrizes e dispositivos.

Os resultados do ensaio de fração gel estão apresentados na Tabela 2 onde pode ser observado que a porcentagem de fração gel obtida foi de aproximadamente 80% para as matrizes e dispositivos, indicando um conteúdo de gel elevado, ou seja, um alto grau de reticulação. Os resultados obtidos foram semelhantes aos apresentados por Ajji *et al.* (2005) que estudaram matrizes de hidrogéis compostas por PVP em diferentes concentrações, PEG e ágar. Neste estudo, o hidrogel contendo 6% de PVP irradiado a 25 kGy apresentou porcentagem de fração gel igual a 81% (Ajji *et al.*, 2005).

Tabela 2. Resultados dos ensaios de fração gel das matrizes e dispositivos

Matriz	Fração gel (%)
PVP/PEG/OH	77 ± 1,8
PVP/GLI/OH	78 ± 0,7
PVP/RES 0,05	81 ± 0,2
GLI/RES 0,05	78 ± 0,9

A biocompatibilidade preliminar dos hidrogéis foi verificada *in vitro* por meio do teste de citotoxicidade. A utilização de testes *in vitro* funciona como uma triagem inicial na

primeira fase de avaliação da biocompatibilidade, minimizando o uso de animais em pesquisa. Os resultados obtidos nesta fase inicial direcionam se deve haver ou não continuidade nos testes e utilização de animais para verificação de outros critérios como irritabilidade e alergenicidade, que também determinam a biocompatibilidade.

A medida da citotoxicidade foi realizada pelo cálculo do índice de citotoxicidade $IC_{50\%}$ que determina quantitativamente o potencial citotóxico do material testado e indica a concentração do extrato que reduz em 50% a viabilidade celular no ensaio. As curvas de viabilidade celular e o $IC_{50\%}$ foram obtidos colocando-se em gráfico os valores de porcentagem de viabilidade celular em relação à concentração do extrato. As curvas de viabilidade celular obtidas estão apresentadas na Fig. 2, onde pode ser observado que as matrizes e dispositivos estudados mostraram comportamento semelhante ao controle negativo, ou seja, não toxicidade. Somente o controle positivo apresentou-se tóxico, com $IC_{50\%}$ de 43 indicando que o extrato do controle positivo na concentração de 43% provocou a morte de 50% da população celular no ensaio.

O comportamento apresentado pelos hidrogéis e controles foi semelhante ao encontrado em trabalhos publicados anteriormente que também avaliaram *in vitro* a citotoxicidade de hidrogéis de PVP (Lopérgolo *et al.*, 2003; Higa *et al.*, 1999).

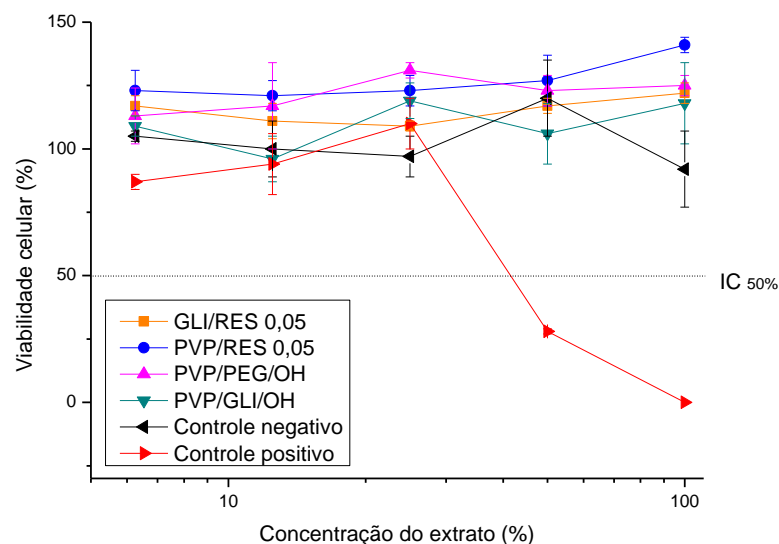


Figura 2. Curvas de viabilidade celular das matrizes e dispositivos no ensaio de citotoxicidade.

4. CONCLUSÃO

As matrizes poliméricas compostas de PVP/PEG 300 e PVP/Glicerina se mostraram adequadas para incorporação de resveratrol apresentando com boa adesividade à pele, características físico-químicas adequadas e não-toxicidade em ensaios preliminares de biocompatibilidade. Apesar da baixa solubilidade do resveratrol em água, foi possível incorporar o resveratrol pelo método direto, obtendo-se dispositivos contendo 0,05% de resveratrol com características semelhantes às das matrizes poliméricas. Estudos serão continuados no sentido de verificar se os dispositivos obtidos apresentam capacidade em liberar o resveratrol incorporado.

AGRADECIMENTOS

Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira do Centro de Tecnologia das Radiações - IPEN pela irradiação das amostras e à estudante Rezolina Pereira dos Santos do Instituto Adolfo Lutz pelo preparo das células em microplacas.

REFERÊNCIAS

- Afaq, F., Adhami, V.M., Ahmad, N. (2003), "Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1hairless mice", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 186, 28-37.
- Ajji, Z., Othman, I., Rosiak, J.M. (2005) "Production of hydrogel wound dressings using gamma radiation", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B*, 229, 375-380.
- Fremont, L. (2000), "Biological effects of resveratrol", *Life Sciences*, 66, 8, 663-673.
- Hamid, M., Azadi, A., Rafiei, P. (2008), "Hydrogel nanoparticles in drug delivery", *Advanced drug delivery reviews*, 60, 1638-1649.
- Higa, O.Z., Rogero, S.O., Machado, L.D.B., Mathor, M.B., Lugão, A.B. (1999) "Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions", *Radiation Physics and Chemistry*, 55, 705-707.
- ISO document 10 993-5, (1992), Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
- Lopérgolo, L.C., Lugão, A.B., Catalani, L.H. (2003), "Direct UV photocrosslinking of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to produce hydrogels", *Polymer*, 44, 6217-6222.
- Reagan-Shaw, S., Afaq, F., Aziz, M.H., Ahmad, N. (2004) "Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated responses by resveratrol in SKH-1 hairlessmouse skin", *Oncogene*, 23, 5151-5160.
- 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.
- Rosiak, J.M. (1991), Hydrogel Dressings. In: CLOUGH, R.C; SHALAB, S.W. "Radiation Effects on Polymers", American Chemical Society, Washington.

RESVERATROL INCORPORATION IN POLYMERIC HYDROGELS

Roberta G. R. A. P. Momesso, Sizue O. Rogero, José Roberto Rogero, Ademar B. Lugão
Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares – IPEN- CNEN/SP
Av. Lineu Prestes, 2.242 – Cidade Universitária - 05508-900 - São Paulo, SP, Brasil
robertapassarelli@yahoo.com.br

Abstract. *Resveratrol (3, 4', 5 trihydroxystilbene) is a polyphenolic produced by a wide variety of plants. This active ingredient has been shown to possess benefits for the health, such as the antioxidant capacity which is related to the prevention of aging and skin cancer. However, the oral bioavailability of resveratrol is poor and makes its topical application interesting. PVP hydrogels has been used successfully as a drug delivery system due to biocompatibility, easy dispersion of different active compound and good adhesion to the health skin. This work aims the immobilization of resveratrol in polymeric hydrogels to obtain a release device for topical use. The polymeric matrix was composed of PVP and PEG or Glycerol, irradiated at 20 kGy dose. The resveratrol devices had the same composition of polymeric matrix with addition of 0.05% resveratrol in the formulation before irradiation (one step process). The matrices and devices were physical-chemical characterized by gel fraction and swelling assays and the preliminary biocompatibility was performed by in vitro test of cytotoxicity. The matrices and resveratrol devices showed a high crosslinked degree, swelling capacity and non-toxicity.*

Keywords: *Resveratrol, PVP, Cytotoxicity*