

# BIOCOMPATIBILIDADE *IN VITRO* DE MATRIZES E DISPOSITIVOS DE HIDROGEL PARA USO EM COSMÉTICA

Roberta G. R. A. P. Momesso<sup>1</sup>, Ana Carolina H. R. Machado<sup>1</sup>, Renata Hage Amaral<sup>1</sup>, Sizue O. Rogero<sup>1</sup>, Áurea S. Cruz<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. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária – São Paulo/SP, Brasil - CEP 05508-000

<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo/SP, Brasil – CEP 01246-902

[robertapassarelli@yahoo.com.br](mailto:robertapassarelli@yahoo.com.br)

## RESUMO

Os hidrogéis têm despertado grande interesse no desenvolvimento de produtos cosméticos por apresentarem características interessantes como a biocompatibilidade. Além desta característica, existe uma similaridade de suas propriedades físicas com aquelas dos tecidos vivos tornando-os viáveis para uma variedade de aplicações, principalmente em sistema de liberação de princípios ativos. Tendo em vista o desenvolvimento de novos produtos cosméticos para a regeneração cutânea e prevenção do envelhecimento precoce da pele, este trabalho teve por objetivo avaliar a biocompatibilidade *in vitro*, por meio do ensaio de citotoxicidade, de matrizes e dispositivos de hidrogel incorporados com resveratrol e óleo de açaí. As matrizes e os dispositivos obtidos apresentaram flexibilidade, propriedades mecânicas adequadas ao manuseio e atoxicidade, demonstrando a possibilidade de serem utilizados topicamente contra o desenvolvimento de desordens cutâneas.

## 1. INTRODUÇÃO

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 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 (Hamidi *et al.*, 2008; Rosiak, 1991).

Apresentam ainda como vantagens o poder de absorver exudação, promover a barreira contra microorganismos, permitir a permeabilidade do oxigênio e serem biocompatíveis (Rogero *et al.*, 2003). O primeiro critério para verificar a biocompatibilidade de um material é avaliando seu potencial citotóxico.

O teste de citotoxicidade é uma técnica que utiliza cultura celular e determina a lise das células, inibição do crescimento celular e outros efeitos causados pelos materiais em contato direto ou indireto com a pele. Este teste consiste em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. A utilização de testes *in vitro* funciona como uma triagem inicial na primeira fase de avaliação da biocompatibilidade, evitando o uso de animais em pesquisa (ISO 10993-5, 2003).

Nesta fase inicial, os resultados obtidos avaliam a segurança dos produtos cosméticos e direcionam se deve haver ou não continuidade nos testes e a utilização de animais para verificação de outros critérios de segurança como irritabilidade e alergenidade.

Os avanços nas pesquisas científicas vêm destacando os benefícios dos ativos botânicos, com um destaque para a biodiversidade brasileira. O que antes era conhecimento empírico hoje as pesquisas comprovam e aceleram o mercado de produtos cosméticos com ativos botânicos que atendem os mais exigentes mercados internacionais.

O açaí (*Euterpe oleracea*) é uma palmeira nativa do Brasil, cultivada na Bacia Amazônica, e conhecido pelo seu fruto ser altamente nutritivo, rico em fitoesteróis, antocianinas, ácidos graxos essenciais (principalmente ácido linoléico, em torno de 12%, e

ácido oléico, em torno de 60%), vitamina C, vitamina E, manganês, cobre, bromo, zinco, proteínas e carboidratos. Seu óleo, extraído do fruto, tem sido amplamente pesquisado para fins cosméticos devido ao seu poder de regeneração do tecido epitelial por meio de sua ação antioxidante, hidratante, reguladora de lipídeos e estimulante do processo de cicatrização (Lubrano, 1996).

O 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). Este princípio ativo está presente em mais de 70 espécies de plantas, entretanto é encontrado predominantemente em cascas de uvas, que contém aproximadamente 50 a 100 µg de resveratrol por grama (Soleas *et al.*, 2002; Udenigwe *et al.*, 2008).

A atividade antiinflamatória, antioxidante e a inibição da agregação plaquetária são alguns dos efeitos biológicos benéficos apresentados pelo resveratrol. A capacidade antioxidante recebe destaque por estar relacionada a uma série de propriedades farmacológicas, medicinais e terapêuticas, como a prevenção e diminuição da progressão de doenças cardiovasculares, diversos tipos de câncer e do envelhecimento precoce da pele (Frémont, 2000). Apesar de diversos estudos demonstrarem a potente eficácia de resveratrol *in vitro*, tendo em vista sua baixa biodisponibilidade por via oral a aplicação tópica aparece como uma alternativa e tem sido testada contra o desenvolvimento de desordens cutâneas (Walle *et al.*, 2004; Boocock *et al.*, 2007).

## 2. OBJETIVOS

Avaliar a biocompatibilidade *in vitro* de matrizes e dispositivos de hidrogel, utilizados como sistemas de liberação de ativos cosméticos, por meio do ensaio de citotoxicidade.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Obtenção das matrizes de hidrogel e dispositivos

Foram avaliados dois tipos de matrizes poliméricas compostas por PVP K90, PEG 300 e ágar ou PVP K90 e glicerol, conforme Tabela 1.

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

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

As diferentes formulações de hidrogéis foram preparadas mediante aquecimento até completa dissolução e homogeneização dos componentes. As membranas foram obtidas, vertendo-se cerca de 5 mL da solução em moldes circulares, que foram selados e enviados para irradiação em uma fonte de raios gama de Co<sup>60</sup> na dose de 15 ou 20 kGy.

Conforme apresentado na Tabela 2, os dispositivos foram obtidos pela adição de 0,1% de resveratrol ou 1% de óleo de açaí às formulações das matrizes poliméricas pelo método direto, ou seja, antes do envio para irradiação.

**Tabela 2.** Descrição da formulação dos dispositivos

Dispositivo	Componentes	(%)	Dose (kGy)
PVP-RES	PVP K90	6,0	20
	PEG 300	1,5	
	Ágar	0,5	
	Resveratrol	0,1	
GLI-RES	PVP K90	20,0	
	Glicerol	5,0	
	Resveratrol	0,1	
PVP-AÇAÍ	PVP K90	6,0	15
	PEG 300	1,5	
	Ágar	0,5	
	Óleo de açaí	1	
GLI-AÇAÍ	PVP K90	20,0	
	Glicerol	5,0	
	Óleo de açaí	1	

### 3.2. Ensaio de citotoxicidade

A biocompatibilidade preliminar das matrizes e dispositivos obtidos 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 da 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).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A base mais adequada para incorporação do princípio ativo e formação do sistema de liberação deve ser determinada de forma individual, de modo a fornecer velocidade de liberação, propriedades de adesão após aplicação e textura ideais (Allen Junior *et al.*, 2007). As matrizes estudadas, irradiadas a 15 ou 20 kGy, apresentaram homogeneidade, transparência, flexibilidade, boa aderência à pele, maciez e propriedades mecânicas adequadas à manipulação e foram consideradas adequadas para incorporação de princípios ativos.

Conforme apresentado na Fig. 1, os dispositivos contendo resveratrol ou óleo de açaí mantiveram as características apresentadas pelas matrizes e foram considerados adequados visualmente e manualmente para serem utilizados em aplicações tópicas. A avaliação da biocompatibilidade foi realizada com o objetivo de verificar se os mesmos apresentavam-se não-citotóxicos mesmo após incorporação dos princípios ativos.

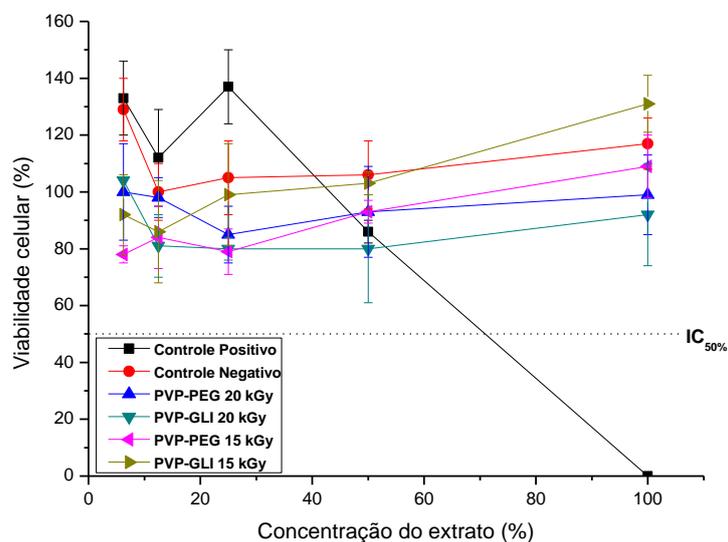


**Figura 1.** Dispositivo PVP-RES

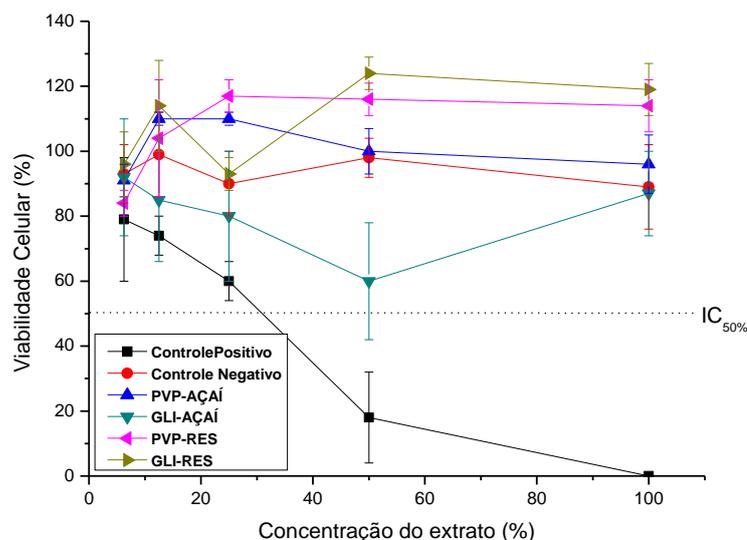
A biocompatibilidade preliminar das matrizes poliméricas e dispositivos foi verificada *in vitro* por meio do teste de citotoxicidade. A medida da citotoxicidade foi realizada pelo cálculo do índice de citotoxicidade  $IC_{50\%}$  que determina quantitativamente o potencial citotóxico do material testado 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 obtidas colocando-se em gráfico os valores de porcentagem de viabilidade celular em relação à concentração do extrato. As curvas de viabilidade celular estão apresentadas na Fig. 2, onde pode ser observado que as matrizes estudadas mostraram comportamento semelhante ao controle negativo, ou seja, não toxicidade. Somente o controle positivo apresentou-se tóxico, com  $IC_{50\%}$  de 72 indicando que o extrato do controle positivo na concentração de 72% provocou a morte de 50% da população celular no ensaio. O comportamento observado neste estudo foi semelhante ao encontrado em trabalhos publicados anteriormente que também avaliaram *in vitro* a citotoxicidade de hidrogéis de PVP (Higa *et al.*, 1999).

Os dispositivos apresentaram o mesmo comportamento das matrizes, não indicando citotoxicidade, como pode ser observado na Fig. 3.



**Figura 2.** Curvas de viabilidade celular das matrizes poliméricas de PVP/PEG/Ágar e PVP/Glicerol irradiadas a 15 ou 20 kGy



**Figura 3.** Curvas de viabilidade celular dos dispositivos contendo resveratrol ou óleo de açaí no ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Os dispositivos obtidos contendo resveratrol ou óleo de açaí apresentaram boa aderência à pele, maciez, textura adequada e não-citotoxicidade em teste de preliminar de biocompatibilidade. Estas características são consideradas importantes em produtos destinados à aplicação tópica, o que torna estes dispositivos uma interessante solução para o mercado cosmético, para serem utilizados em processos de regeneração cutânea ou contra o desenvolvimento de desordens da pele como o envelhecimento precoce.

## 5. CONCLUSÃO

As matrizes e os dispositivos de hidrogel incorporados com resveratrol e óleo de açaí mostraram-se flexíveis e com propriedades mecânicas adequadas ao manuseio. No ensaio de citotoxicidade *in vitro* tanto as matrizes quanto os dispositivos de hidrogel não apresentaram efeito tóxico, demonstrando a possibilidade de serem utilizados para a incorporação e liberação de princípios ativos cosméticos para o uso em regeneração cutânea. Estudos serão continuados no sentido de avaliar a irritabilidade e alergenicidade dos dispositivos estudados.

## AGRADECIMENTOS

Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira do Centro de Tecnologia das Radiações - IPEN pela irradiação das amostras, à estudante Rezolina Pereira dos Santos (IAL) pelo preparo das células em microplacas e à empresa Beraca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN JUNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. Porto Alegre: Artmed, 2007.

BOOCOCK, D. J.; FAUST, G. E. S.; PATEL, K. R.; SCHINAS, A. M.; BROWN, V. A.; DUCHARME, M. P.; BOOTH, T. D.; CROWELL, J. A.; PERLOFF, M.; GESCHER, A. J.; STEWARS, W. P.; BRENNER, D. E. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 6, p. 1246-1252, 2007.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 663-673, 2000.

HAMID, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, p. 1638-1649, 2008.

HIGA, O. Z.; ROGERO, S. O.; MACHADO, L. D. B.; MATHOR, M. B.; LUGÃO, A. B. Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, p. 705-707, 1999.

ISO document 10993-1, Biological evaluation of medical devices, Part 1, Evaluation and testing, 2003.

LUBRANO, C.; ROBIN, J. R.; KHAIAT, A. Composition em acides grãs, stérols et tocophérols d'huiles de pulpe de fruits de six espèces de palmiers de Guyane. **Oléagineux**, v. 49, n.2, 1994. p. 59-65.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat. Research*, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROSIK, J.M. Hydrogel Dressings. In: CLOUGH, R.C; SHALAB, S.W. **Radiation Effects on Polymers**. Whashington: American Chemical Society, 1991.

SOLEAS, G. J.; GRASS, L.; JOSEPHY, P. D.; GOLDBERG, D. M.; DIAMANDS, E. P. A comparasion of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. **Clinical biochemistry**, v. 35, p. 119-124, 2002.

UDENIGWE, C. C.; RAMPRASATH, V. R.; ALUKO, R. E.; JONES, P. J. H. Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. **Nutrition reviews**, v. 66, n. 8, p. 445-454, 2008.

WALLE, T.; HSIEH, F.; DELEGGE, M. H.; OATIS, J. E.; WALLE, U. K. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug metabolism and disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

## **IN VITRO BIOCOMPATIBILITY OF HYDROGEL MATRICES AND DEVICES FOR USE IN COSMETICS**

Roberta G. R. A. P. Momesso<sup>1</sup>, Ana Carolina H. R. Machado<sup>1</sup>, Renata Hage Amaral<sup>1</sup>, Sizue O. Rogero<sup>1</sup>, Áurea S. Cruz<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. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária – São Paulo/SP, Brasil - CEP 05508-000

<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo/SP, Brasil – CEP 01246-902

[robertapassarelli@yahoo.com.br](mailto:robertapassarelli@yahoo.com.br)

### **ABSTRACT**

Hydrogels have been used successfully in the development of cosmetics products due to their interesting characteristics such as biocompatibility. Also, there is a similarity of their physical properties with those of living tissues making them viable for a variety of applications, especially in delivery system of active agents. In view of the development of new cosmetics products to be used in regeneration and prevention of skin aging, this study aimed to evaluate the *in vitro* biocompatibility of hydrogel matrices and devices incorporated with resveratrol and oil açai by cytotoxicity test. The matrices and devices obtained showed flexibility, appropriate mechanical properties and non-toxicity effect, showing the possibility of being used for cosmetic active ingredients release.