

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Desenvolvimento, caracterização, avaliação da estabilidade e da penetração cutânea de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética

Mariana Mandelli de Almeida

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a Dr^a Maria Valéria Robles Velasco
Co-Orientadora:
Prof^a Dr^a Nádia Araci Bou-Chacra

São Paulo

2012

Mariana Mandelli de Almeida

Desenvolvimento, caracterização, avaliação da estabilidade e da penetração cutânea de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a Associada Dr^a Maria Valéria Robles Velasco
orientador/presidente

1^o. examinador

2^o. examinador

3^o. examinador

4^o. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

A Deus e aos Espíritos de Luz que me iluminaram e me guiaram até aqui, me dando força, determinação e fé na minha capacidade de realização.

Ao meu pai, Mário, modelo de profissional dedicado e honesto. Pelo amor a nossa família e apoio na realização dos meus sonhos.

À minha mãe, Sônia, pela constante dedicação e amor a nossa família. Por estar sempre presente quando preciso de conselhos e incentivo.

Ao meu amor, Nicolas, por tornar minha vida completa, pelo apoio e carinho.

Agradecimento especial

À Profa. Associada Dra. Maria Valéria Robles Velasco e a Profa. Dra. Nádia Araci Bou-Chacra pela orientação, contribuição para a minha formação como pesquisadora e pelo apoio à realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À aluna de iniciação científica Juliana Denise Conte, pela grande ajuda na realização deste trabalho de doutorado.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Silva Costa Teixeira e aos pós-doutorandos Dennis e Verônica do Laboratório de Simulação e Controle de Processos - Departamento de Engenharia Química - USP (EPUSP), pela ajuda na realização das medidas das nanopartículas e uso do cromatógrafo à líquido.

À técnica Márcia Aparecida da Silva e a Profa. Associada Dra. Iolanda Midea Cuccovia do Laboratório de Sistema Biomiméticos - Departamento de Bioquímica – Instituto de Química – USP, pelo uso do *Zetasizer*.

A querida Profa. Dra. Vânia Leite e Silva, pela ajuda na orientação e realização do doutorado-sanduíche na Austrália.

Ao Prof. Dr. Michael Roberts e Dr. Jeffrey Grice, pelo aceite e realização do doutorado-sanduíche no *Therapeutics Research Unit – University of Queensland – Brisbane/AUS*, para realização da etapa final de penetração cutânea da tese.

À técnica Jenny Ordonez, a pós-doutoranda Liz Ryan, as estagiárias Julie Poirier, Audrey Colliou, Guillemette Joubert, Marie Neveu, Clara Obispo e Anais pela ajuda e amizade durante o intercâmbio na Austrália.

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos, pela ajuda com a análise térmica.

Ao técnico Charles, pelo ajuda no uso do rotaevaporador.

À querida amiga Msc. Cibele Lima pela amizade, apoio e ajuda com as tabelas.

Às colegas e amigas Msc. Joyce Quenca, Msc. Túlia Botelho, Msc. Vanessa Tavares, Msc. Helen Leite, Msc. Carolina Zanolini, Msc. Fernanda Fialho, pela amizade e apoio em todos os momentos.

Aos técnicos Edgar Muniz Machado Junior e Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, pela colaboração e amizade.

À empresa HighChem, em especial a Dra. Vera, pela doação do ácido ursólico.

À empresa Mapric, a amiga Ana Carolina, pela doação das matérias-primas.

À empresa Basf, ao Fábio Ito, pela doação das matérias-primas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro recebido.

A todas as demais pessoas que direta ou indiretamente tornaram a realização deste trabalho possível.

“Vive de tal forma que deixes pegadas luminosas no caminho percorrido, como estrelas apontando o rumo da felicidade e não deixes ninguém afastar-se de ti sem que leve um traço de bondade, ou um sinal de paz da tua vida.”

Joanna de Ângelis

RESUMO

A indústria cosmética tem investido em tecnologias inovadoras na busca de maior eficácia de seus produtos. A Nanotecnologia tem sido utilizada com o propósito de desenvolver formulações de menor risco de irritação cutânea e que promovam a liberação modificada do componente ativo. Este trabalho teve como objetivo geral desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética. Nesta pesquisa, para determinar a eficiência de encapsulação do AU (ácido ursólico) livre e nas nanopartículas poliméricas, foi validada uma metodologia que empregou a CLAE (Cromatografia em fase Líquida de Alta Eficiência) e os resultados obtidos indicaram boa reprodutibilidade do método e concordância entre os resultados obtidos, sendo a metodologia empregada na avaliação do AU livre e nanoparticulado. As nanopartículas contendo AU apresentaram características de potencial estabilidade química, obtendo eficiência de encapsulação de 80% de AU para as nanopartículas poliméricas e 100% para os carreadores lipídicos nanoestruturados. A caracterização físico-química das nanopartículas poliméricas contendo AU foi realizada determinando-se diâmetro da partícula ($353,4 \pm 1,4$ nm), índice de polidispersividade ($0,106 \pm 0,008$) e potencial zeta ($-35,6 \pm 1,2$ mV). Os resultados obtidos para os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo AU nas formulações foram: tamanho de partícula entre $125,3 \pm 40,4$ e $237,4 \pm 62,7$ nm, índice de polidispersividade entre 0,01 e 0,38 e potencial zeta entre $-20,5 \pm 9,2$ e $-50,7 \pm 9,5$ mV. Os resultados obtidos indicaram estabilidade das nanopartículas desenvolvidas. O resultado relativo ao planejamento fatorial para otimização dos agentes tensoativos revelou modelo matemático de segunda ordem para a previsão de valores de potencial zeta em função das concentrações de SDS. Dessa forma, foi possível a preparação de carreador lipídico nanoestruturado contendo reduzida concentração de SDS e valor de potencial zeta menor que -40 mV. Por meio das técnicas de TG/DTG e DSC, observou-se que o AU se manteve estável nas diversas formas de apresentação. Formulações cosméticas contendo ácido ursólico livre (AUL), e incorporados a nanopartículas poliméricas (AUE) e carreadores lipídicos nanoestruturados (AUC) foram submetidas a Avaliação Preliminar da Estabilidade e ao Teste Estabilidade Normal. Observou-se que o AUC obteve melhor estabilidade físico-química em comparação ao AUL tanto na variação de viscosidade como na variação do pH, além de ter obtido melhor estabilidade em relação a AUE na variação de pH x tempo. A partir dos resultados obtidos, a Formulação 2 foi selecionada para o teste de penetração cutânea. A avaliação da penetração cutânea *in vitro* do AU não apresentou tendência para favorecer o transporte da substância ativa para a fase receptora. A maior concentração de AU na pele foi obtida das amostras de AU livre + emulsão (65%) seguidas das amostras de CLN + emulsão (33%) e das NP + emulsão (20%). A penetração cutânea obteve resultado ideal, pois, por se tratar de nanopartículas contendo um componente ativo antioxidante na superfície da pele, se associado a um filtro solar, atuaria contra os radicais livres resultando na maior proteção contra a radiação ultravioleta.

Palavras-chave: ácido ursólico, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanopartículas poliméricas, planejamento experimental, estudo termoanalítico, penetração cutânea

ABSTRACT

The cosmetic industry has invested in innovative technologies in search of greater effectiveness of their products. Nanotechnology has been used with this propose to reduce the risk of skin irritation by promoting the modified release of the active component. This study had as main objective development, characterization and evaluation of ursolic acid nanoparticles incorporated in cosmetic formulation. In this research, to determine the entrapment efficiency of UA (ursolic acid) free and in polymeric nanoparticles, a methodology was validated using HPLC (high performance liquid chromatography) and the results indicated good reproducibility of the method and agreement between the results, the methodology employed could be assessed in the evaluation of free and UA nanoparticles. Nanoparticles containing UA showed characteristics of potential chemical stability obtaining entrapment efficiency of 80% for UA polymer nanoparticles and 100% for the nanostructured lipid carriers. The physicochemical characterization of polymeric nanoparticles containing UA was accomplished by determining the particle diameter (353.4 ± 1.4 nm), polydispersity index (0.106 ± 0.008) and zeta potential (-35.6 ± 1.2 mV). The results obtained for the nanostructured lipid carriers containing UA formulations were: particle size between 125.3 ± 40.4 and 237.4 ± 62.7 nm, polydispersity index between 0.01 and 0.38, and zeta potential between -20.5 ± 9.2 and -50.7 ± 9.5 mV. The results indicated stability of the developed nanoparticles. The result for the factorial design for optimization of surfactant revealed a quadratic effect of the independent variable sodium dodecyl sulfate in zeta potential. Thus, it was possible to prepare nanostructured lipid carrier containing reduced concentrations of SDS and zeta potential value of less than -40 mV. By means of the techniques of TG/DTG and DSC, was observed that the UA remained stable. Cosmetic formulations containing free ursolic acid (AUL) and incorporated in polymeric nanoparticles (AUE) and nanostructured lipid carriers (AUC) were submitted to Preliminary Assessment Stability and Normal Stability Test. It was observed that the AUC obtained better physical and chemical stability compared to AUL on the variation of viscosity as on the pH variation, besides having obtained a higher stability compared to the AUE in the pH variation versus time. From the results obtained Formulation 2 was selected for the realization of the skin penetration test. The evaluation of the *in vitro* penetration of UA showed that ursolic acid remained on the skin surface. The dermal penetration showed no tendency to favor the transport of active substance to the receptor phase. The highest concentration of UA in the skin samples was obtained UA + free emulsion (65%) followed samples NLC + emulsion (33%) and PN + emulsion (20%). The skin penetration achieved optimal outcome because, as it is nanoparticles containing antioxidant active compound on the skin surface, if associated with a solar filter would act against free radicals resulting in greater protection against ultraviolet radiation.

Keywords: ursolic acid, nanostructured lipid carriers, polymeric nanoparticles, experimental design, thermal analytical study, skin penetration

INTRODUÇÃO

A pele é reflexo das condições de saúde e do bem-estar físico e mental do indivíduo, influenciando na sua aparência e no seu estado psíquico e, conseqüentemente, em suas atividades sociais e profissionais (BATLLE & VILA, 1988; STOCKDALE, 1991).

A maior parte dos sinais visíveis do envelhecimento é causada pelos raios ultravioleta. Não somente o excesso de sol ou as queimaduras que ocasionalmente causam danos graves, como também as doses moderadas de sol que as pessoas recebem diariamente, a longo prazo, constituem ameaça efetiva para a saúde e a beleza da pele. As radiações nocivas emitidas pelo sol são subdivididas em: ultravioleta A (UVA) 320-400nm, B (UVB) 290-320nm e C (UVC) 100-290nm (MAIA CAMPOS, 2006; BENY, 2003).

O cuidado com o bem-estar do indivíduo deixou de ser preocupação apenas dos dermatologistas e esteticistas. Aliada à beleza, existe a preocupação no Brasil do aumento da incidência do câncer de pele, reflexo do tipo de exposição à radiação solar. Cientistas de todo mundo aprofundam estudos no sentido de selecionar substâncias capazes de impedir os efeitos danosos causados na pele pelas radiações solares (PAOLA *et al*, 1998).

A incidência solar promove a produção de radicais livres que, se não forem neutralizados, favorecem reações indesejáveis e provocam alterações fisiológicas e biológicas, como: fotoenvelhecimento, degeneração das fibras de elastina em massa amorfa (elastose), perda de tensão das fibras de colágeno na derme e queratoses solares (precursores do carcinoma de células escamosas) (HARBER *et al*, 1990).

As pesquisas na área cosmética têm se voltado para o estudo de substâncias de origem natural, principalmente de plantas, como extratos e substâncias isoladas.

Dentre os diversos compostos isolados das plantas, inclui-se a classe dos triterpenóides. As plantas que os contêm possuem propriedades, principalmente, anti-inflamatórias e protetoras do sistema vascular, assim

como propriedades antialérgicas, analgésicas, antipirética e anticancerígena (LIU, 1995).

A capacidade anticancerígena do ácido ursólico foi estudada em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Os trabalhos evidenciam que o ácido ursólico (AU) possui certa capacidade inibitória no desenvolvimento de tumores. Por meio da inibição da ativação do vírus Epstein-Barr pelo TPA (12-Otetradecanolforbol 13-acetato), o AU conseguiu retardar a formação de papilomas, sendo esta ação mais importante em cânceros de pele. Estudos realizados em ratos demonstraram a diminuição significativa da ocorrência de tumores na pele em vários períodos de tempo. Este efeito foi comparável ao outro inibidor tumoral estudado, o ácido retinóico, sendo o AU mais promissor (ISHIDA *et al*, 1990).

A Nanotecnologia tem sido apontada como promessa na área cosmética e muito se tem investido neste segmento, tendo em vista alcançar maior eficácia dos princípios ativos, quando as nanopartículas são incorporadas nas formulações cosméticas, além de oferecer características sensoriais e de apresentação diferenciadas aos produtos.

Dentre os métodos para obtenção de sistemas nanoparticulados, aqueles que utilizam polímeros biodegradáveis tem apresentado ampla aplicação no desenvolvimento de produtos cosméticos. No que se referem aos sistemas vesiculares, as nanocápsulas permitem carrear substâncias lipofílicas em seu núcleo, em geral, oleoso. Diferentes cosméticos nanoestruturados estão disponíveis no mercado. A empresa L'Oreal detém o maior número de patentes relacionadas à sistemas nanoestruturados de princípios ativos para aplicação cosmética. No Brasil, empresas como Boticário e Natura têm da mesma forma, investido nessa tecnologia inovadora.

Dentre as principais vantagens da aplicação dessa tecnologia para o desenvolvimento de produtos cosméticos, pode-se citar:

- proteção da substância ativa da degradação decorrente da exposição à luz e aos demais componentes da formulação, em função de minimizar este efeito, elevando portanto, a estabilidade do produto;

- maior desempenho da substância ativa em função de permitir liberação gradual desta e maior tempo de sua residência na pele, evitando possíveis irritações locais que poderiam ocorrer no caso de formulações convencionais (ocasionadas pela substância ativa livre) (CUA *et al.*, 1990; KUMAR, 2000; LBOUTONNE *et al.*, 2002; JIMÉNEZ *et al.*, 2004).

A literatura científica disponível relativa ao emprego de nanopartículas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos é abundante. No geral, é utilizada para a obtenção de produtos com liberação modificada da substância ativa, assim como de ação terapêutica em sítio específico (KREUTER, 1994; SOPPIMATH *et al.*, 2001). Por outro lado, ainda existem poucos trabalhos que empregam tais vesículas como sistemas carreadores para substâncias com aplicação cosmética. Dessa forma, a nanoestruturação de cosméticos pode ser considerada promissora no que se refere ao desenvolvimento, pesquisa e inovação desses produtos, de maneira que o ácido ursólico tem se destacado na área cosmética em função de sua propriedade antioxidante aliada à atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e anticancerígena.

Este trabalho teve como objetivo geral desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanopartículas de ácido ursólico incorporadas em formulação cosmética, e os objetivos específicos foram divididos em capítulos. Cada capítulo contempla um ou mais objetivos, apresentando introdução, material e métodos, resultados, discussão, e conclusões. A validação do método cromatográfico para determinação do ácido ursólico é abordada no Capítulo 1. O Capítulo 2 apresenta o desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas e de carreadores lipídicos nanoestruturados. O Capítulo 3 apresenta a avaliação da estabilidade de nanopartículas de ácido ursólico em formulações cosméticas. O Capítulo 4 aborda a avaliação da penetração cutânea *in vitro* do ácido ursólico presente em formulações cosméticas.

REFERÊNCIAS

- BATLLE, C.; VILA, O.C. Protectores solares. **Venta OTC**, p.43-46, 1988.
- BENY, M.G. Considerações sobre a pele seca. **Cosmetic & Toiletries**, São Paulo, v.15, n.3/4, p.42-46, 2003.
- CUA, A.B.; WILHEM, K.P.; MAIBACH, H.I. Elastic properties of human skin: relation to age, sex and anatomical region. **Archives of Dermatological Research**, v. 282, p.283-288, 1990.
- HARBER, L.C.; LEO, V.A.; PRYSTOWSKY, J.H. Intrinsic and extrinsic photoprotection against UVB and UVA radiation. In: LOWE, N.J., SHAATH, N.A., eds. Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects. New York: Marcel Dekker, p.359-378 [**Cosmetic. Science technology Series**, v.10], 1990.
- ISHIDA, M.; OKUBO, T.; KOSHIMIZU, K.; DAITO, H.; TOKUDA, H.; KIN, T.; YAMAMOTO, T.; YAMAZAKI, N. Topical preparations containing ursolic acid and/ or oleanolic acid for prevention of skin cancer. **Chemical Abstract**, v. 113, 12173y, 1990.
- JIMÉNEZ, M.M.; PELLETIER, J.; BOBIN, M.F.; MARTINI, M.C. Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**, v.272, p.45-55, 2004.
- KREUTER, J. Nanoparticles. In: KREUTER, **Journal of Colloidal Drug Delivery Systems**. New York: Marcel Dekker, p.219-342, 1994.
- KUMAR, M.N.V.R. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.3, p.234-258, 2000.
- LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J.F.; PLOTON, C.; FALSON, F.; PIROT, F. Sustained ex vivo skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (caprolactone) nanocapsule form and as a digluconate. **Journal of Controlled Release**, v.82, p.319-334, 2002.
- LIU, J. Pharmacology of oleanolic and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 57-68, 1995.

MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; Vitaminas em cosméticos. **Cosmetic & Toiletries**, São Paulo, v.18, n.6, p.52-62, 2006.

PAOLA, M.V.R.V., RIBEIRO, M.E. Interação entre filtros solares. **Cosmetic & Toiletries**, Ed. Port., São Paulo, v.10, n.5, p.40-50, 1998.

SOPPIMATH, K.S.; AMINABHAVI, T.M.; KULKARNI, A.R.; RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, p.1-20, 2001.

STOCKDALE, M. Filtros solares UVA: Métodos para avaliação de sua eficácia. **Cosmetic & Toiletries**, Ed. Port, São Paulo, v.3, n.2/3, p.26-30, 1991.