



Preparo de sistema lipossomal 20% de pureza com sistema multivitamínico: teste ex vivo em pele de porco

Preparation of 20% purity liposomal system with multivitamin system: ex vivo test on pig skin

Sidnei Lopes Claro Junior¹, Luis Fernando Cabeça²

Utilizando-se das vitaminas C, D e E, o objetivo desse trabalho é avaliar a absorção desses antioxidantes na pele quando encapsulados em lipossomas ou quando estão livres em solução, pois quanto maior a absorção maior será a regeneração celular promovida e manutenção da mesma. Porém, tendo em vista que isso possa surgir como uma nova formulação para dermocosméticos, a matéria prima utilizada para a formulação dos lipossomas escolhida foi a fosfatidilcolina de soja com 20% de pureza pensando também uma formulação economicamente viável. Os lipossomas foram formados pelo método de hidratação do filme lipídico, sonicados e realizado DLS das amostras para que fossem obtidas partículas com tamanhos satisfatórios, em torno de 200nm, facilitando assim a penetração cutânea, também foram realizados testes de eficiência de encapsulamento (EE%) das vitaminas por ultracentrifugação e testes de liberação em pele de orelha suína por célula de Franz, juntamente com a técnica de tape stripping. A quantificação dos testes foi feita por equipamento de HPLC. Para a EE% obteve-se valores acima de 90% para todas as vitaminas e em relação aos testes de liberação utilizando célula de Franz, foram testadas soluções lipossomais somente com vitamina D para que fosse aperfeiçoada a técnica e eventualmente estar realizando novos testes com a formulação completa, obtendo assim resultados mais precisos.

PALAVRAS-CHAVE: lipossomas; vitaminas; célula de Franz.

ABSTRACT

Using vitamins C, D and E, the objective of this work is to evaluate the absorption of these antioxidants in the skin when encapsulated in liposomes or when they are free in solution, as the greater the absorption, the greater the cell regeneration and maintenance will be promoted. However, considering that this could emerge as a new formulation for dermocosmetics, a raw material used for the formulation of the chosen liposomes was soy phosphatidylcholine with 20% purity, also thinking of an economically viable formulation. Liposomes were formed by the lipid film hydration method, sonicated and DLS was carried out on the samples to obtain particles with compact sizes, around 200nm, thus facilitating open penetration. Encapsulation efficiency tests (EE%) were also carried out. of vitamins by ultracentrifugation and release tests on porcine ear skin using Franz cells, together with the tape stripping technique. The quantification of the tests was carried out using HPLC equipment. For EE%, values above 90% were obtained for all vitamins and in relation to release tests using Franz cells, liposomal solutions were tested only with vitamin D so that the technique could be improved and eventually new tests could be carried out with the complete formulation, thus obtaining more precise results.

KEYWORDS: liposomes; vitamins; Franz cell.

INTRODUÇÃO

Através do processo natural de envelhecimento cutâneo com o passar do tempo, as células que formam o tecido perdem suas propriedades e a reconstrução do mesmo se torna mais lenta. Vitaminas do tipo C, D e E quando absorvidas nas camadas mais

¹ Voluntário PIBICT/UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil. E-mail: sidnejunior.2022@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 9725212563703549

² Docente do Departamento de Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, PR, Brasil. E-mail: luiscabeça@utfpr.edu.br. ID Lattes: 2028423293665464.



profundas da pele ajudam a retardar esse processo de envelhecimento e também a acelerar o processo de reconstrução celular, pois são antioxidantes que combatem a ação dos radicais livres. Entretanto, o estrato córneo que é a camada mais superficial da pele, devido a sua composição, acaba sendo a principal barreira para a absorção de novas substâncias e para que as vitaminas consigam realizar suas funções necessitam primeiro ultrapassar esse obstáculo (CHORILLI et al. 2007.; GILL et al., 2009 apud SILVA et al, 2010, p. 2).

Uma solução para esse problema surge com a utilização de nanopartículas chamadas lipossomas, os quais são pequenas vesículas concêntricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas que devido a sua composição conseguem encapsular substâncias de natureza polar no seu interior (cerne aquoso) como também conseguem se unir a substâncias apolares que ficam adsorvidas em seu exterior através das bicamadas lipídicas (BATISTA et al., 2007, p. 2). Os lipossomas conseguem penetrar melhor a pele por ter uma constituição semelhante, adentrando mais facilmente através do estrato córneo e se dissolvendo nas camadas mais profundas funcionando assim como um nanocarregador de fármacos.

No entanto, a fosfatidilcolina de soja (SPC) que é a principal matéria prima para a formação de lipossomas possui um alto custo em sua forma mais pura, com isso, a finalidade dessa pesquisa é averiguar se a utilização de sistemas lipossomais criados através da fosfatidilcolina de soja com 20% de pureza contendo as vitaminas C, D e E melhoram a penetração sobre a pele, para que novas formulações dermocosméticas possam surgir utilizando-se dessa tecnologia e sendo economicamente viáveis.

OBJETIVO

Desenvolver uma formulação de um sistema lipossomal de baixo custo contendo vitaminas do tipo C, D e E para que sua penetração na pele seja maior em comparação com as vitaminas quando aplicadas livremente.

MATERIAIS E MÉTODOS

LIPOSSOMAS SPC 20% COM VITAMINAS C,D e E

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, utilizando SPC e colesterol na proporção de 7:3, adicionando vitamina D3 e 2% (m/m) do surfactante tween-80, diluídos em clorofórmio. Em seguida, foi colocada a solução em banho de ultrassom durante 10 minutos, após a evaporação completa do solvente o filme lipídico foi então hidratado com 80% de solução tampão-fosfato e 20% de etanol juntamente com as vitaminas C e E formando então o sistema lipossomal multivitamínico. Após isso repetiu-se o processo com o ultrassom, os lipossomas multilamelares obtidos foram então levados ao sonicador e durante o processo de sonicação foi utilizado uma frequência de 20 kHz a 500W e com máxima amplitude (240µm). Foram realizados 10 ciclos de 1 minuto de agitação com 1 minuto de descanso sob banho de gelo.

TESTE EX VIVO EM PELE DE ORELHA SUÍNA



Os testes de liberação da formulação foram inicialmente realizados com o sistema de célula de difusão de Franz utilizando a pele da orelha de porco sem a cartilagem como barreira de difusão, mantendo a solução receptora (80% água + 20% etanol) em 37° C durante todo o processo e sob agitação magnética, 150 uL de duas soluções foram utilizadas, uma contendo o sistema lipossomal 20% T-80 (2,1:0,7 mM de SPC/colesterol) com vitamina D apenas (1 mM) e outra solução simples de vitamina D livre (1mM) para que fosse possível realizar a comparação. Dois testes foram realizados, um com o tempo de 5 horas e outro com o tempo de 3 horas. Após esse tempo, as amostras de pele foram secadas ainda no equipamento para evitar que a soluções escorressem para a fase receptora, lavadas suavemente com água destilada para que fosse removido o excesso de formulação e então foi realizada a técnica de tape stripping, que consiste em remover as camadas mais superficiais do estrato córneo com a aplicação de fitas adesivas sequencialmente para que seja determinada a quantidade da formulação que ficou adsorvida nessa fração da pele. Adicionando as fitas obtidas em metanol (solvente extrator), após esse procedimento foi delimitada a área das amostras de pele que permaneceu em contato com a solução lipossomal, com aproximadamente 1 cm de diâmetro, essa área circular então foi cortada em pequenos pedaços de 1 mm² e também foram adicionadas em metanol, as soluções então contendo as fitas e as amostras de pele cortadas foram levadas ao vórtex por 30 segundos, ao ultrassom por 15 minutos e por fim sonicadas do mesmo modo realizado na formação dos lipossomas. Após isso, as soluções foram passadas em um filtro de 0,45 um e então levadas para a quantificação em HPLC.

MEDIDAS DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

A eficiência de encapsulação (EE%) das vitaminas em lipossomas foi determinada utilizando a técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação. Uma quantidade de 2 mL da amostra lipossoma-vitaminas foi colocada em uma unidade de filtro e submetida a ultracentrifugação. A quantidade que passou através do filtro (vitamina livre, ou seja, não encapsulada) foi quantificada utilizando o equipamento de HPLC, também foram obtidos os cromatogramas e construída uma curva de calibração para cada vitamina.

Para o cálculo da curva de calibração do padrão analítico da Vitamina D utilizou-se as concentrações de: 0,1 mmol/L, 0,5 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L e 5 mmol/L. A curva de calibração forneceu a equação da reta $y = 0,6739 + 7,4937x$ e $R^2 = 0,99892$.

Para a curva de calibração do padrão analítico da Vitamina E utilizou-se as concentrações de: 0,1 mmol/L, 0,5 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L e 5 mmol/L. A curva de calibração forneceu a equação da reta $y = 0,0371 + 0,4114x$ e $R^2 = 0,99669$.

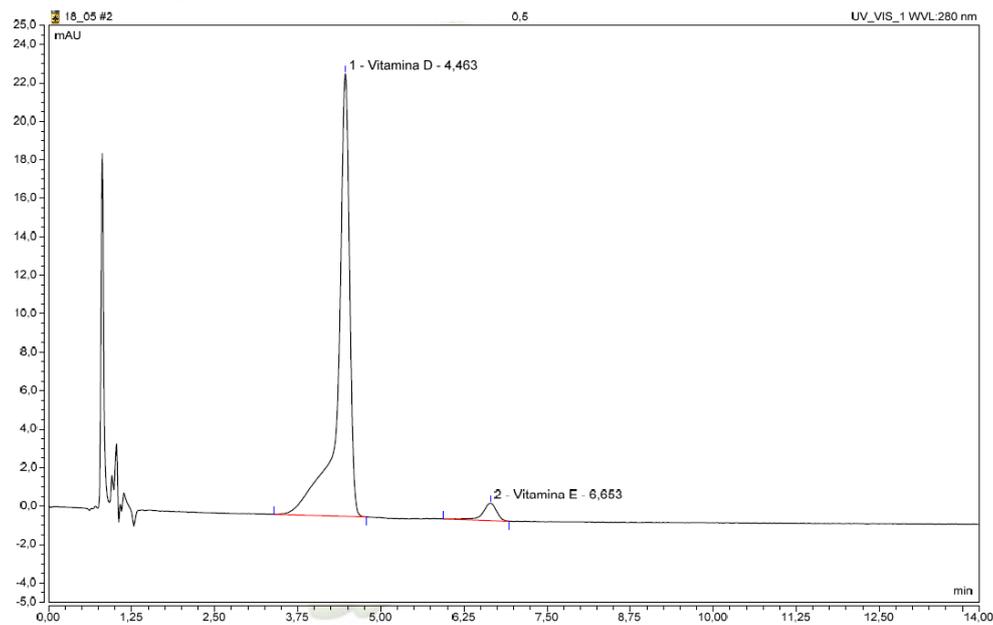
Para o cálculo da curva de calibração da Vitamina C utilizou-se as concentrações de: 0,1 mmol/L, 0,5 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L e 5 mmol/L. A curva de calibração forneceu a equação da reta $y = -0,04593 + 2,91059x$ e $R^2 = 0,99669$.

Para a obtenção dos cromatogramas e quantificação das vitaminas C, D e E, foi utilizado o equipamento HPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), software Chromeleon, do Departamento de Química da UTFPR, campus Londrina. Utilizou-se a coluna cromatográfica C18 Phenomenex de fase reversa, com dimensões de 150 x 4,6 mm. A injeção da amostra foi de 5 µL, com fluxo de 1,5ml/min. A fase móvel foi composta por 100% de metanol.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

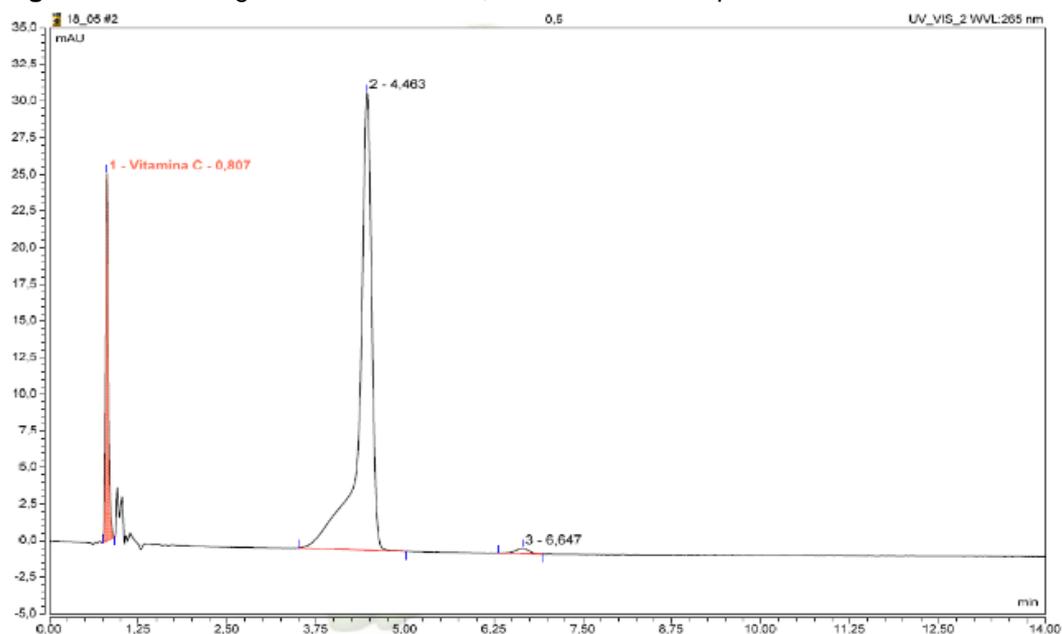
Após análise realizada por HPLC, o cromatograma das vitaminas D e E foram observados no comprimento de onda de 280 nm, apresentando um pico com tempo de retenção de 4,5 minutos da vitamina D e de 6,65 minutos da vitamina E (Figura 1). O cromatograma para a vitamina C mostrou um pico com tempo de retenção de 0,81 minutos, em comprimento de onda 265 nm (Figura 2).

Figura 1 - Cromatograma da vitamina D e E, observado no comprimento de onda de 280 nm.



Fonte: HPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), software Chromeleon, do Departamento de Química da UTFPR, campus Londrina

Figura 2 - Cromatograma da vitamina C, observado no comprimento de onda de 265 nm.





Fonte: HPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), software Chromeleon, do Departamento de Química da UTFPR, campus Londrina

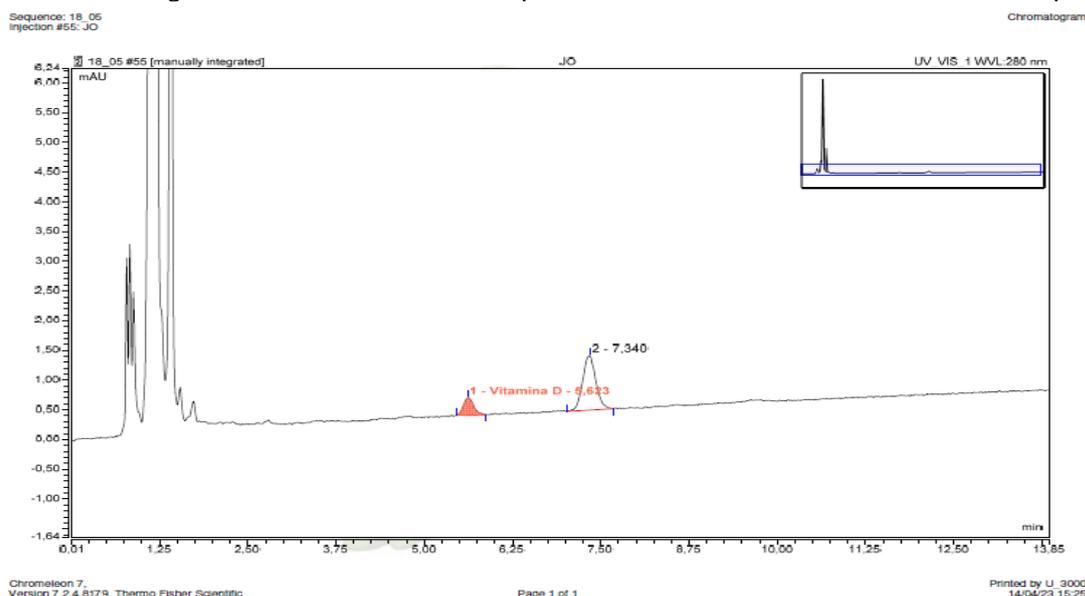
O resultado do efeito de encapsulação foi realizado utilizando a curva de calibração da vitamina D, cuja concentração no cromatograma foi de 0,0001 mmol/L. Esse resultado é a concentração que atravessou o filtro de ultracentrifugação, ou seja, vitamina D não encapsulada. Considerando a concentração da solução inicial como 1 mmol/L, a EE% da vitamina D foi de aproximadamente 99,99%.

O resultado do efeito de encapsulação foi realizado utilizando a curva de calibração da vitamina E, cuja concentração no cromatograma foi de 0,0001 mmol/L. Esse resultado é a concentração que atravessou o filtro de ultracentrifugação, ou seja, vitamina E não encapsulada. Considerando a concentração da solução inicial como 1 mmol/L, a EE% da vitamina E foi de aproximadamente 99,99%.

O resultado do efeito de encapsulação foi realizado utilizando a curva de calibração da vitamina C, cuja concentração no cromatograma foi de 0,07 mmol/L. Esse resultado é a concentração que atravessou o filtro de ultracentrifugação, ou seja, vitamina C não encapsulada. Considerando a concentração da solução inicial como 1 mmol/L, a EE% da vitamina C foi de 93%.

Após preparado os lipossomas e caracterizados quanto a eficiência de encapsulamento, os dois testes de penetração em orelha de porco que foram realizados com o tempo de 3 e 5 horas apresentaram os seguintes resultados: o teste realizado durante 3 horas não identificou a presença de vitamina D nas amostras da pele de porco e o teste realizado durante 5 horas nas células de Franz com orelha de porco apresentaram um valor de 0,1863 mM para a vitamina D livre e 0,0494 mM da vitamina D encapsulada em lipossomas (Figura 3). Para as amostras da fita de ambas as soluções não houve a presença de vitamina D detectada pelo HPLC.

Figura 3 - Cromatograma obtido da amostra de lipossoma-vitamina D com o teste de 5 horas por CLAE



Fonte: HPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific), software Chromeleon, do Departamento de Química da UTFPR, campus Londrina



Utilizando a equação da reta referente a curva de calibração da vitamina D, temos que a porcentagem de penetração da vitamina D livre na pele foi de 18,63% e da vitamina D encapsulada em lipossomas foi de 4,94%.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante o teste de 3 horas demonstraram que esse tempo foi ineficiente para que as soluções penetrassem na pele. Para o teste realizado durante 5 horas houve uma pequena absorção da vitamina D na pele de ambas as soluções, concluindo que a vitamina livre apresentou maior absorção em comparação a vitamina D encapsulada no lipossoma. Esses foram os primeiros testes realizados para que fosse possível aperfeiçoar as técnicas empregadas e conseqüentemente estar realizando outros testes utilizando a formulação completa contendo as vitaminas C, D e E.

Agradecimentos

Agradeço ao docente Dr. Luis Fernando Cabeça pelos ensinamentos e a oportunidade concedida de desenvolver esta pesquisa, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná do Campus Londrina, pelo apoio institucional que possibilitou as pesquisas através dos laboratórios, matéria prima e abertura do projeto e também ao Laboratório Multiusuário e o departamento de química, ambos do Campus Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelas análises realizadas.

Conflito de interesse

“Não há conflito de interesse”.

REFERÊNCIAS

BATISTA, C. M.; DE CARVALHO. C. M. B.; MAGALHÃES. N. E. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007.

SILVA, J.A., APOLINÁRIO, A.C., SOUZA, M.S.R., DAMASCENO, B.P.G.L., MEDEIROS, A.C.D. (2010). Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil, 2010.

NOVICKI, Luiza Hauser. Desenvolvimento de sistema multivitamínico encapsulado em lipossomas para saúde da pele. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2022.