

Avaliação físico-química e biológica da eficácia de uma água mineral lipossomada na pele

Physico-chemical and biological effectiveness evaluation of a liposome-enhanced mineral water on the skin

RESUMO

Introdução: Devido aos seus efeitos hidratante e anti-inflamatório, a água mineral tem sido progressivamente mais utilizada em Dermatologia. Não obstante, apresenta penetração aparentemente superficial. Um lipossoma elástico contendo água mineral foi desenvolvido para melhorar a sua penetração e ação na pele.

Objetivos: O presente estudo avaliou a eficácia de um lipossoma de 30-100nm, composto de trealose e fosfatidilcolina de soja, que pode atravessar espaços 30nm e carregar a água mineral para as camadas mais profundas da pele.

Métodos: O método de RAMAN foi utilizado para avaliar a penetração do lipossoma na pele. A análise dos seus efeitos hidratantes foi realizada através da medida da expressão gênica da filagrina e da aquaporina. Os efeitos anti-inflamatórios foram medidos através das quantidades de NF- κ B.

Resultados: A fosfatidilcolina foi utilizada como um marcador no teste de RAMAN, tendo sido localizada a 1-7nm mais profundamente no estrato córneo 30 minutos depois da aplicação; 60 minutos após a aplicação, o lipossoma foi encontrado sobre a camada espinhosa. Nenhuma alteração foi verificada 120 minutos após a aplicação. A expressão gênica da filagrina aumentou 3 vezes e a da aquaporina, 1,8 vez. Em relação à NF- κ B, houve 47% de diminuição na sua atividade.

Conclusão: A multidisciplinaridade da nanotecnologia e seus benefícios não podem ser minimizados. O desenvolvimento de lipossomas com tecnologia brasileira denotam a capacidade de nossos cientistas de inovar os sistemas de delivery em cosméticos, beneficiando a dermatologia. O aproveitamento da riqueza hídrica do Brasil também deve ser ressaltado a fim de estimular novos estudos relacionados com a nossa diversidade natural. O presente estudo permite concluir que a água lipossomada pode permear a pele e permite melhores efeitos biológicos.

Palavras-chave: águas minerais; lipossomos; pele; Brasil; cosméticos.

ABSTRACT

Introduction: Mineral water has been used in Dermatology for its moisturizing and anti-inflammatory effects. Its penetration seems to be superficial. An elastic liposome containing mineral water was developed in efforts to improve its penetration and action in the skin.

Objectives: This study evaluated the efficacy of a 30-100 nm liposome, made of trehalose and soy phosphatidylcholine, which can cross 30 nm spaces and deliver the mineral water to deeper layers of the skin.

Methods: The RAMAN method was used to evaluate the permeation of the liposome into the skin. Its moisturizing effects were measured through the genic expression of filaggrin and aquaporin, and its anti-inflammatory effects were measured through NF- κ B quantities.

Results: After 30 minutes, the phosphatidylcholine was localized 1-7 nm deeper in the corneum layer; 60 minutes after, the liposome had penetrated to the spinous layer; and no changes were verified after 120 minutes. The genic expression of filaggrin increased 3 times and the expression of aquaporin increased 1.8 times. NF- κ B activity decreased 47%.

Conclusion: Nanotechnology and its benefits are very important to dermatology. The development of liposomes with Brazilian technology demonstrates the emergence of a knowledge base regarding cosmetic delivery systems in the country. Therefore, Brazil's wealth of mineral spring waters represents a considerably valuable resource and should be the object of further studies in dermatology. This study has verified that liposome-encapsulated water can permeate the skin and provide enhanced biological effects.

Keywords: mineral waters; liposomes; skin; Brazil; cosmetics.

Artigo Original

Autores:

Samanta Nunes¹
Bhertha Tamura²

¹ Dermatologista e diretora médica da ZSN Associados – São Paulo (SP), Brasil.

² Doutora em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil.

Correspondência para:

Dra. Samanta Nunes
R. Diogo Moreira, 132/915 – Brooklin Novo
04569-011 – São Paulo – SP
E-mail: nunes.samanta@uol.com.br

Data de recebimento: 28/11/2011
Data de aprovação: 15/12/2011

Trabalho realizado no Instituto de Bioengenharia da Pele – Evic Brasil Ltda. – São Paulo (SP), Brasil.

Suporte Financeiro: Material fornecido pelo laboratório Puralnova – São Paulo (SP), Brasil.
Conflito de Interesses: Material fornecido pelo laboratório Puralnova – São Paulo (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

As águas minerais têm sido utilizadas na dermatologia em virtude de suas propriedades físico-químicas no tratamento de várias afecções cutâneas. Os já descritos efeitos hidratantes, anti-inflamatórios, calmantes, antiproliferativos, antimicrobianos, queratolíticos, cicatrizantes e antioxidantes despertam seu interesse no campo terapêutico. A fim de melhorar a penetração da água mineral e a consequente ação hidratante na pele, desenvolveu-se um lipossoma elástico encapsulando a água mineral da fonte Alvorada (água mineral lipossomada) no Estado de São Paulo, Brasil.

Lipossomas

São vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios, que isolam do meio externo um ou vários compartimentos aquosos internos. Uma grande vantagem dos lipossomas, com relação a outros sistemas transportadores de medicamento, é sua elevada biocompatibilidade, especialmente quando são formados de lipídios pertencentes às famílias de lipídios naturais. Além disso, são sistemas altamente versáteis, cujos tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados em função dos requisitos farmacêuticos e farmacológicos. A capacidade de essas vesículas artificiais oferecerem barreiras para a difusão de solutos foi demonstrada pela primeira vez por Bangham, em 1965.^{1,2}

Os lipossomas, classicamente, são preparados a partir do glicerofosfolípido, a fosfatidilcolina. De forma mais geral, lipossomas podem ser obtidos a partir de qualquer substância anfifílica formadora de fase lamelar.^{1,2}

Os lipossomas têm sido amplamente utilizados como veículo em fórmulas dermocosméticas, em razão de sua estrutura proporcionar a encapsulação de substâncias ativas hidrofílicas e lipofílicas, visto serem constituídos por compostos anfifílicos. As principais vantagens do emprego de lipossomas para a administração de agentes dermocosméticos são: sua capacidade de transportar substâncias hidro e lipossolúveis; sua alta afinidade com as membranas biológicas; o fato de serem constituídos de anfifílicos naturais biocompatíveis e biodegradáveis; além de seu potencial para acentuar a hidratação natural da pele e do cabelo. Vale lembrar que esses sistemas de *delivery* não são sempre iguais, e a depender da substância a ser encapsulada há que adaptar o tipo e a composição dos lipossomas. Os lipossomas não são estáveis em veículos que contenham emulsificantes O/A ou A/O. Mesmo na ausência de tensoativos, a incorporação de lipossomas a determinados veículos só pode ser efetuada sob determinadas condições, especialmente empregando anfifílicos estruturais sintéticos, padronizando pH, osmolaridade e temperatura.³

Água mineral lipossomada

Foi desenvolvido um lipossoma elástico exclusivo, para a encapsulação da água mineral da fonte Alvorada, com tamanho variando entre 40 e 100nm (Gráfico 1), capaz de passar por poros de até 30nm; aplicou-se esse lipossoma em um produto na forma de aerossol.

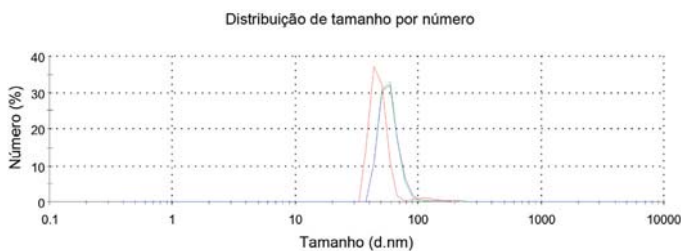


Gráfico 1: Distribuição de tamanho de partículas de lipossoma – três medidas (azul, vermelho e verde)

A água mineral que foi encapsulada nesses lipossomas é originária da fonte Alvorada, na Serra do Japi, região de floresta atlântica do Estado de São Paulo, Brasil. A conformação do lipossoma desenvolvido pode ser vista esquematicamente na figura 1. Imagens de microscopia eletrônica mostram os lipossomas dispersos em água mineral nas figura 2.

Estudos prévios demonstraram efeitos biológicos *in vitro*, como aumento da expressão gênica de filagrina e de aquaporina 3 (importantes na hidratação); redução da atividade de NF- κ b (efeito anti-inflamatório); e proliferação de fibroblastos. Estudos clínicos ainda são necessários a fim de comprovar esses efeitos *in vivo*. Com o objetivo de proporcionar maior permeação cutânea desse possível ativo biológico, a água mineral da fonte Alvorada foi encapsulada em lipossomas especialmente desenvolvidos para esse ativo.

A composição dos lipossomas liofilizados da água mineral da fonte Alvorada é apresentada na tabela 1, sendo os componentes majoritários trealose e fosfatidilcolina de soja.

Considerando-se apenas os componentes lipídicos, a fosfatidilcolina de soja representa cerca de 90% dos lipídios nos lipossomas, conforme apresentado na tabela 2.

OBJETIVOS

Avaliar a capacidade dos lipossomas de aumentar a permeação cutânea da água mineral da fonte Alvorada *in vivo*, por meio do teste Raman. Avaliar a eficácia *in vitro* do uso da água lipossomada, por meio de expressão gênica de filagrina e aquaporina 3; atividade do fator de transcrição nuclear NF- κ β .

MÉTODOS

Permeação da água mineral com lipossomas na pele

Para avaliar a eficácia da água lipossomada, foram realizados testes de permeação por meio do método Raman, que con-

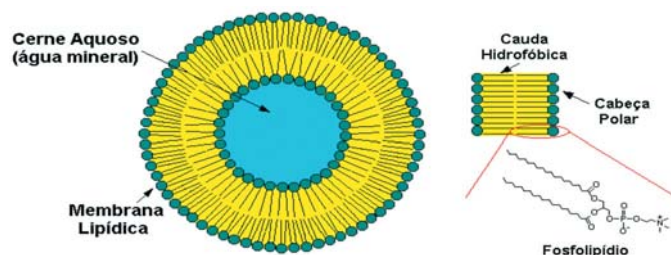


Figura 1: Conformação esquemática do lipossoma

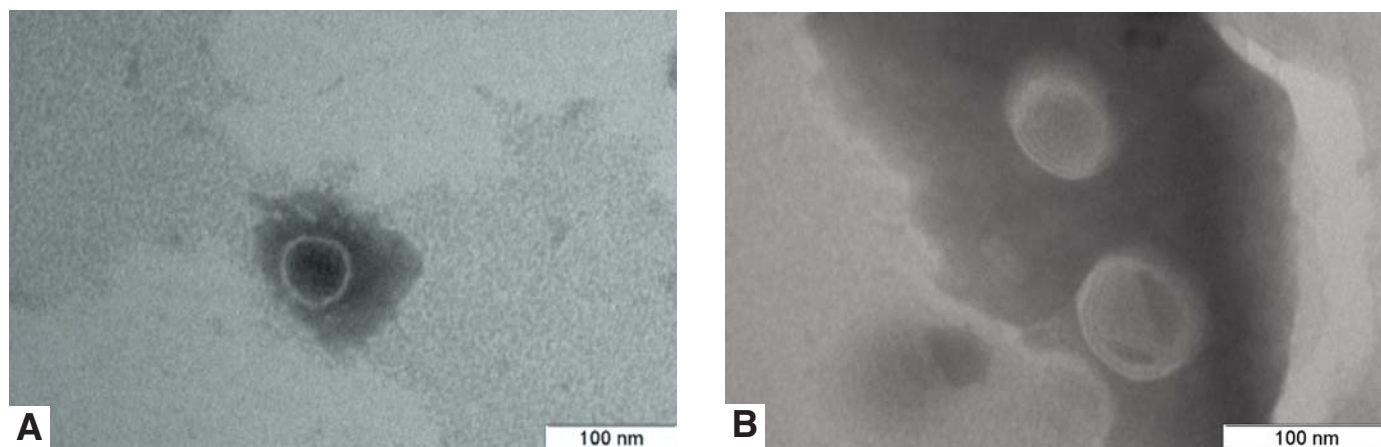


Figura 2: A e B. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de lipossomas dispersos em água mineral

Tabela 1: Composição da MP lipossomas liofilizados (secos)

Matéria-prima	% (m/m)
Trealose	60
Fosfatidilcolina de soja	35,9
Éster de fitoesterol	1,5
Colesterol	1,2
Ácido behênico	1,2
Ceramidas 3	0,3

Tabela 2: Composição lipídica da MP lipossomas liofilizados

Matéria-prima (lipídios)	% (m/m)
Fosfatidilcolina de soja	89,8
Éster de fitoesterol	3,8
Colesterol	2,9
Ácido behênico	2,9
Ceramidas 3	0,7

siste em realizar uma microespectroscopia confocal e determinar a profundidade alcançada no tecido cutâneo. O produto foi aplicado na região do braço e foram feitas medidas em diferentes tempos (após 30, 60 e 120 minutos), utilizando-se a fosfatidilcolina como marcador do lipossoma.

Estimulação da expressão gênica de filagrina e aquaporina 3

Foram também realizados estudos para avaliar a expressão gênica de filagrina e de aquaporina 3 por Real Time PCR. Queratinócitos humanos (Cascade Biologics, USA) foram cultivados e, após seis horas de contato com a água mineral, o RNA total foi extraído utilizando-se Triagent[®] Solution (Applied Biosystems) e quantificado através da utilização de Quant-iT[™] RNA Assay Kit (Invitrogen) realizando-se a leitura no equipamen-

to Qubit[®] Fluorometer (Invitrogen). Os testes foram conduzidos em um aparelho StepOnePlus (Applied Biosystems). Para a realização dos ensaios de expressão gênica de filagrina, um sistema de ensaio TaqMan[®] Gene Expression Assays; Applied Biosystems. Para análise da expressão gênica de aquaporina 3, foi utilizado o kit EXPRESS One-Step SYBR[®] GreenER[™] (Invitrogen). Em ambos os estudos a quantidade relativa de mRNA foi calculada conforme descrito por Pfaffl⁴ e Gregory & Edith.⁵

Diminuição da atividade do fator de transcrição nuclear (NF- κ B)

A atividade do NF- κ B foi avaliada por meio de cultura de queratinócitos humanos com seis concentrações de água mineral contendo lipossomas ou com água desmineralizada (controle). As células foram submetidas à radiação UVA/UVB e mantidas novamente em contato com o produto por mais 24 horas. A atividade do NF- κ B foi mensurada utilizando um kit da empresa Cayman Chemical, USA. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas a 450nm. Os valores de NF- κ B foram expressos em porcentagem em relação aos respectivos controles (basal e UVA/UVB).

RESULTADOS

Permeação da água mineral com lipossomas na pele

Após os primeiros 30 minutos de aplicação única, os níveis de fosfatidilcolina (marcador para o lipossoma) encontraram-se aumentados à profundidade de 1 a 7 μ m (estrato córneo), de maneira significativa, o que demonstra rápida permeação do lipossoma já nos primeiros minutos de aplicação. Após 60 minutos, como era de esperar levando em consideração os resultados obtidos após 30 minutos, os níveis de fosfatidilcolina reduziram em relação a esse primeiro período nas camadas superiores, mas começaram a aumentar nas camadas ainda mais profundas, com pico em 19 μ m (estrato espinhoso), o que indica que o lipossoma atinge camadas mais profundas da epiderme. Após 120 minutos o perfil não sofreu muita alteração, mas percebeu-se que não houve aumento dos níveis de fosfatidilcolina nas cama-

das mais profundas, mantendo o padrão de permeação obtido após os primeiros 60 minutos da aplicação.

Os resultados estão apresentados no gráfico 2.

Estimulação da expressão gênica de filagrina

Em estudo realizado com culturas de células, a água mineral com lipossomas proporcionou aumento de cerca de três vezes a expressão gênica de filagrina, que foi ainda 7% superior ao resultado obtido pela água mineral da fonte Alvorada sem lipossomas (aumento de 2,8 vezes). Esses dados demonstram que a água lipossomada pode contribuir fortemente na manutenção do equilíbrio hídrico da pele, uma vez que a filagrina é uma das principais proteínas do envelope córneo e responsável pela formação de aproximadamente 50% do total de NMFs (fatores naturais de hidratação) na pele.

Estimulação da expressão gênica de aquaporina 3

Em estudo realizado com culturas de células, a água mineral da fonte Alvorada (sem lipossomas) proporcionou um aumento de 1,8 vez a expressão gênica de aquaporina 3, quando comparada com a água Milli Q (sem sais minerais). O teste realizado com a água mineral com lipossomas demonstrou aumento de 4,3 vezes (140% maior). O aumento da expressão de aquaporina 3 confirma a capacidade do produto em sustentar a integridade hídrica da pele, uma vez que essa proteína atua como uma maquinaria especializada capaz de suprir a perda excessiva de água epidérmica.

Diminuição da atividade do fator de transcrição nuclear (NF- κ B)

A dispersão de lipossomas de água mineral 0,2% promoveu redução significativa de 47% na atividade do NF- κ B, indicando uma atividade calmante e anti-inflamatória *in vitro*.

DISCUSSÃO

Uma das maiores desvantagens da terapia tópica é a baixa velocidade de penetração dos fármacos através da pele. A barreira difusional da maioria das substâncias é o estrato córneo, que

consiste de corneócitos embebidos em uma matriz lipídica. A matriz lipídica do estrato córneo é formada de uma bicamada lipídica composta de colesterol, ácidos graxos e ceramidas. As principais vantagens do uso de lipossomas envolvem sua capacidade de armazenar substâncias hidrossolúveis em seu interior e substâncias lipofílicas e anfífilicas em suas membranas, nas quais as substâncias ativas ficam retidas para ser transferidas a outras membranas, como a pele. Conforme o teste Raman demonstrou, esses lipossomas são capazes de aumentar a permeação cutânea, atravessando a camada córnea, podendo propiciar melhor efeito de hidratação da pele. Além disso, os lipossomas são atóxicos, biodegradáveis e podem ser preparados em larga escala.

Os testes *in vitro* também confirmaram que a água lipossomada apresentou vantagens em termos de efeitos biológicos superiores aos efeitos conseguidos com a água mineral sem lipossomas. Dentre eles destaca-se o aumento significativo da expressão gênica de filagrina e aquaporina 3, indicando melhor capacidade de hidratação e reconstrução da barreira cutânea. Muitas dermatoses podem beneficiar-se dessa nova tecnologia. Também observou-se redução significativamente maior da atividade do fator de transcrição nuclear NF- κ B, sugerindo ação anti-inflamatória superior quando comparada à da água mineral não lipossomada. Esses testes associados aos testes *in vitro* realizados com a água em sua forma não lipossomada sugerem que a água estaria mais indicada para os casos em que há comprometimento de barreira, e o uso da água lipossomada parece estar mais indicado na pele sã, em que os lipossomas aumentaram a permeação cutânea, entregando a água na camada espinhosa. Parece que esta última, se aplicada em pele já comprometida, poderia acarretar permeação para camadas indesejadas, com possíveis efeitos irritativos. A presente premissa ainda deve ser clinicamente comprovada. Estudos adicionais são necessários a fim de aprofundar o conhecimento dos efeitos da água mineral lipossomada não só na pele sadia, mas também em dermatoses.

CONCLUSÃO

A multidisciplinaridade da nanotecnologia e seus benefícios não podem ser minimizados. O desenvolvimento de lipossomas com tecnologia brasileira denotam a capacidade de nossos cientistas de inovar os sistemas de *delivery* em cosméticos, beneficiando a dermatologia. O aproveitamento da riqueza hídrica do Brasil também deve ser ressaltado a fim de estimular novos estudos relacionados com a nossa diversidade natural. O presente estudo permite concluir que a água lipossomada pode permear a pele e permite melhores efeitos biológicos.

Notas e agradecimentos

O lipossoma descrito neste estudo é patenteado e foi desenvolvido em parceria das empresas Libera Tecnologia e Inovação Ltda, PuraInova Consultoria e Inovação Ltda e Chemyunion Indústria Química. Os autores do trabalho agradecem às empresas mencionadas a possibilidade de utilizar a água lipossomada nos estudos aqui descritos. ●

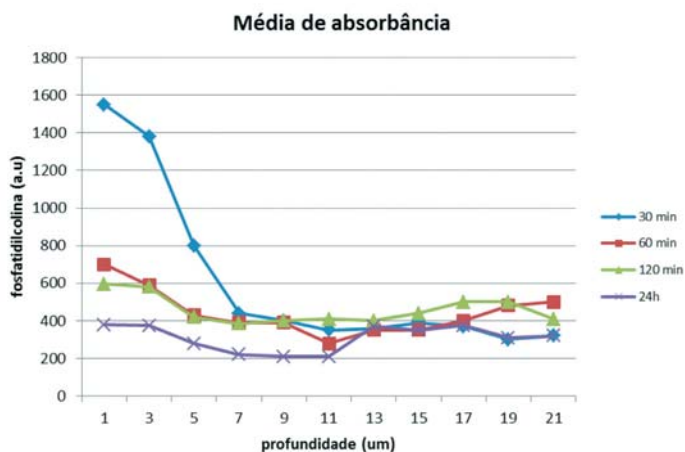


Gráfico 2: Medidas de fosfatidilcolina (marcador do lipossoma) nos tempos 0 (basal) e após 30, 60, 120 minutos e 24 horas após aplicação única da água mineral lipossomada

REFERÊNCIAS

1. Frézard F, Schettini DA, Rocha OGF, Demicheli C. Lipossomas: Propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quim Nova*. 2005; 28(3): 511-518.
2. Lasic DD . Application of liposomes. In: Lipowsky, R., Sackmann, E, editors. *Handbook of biological physics - Vol. 1B: Structure and dynamics of membranes – generic and specific interactions*. Elsevier Science: The Netherlands, 1995. p. 491-520.
3. Chorilli M, Leonardi GR, Oliveira AG, Scarpa MV. Lipossomas em formulações dermocosméticas. *Infarma*. 2004; 16(7-8): 75-79.
4. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2011; 29: 2000-7.
5. Gregory E. Miller, Edith Chen. Life stress and diminished expression of genes encoding glucocorticoid receptor and 2 adrenergic receptor in children with asthma. *PNAS*. 2006; 103(4): 5496-501.