

Desenvolvimento de sistemas microemulsionados: caracterização físico-química, estudo microbiológico, avaliação do potencial irritativo e comedogenicidade na pele

Autores

Gislaine Ricci Leonardi
Maria Luiza Ozores Polacow
Maria Silvia m Pires de Campos
Gislene Garcia Franco do Nascimento
Marlus Chorilli

Apoio Financeiro

Fap

1. Introdução

Pode-se dizer que os sistemas nanoestruturados vêm sendo citados recentemente na literatura científica. A indústria cosmética, bem como a farmacêutica, têm se mostrado interessadas no desenvolvimento desses sistemas, uma vez que oferecem vantagens de estabilidade, liberação prolongada para as substâncias ativas de uso tópico e também promovem maior hidratação à pele (CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003; SINTOV & SHAPIRO, 2004).

A principal desvantagem destas formulações nanoestruturadas se relaciona à utilização de elevadas concentrações de emulsionantes, o que pode ocasionar irritação local (CUNHA JUNIOR *et al.*, 2003). Por outro lado na preparação desses sistemas geralmente não são empregados conservantes microbiológicos, uma vez que grande quantidade de tensoativos na formulação poderia dificultar o desenvolvimento de microrganismos (CONSTÂNCIO, 1993).

Uma outra desvantagem de formulações com quantidades elevadas de emulsionantes poderia ser a irritação cutânea ocasionada por essas moléculas anfifílicas. Os possíveis efeitos indesejáveis devem ser avaliados por meio de um estudo histopatológico e histométrico, pois permitem a análise do tecido epitelial, da derme e também das características celulares. Além de auxiliar no delineamento experimental para a realização de estudos de eficácia em produtos cosméticos (SILVA & MAIA CAMPOS, 2000). No Brasil também existe um guia de segurança de produtos cosméticos que preconiza testes em animais para assegurar a segurança do produto.

Assim, este trabalho se propôs a analisar o efeito irritativo na pele de coelhos de formulações com alto teor de tensoativo, através da avaliação do eritema e edema e também de técnicas histológicas, bem como a ação comedogênica dessas formulações na pele, pois se sabe que é tendência cada vez mais comum de mercado o desenvolvimento de formulações não comedogênicas. Além disso, o emprego de ultra-som tem feito parte da rotina de fisioterapeutas que buscam veículos que proporcionem boa transmissividade das ondas ultrassônicas (MITRAGOTRI *et al.*, 1995). Logo, investigou também se os sistemas nanoestruturados desenvolvidos ocasionavam prejuízo na transmissividade das ondas ultrassônicas.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram: desenvolvimento de sistemas nanoestruturados; caracterização físico-química dos sistemas obtidos; controle microbiológico das formulações; AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IRRITATIVO DAS FORMULAÇÕES NA PELE; AVALIAÇÃO DA COMEDOGENICIDADE DAS FORMULAÇÕES; VERIFICAÇÃO DA TRANSMISSIVIDADE DO ULTRA-SOM EM SISTEMAS NANOESTRUTURADOS; VERIFICAÇÃO DO EFEITO IRRITATIVO DA ASSOCIAÇÃO DO ULTRA-SOM COM SISTEMAS NANOESTRUTURADOS NA PELE.

3. Desenvolvimento

3.1 Preparação das formulações

As formulações foram desenvolvidas através da construção de diagramas ternários, utilizando-se o método da titulação aquosa. Foram construídos 5 sistemas, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Composição dos diagramas ternários.

Diagrama	Composição
Sistema 1 (S ₁)	Silicone fluido de copolímero glicol, Poliéter funcional silixano, Água destilada
Sistema 2 (S ₂)	Silicone fluido de copolímero glicol, Trilauril- 4 Fosfato, Água destilada
Sistema 3 (S ₃)	Silicone fluido de copolímero glicol, Polisorbato 80, Água destilada
Sistema 4 (S ₄)	Adipato de Diisopropila, Poliéter funcional silixano, Água destilada
Sistema 5 (S ₅)	Adipato de Diisopropila, Silicone fluido de copolímero glicol, Água destilada

3.2. Microscopia de luz polarizada

Uma pequena quantidade das formulações desenvolvidas foi colocada sobre uma lâmina de vidro, cobrindo-a com uma lamínula, e em seguida submetidas à análise microscópica (Microscópio luz polarizada - TYPE 102M – Motic). Foi avaliada a homogeneidade da dispersão e, com auxílio de polarização, observada a presença de área de anisotropia, indicativo da presença de cristais líquidos. A análise foi realizada a temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Somente as formulações com indicação de presença de anisotropia foram selecionadas para continuação dos estudos.

3.3. Comportamento reológico

Para esta análise foi utilizado um viscosímetro rotacional tipo cone placa (DVII + VISCOMETER – Brookfield). As análises foram realizadas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

3.4. Controle de qualidade microbiológico

As análises microbiológicas das formulações selecionadas foram realizadas de modo a atender a Resolução 481/97 da ANVISA, MS, fazendo-se a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (bactérias e fungos) pela técnica de *pour plate*.

3.5. Medida de transmissividade do ultra-som

Para medir a transmissividade do US através das formulações selecionadas, foi adotado a metodologia proposta por GUIRRO *et. al.* (2001).

Foi utilizado um aparelho de US modelo SONOMASTER Dual da KW Indústria Nacional de Tecnologia Ltda.

3.6. Estudo *in vivo*

As análises de comedogenicidade, irritabilidade primária e cumulativa foram realizadas para as duas formulações selecionadas.

3.6.1. Animais

O estudo foi realizado em coelhos machos adultos, com peso de 2,0 a 3,0 Kg.

Os animais foram divididos em 2 grupos de 5 animais cada, sendo que no primeiro grupo os animais foram submetidos a 15 dias de tratamento para análise dos testes de irritabilidade cumulativa e de comedogenicidade. No segundo grupo foram tratados em um único dia para análise da irritabilidade primária.

3.6.2. Aplicação do ultra-som nos animais

Nos tratamentos dos animais, as áreas na qual o US foi aplicado, foi regulado numa frequência de 3 MHz, devido a sua superficialidade, uma vez que nosso objetivo foi verificar as alterações cutâneas ocorridas. A intensidade foi de 0,1W/cm², modo de emissão contínuo e tempo de aplicação de 2 min/cm².

3.6.3. Análise de comedogenicidade e irritação na pele

Os testes de comedogenicidade, irritação dérmica primária e cumulativa, seguiram a metodologia proposta pela ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2002).

Foi realizado estudo cego simples. Todas as análises eram feitas por 3 pesquisadores diferentes, onde nenhum deles tinha contato com as análises dos demais.

Os testes de comedogenicidade foram feitos na parte interna da orelha direita dos coelhos, que foi dividida em duas partes, na parte superior foi aplicada topicamente uma formulação e na inferior a outra formulação selecionada. A orelha esquerda serviu de controle.

Para análise da quantidade de comedões presentes na pele dos coelhos foi utilizada a lâmpada de Wood, sendo que leituras foram feitas diariamente e 24 horas após a última aplicação, verificando presença ou ausência de comedões.

Para a avaliação foi utilizado o método de plantimetria por contagem de pontos (MANDARIM-DE-LACERDE, 1994).

3.6.4. Irritação dérmica primária

Este teste consiste de uma aplicação única dos tratamentos e oclusão com um filme de PVC por 4 horas, após este período o produto foi retirado e realizou-se a graduação de eritema e edema das áreas em 4 e 72 horas após a aplicação, segundo a escala de Draize.

A escala de Draize avalia subjetivamente o eritema e edema presentes na pele, com uma graduação de 0 a 4 graus (HOFFMAN *et. al.*, 2005).

3.6.5. Irritação dérmica cumulativa

As aplicações realizadas neste teste seguem a metodologia da irritação dérmica primária, diferenciando-se apenas no número de aplicações, que foram feitas no período de 15 dias consecutivos. As graduações de eritema e edema foram realizadas diariamente e 24 horas após a última aplicação, segundo a escala de Draize.

3.6.6. Análise histológica

O estudo do efeito na pele das formulações selecionadas foi realizado em coelhos machos adultos. O número de animais utilizados foi de 5, conforme o Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos - ANVISA (2002). Após tricotomia de cinco áreas no dorso dos animais, estes foram submetidos aos seguintes tratamentos durante 15 dias:

- 1) Controle (C);
- 2) Tratado com formulação S1;
- 3) Tratado com formulação S1 + ultra-som (S1+US);
- 4) Tratado com formulação S4;
- 5) Tratado com formulação S4 + ultra-som (S4+US).

3.7. Análise estatística

Os resultados obtidos nos estudos histológicos foram submetidos à análise da variância.

4. Resultados

4.1. Formulações selecionadas

Para a seleção dos sistemas utilizou-se como critério a obtenção de formulações que apresentassem altas concentrações de tensoativo, viscosidade adequada para a aplicação tópica, presença de cristais líquidos e ainda que permitissem a transmissividade de ondas ultrassônicas.

Assim, foram selecionadas formulações de 2 sistemas (S1 e S4). As formulações selecionadas apresentavam 60% de tensoativo, 10% de óleo e 30% de água.

4.2. Microscopia de luz polarizada para formulações selecionadas

As análises microscópicas foram realizadas no tempo 24 horas (T=1) após a manipulação e no tempo 15 dias (T=15), sendo que os resultados das análises microscópicas no tempo 1 podem ser observados nas Figuras 1 e 2.

(I)

(II)

Figura 1. Fotomicrografia da formulação do sistema S₁, observado 24 horas após manipulação à temperatura ambiente (25 ± 2°C). I: microscopia com luz polarizada (400X); II: microscopia sem polarização (1000X).

(I)

(II)

Figura 2. Fotomicrografia da formulação do sistema S₄, observado 24 horas após manipulação à temperatura ambiente (25 ± 2°C). I: microscopia com luz polarizada (400X); II: microscopia sem polarização (1000X).

Foi possível observar, sob microscopia de luz polarizada, áreas anisotrópicas indicando presença de fases líquidas cristalinas do tipo lamelar tanto nas primeiras 24 horas após a manipulação quanto após 15 dias, armazenadas sob diferentes condições térmicas, o que indica que não houve mudanças conformacionais severas na estrutura interna do sistema mesmo após serem submetidas ao estresse térmico. Na microscopia sem polarização foi possível observar o tamanho e a homogeneidade dos glóbulos formados pela fase interna do sistema

4.3. Comportamento reológico

Todos os reogramas indicaram que as amostras analisadas apresentam comportamento não-Newtoniano pseudoplástico, com área de histerese. Este comportamento é adequado para produtos com indicação tópica, pois após a aplicação da tensão a preparação apresenta facilidade para fluir, refletindo bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na pele

(MORAIS, 2006).

4.4. Controle de qualidade microbiológico

Os produtos não apresentaram contaminação microbiana (<10 UFC/g), o que confirma relatos da literatura de que formulações com altas concentrações de tensoativos não são susceptíveis a contaminação microbiológica (CONSTÂNCIO, 1993).

4.5. Medida de transmissividade do ultra-som

Tanto a formulação do S1 quanto a do S4 não ocasionou atenuação significativa da onda ultrassônica, podendo ambas serem utilizadas em fonoforese.

4.6. Estudo *in vivo*

4.6.1. Comedogenecidade

Não foi observado nenhuma diferença estatística. Portanto nem a formulação do S1 nem a formulação do S4 foi comedogênico.

4.6.2. Irritação dérmica primária e cumulativa

As formulações estudadas não produziram irritação dérmica, nem primária nem cumulativa. Por outro lado, o ultrassom ocasionou irritabilidade cumulativa.

5. Considerações Finais

Pode-se concluir que formulações preparadas com 10% de silicone fluido de copolímero glicol, 60% de poliéter funcional silixano e 30% de água destilada (S1) e com 10% de adipato de diisopropila, 60% de poliéter funcional silixano e 30% de água destilada (S4) apresentaram cristais líquidos. Pode-se verificar também que esses sistemas nanoestruturados obtidos não apresentaram contaminação microbiana, e ainda, não ocasionaram o aparecimento de comedões na pele. As formulações não produziram irritação dérmica primária. Por outro lado, o ultrassom ocasionou irritabilidade cumulativa.

Referências Bibliográficas

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Resolução nº 481 de 15 de setembro de 1977. Estabelece limites microbianos para cosméticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 01 de dezembro de 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para avaliação de segurança de**

produtos cosméticos. Brasília, DF, 2002. 43p. Disponível em: www.anvisa.gov.br Acesso em: 25 de outubro de 2004.

CONSTÂNCIO, K.F.S. Contaminação microbiológica de produtos cosméticos. **Rev. Racine**, v.11, p. 13-14, 1993.

CUNHA JUNIOR, A. S.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.66, n.3, 2003.

GUIRRO, R.R.J., CANCELIERI, A.S.; SANT'ANNA, I.L.; Avaliação dos meios intermediários usados na aplicação do ultra-som terapêutico. **Rev. Bras. Fisioter.**, v.5, n.2, p.49-52 , 2001.

HOFFMANN, S; COLE, T; HARTUNG, T. Skin irritation:prevalence, variability and regulatory classification of existing on vivo data from industrial chemicals. **Regulatory toxicology and pharmacology**. 41, p.159-166, 2005.

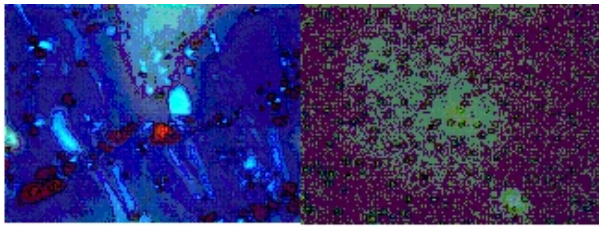
MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. **Manual de quantificação morfológica: Morfometria, alometria e astereologia**. 2.ed, Rio de Janeiro, p.13, 1994.

MITRAGOTRI, S.; EDWARDS, D.A.; BLANKSFCHEIN, D. LANGER, R.; A mechanistic study of ultrasonically enhanced transdermal delivery. **J. Pharm. Sci**, vol.84, p.697-706, 1995.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 158p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SILVA, G. M.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. histopathological, morfometric and stereological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in skin care formulation. **Int. J. Cosmet. Sci.**, Oxford, v.22, p.169-179, 2000.

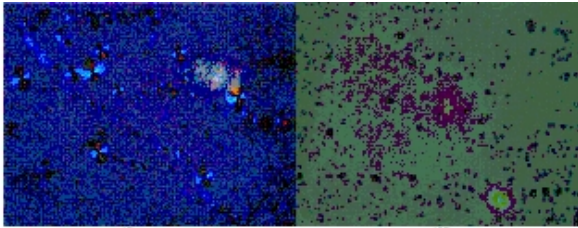
SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **J. Control. Rel.**, 95, p.173-183, 2004.



(I)

(II)

Figura 1. Fotomicrografia da formulação do sistema S_{11} , observado 24 horas após manipulação à temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$). **I:** microscopia com luz polarizada (400X); **II:** microscopia sem polarização (1000X).



(I)

(II)

Figura 2. Fotomicrografia da formulação do sistema S_{41} , observado 24 horas após manipulação à temperatura ambiente ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$). **I:** microscopia com luz polarizada (400X); **II:** microscopia sem polarização (1000X).

Tabela 1. Composição dos diagramas ternários.

Diagrama	Composição
Sistema 1 (S ₁)	Silicone fluido de copolímero glicol, Poliéter funcional silixano, Água destilada
Sistema 2 (S ₂)	Silicone fluido de copolímero glicol, Trilaúril- 4 Fosfato, Água destilada
Sistema 3 (S ₃)	Silicone fluido de copolímero glicol, Polisorbato 80, Água destilada
Sistema 4 (S ₄)	Adipato de Diisopropila, Poliéter funcional silixano, Água destilada
Sistema 5 (S ₅)	Adipato de Diisopropila, Silicone fluido de copolímero glicol, Água destilada