

Čvrste lipidne nanočestice – primena u preparatima za zaštitu od UV zračenja

Jela Milić*, Snežana Savić, Anđelka Kovačević,
Gordana Vuleta

Institut za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju,
Farmaceutski fakultet, Beograd

Kratak sadržaj

Za zaštitu kože od UV zračenja koriste se dva tipa UV filtera: molekularni i fizički UV filteri. Prisustvo UV filtera na površini rožnatog sloja kože može izazvati fototoksične i fotoalergijske reakcije. Razvoj odgovarajućih proizvoda koji će sprečiti penetraciju UV filtera u kožu izazov je za proizvođače kozmetičkih proizvoda. Pokazano je da čvrste lipidne nanočestice (*eng. solid lipid nanoparticles, SLN*) same predstavljaju fizičke UV filtere i da su pogodne kao nosači za filtere zbog svog čestičnog karaktera. Inkorporiranjem molekularnih UV filtera u SLN postiže se sinergistički efekat zaštite, pa je moguće smanjiti količinu molekularnih UV filtera, a da nivo zaštite bude održan (u poređenju sa konvencionalnim emulzionim nosačima). Oksibenzon (benzofenon-3) je lipofilni molekularni UV filter koji nalazi veliku primenu u komercijalnim kozmetičkim preparatima (U/V emulzije i U/V kremovi) za koga je pokazano da se usporeno oslobađa kada se koristi u obliku preparata sa SLN, u poređenju sa emulzijama, tako da se u odgovarajućoj koncentraciji duže zadržava na površini kože. Fine čestice fizičkog UV filtera titan-dioksida (TiO_2), inkorporirane u preparate za zaštitu od sunca, efikasno štite kožu od UV zračenja.

Ključne reči: čvrste lipidne nanočestice, UV filteri,
oksibenzon (benzofenon-3), nanočestice TiO_2

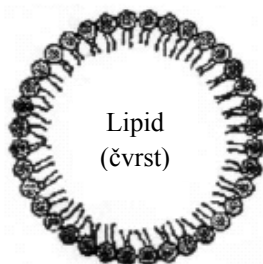
* Autor za korespondenciju: Institut za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju,
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Vojvode Stepe 450, Srbija i Crna Gora

Čvrste lipidne nanočestice

Zbog smanjene debljine ozonskog omotača, velika količina UV-zraka dospeva na površinu zemlje, što povećava frekvencu pojave nekih ozbiljnih bolesti, kao što je kancer kože. Zaštita ljudske kože od svakodnevnog štetnog uticaja UV zraka od velikog je značaja (1).

Dva osnovna sistema za zaštitu kože od UV svetlosti u preparatima za „sunčanje” su: molekulski i fizički UV filteri. Molekulski UV filteri (UV apsorberi) apsorbuju UV zrake, pošto sadrže konjugovane (konjugate) π - i n-elektrone koji se pobuđuju na određenim talasnim dužinama (2). Apsorbovano zračenje se zatim re-emituje kao termalna energija ili kao svetlost (3,4). Fizički UV filteri predstavljaju smeše čvrstih čestica (npr. mikronizirani titan-dioksid i cink-oksidi) koji svoj efekat zaštite ostvaruju mehanizmom jednostavnog rasipanje i odbijanja UV svetlosti. Njihova efikasnost, u velikoj meri zavisi od veličine čestica, indeksa refrakcije i debljine filma na koži (4). Budući da UV filteri treba da ispolje svoj efekat na površini kože, njihovo prodiranje u živi epidermis, dermis i sistemsku cirkulaciju je nepoželjna (5). Njihovo prisustvo na površini rožnatog sloja kože može da dovede do fototoksičnih i fotoalergijskih reakcija (6,7). Stepenn penetracije u velikoj meri zavisi od fizičko-hemijskih osobina same supstance i od prirode vehikuluma u koji su inkorporirane (8,9). Iz tih razloga, razvoj odgovarajućih proizvoda koji će sprečiti penetraciju UV filtera u kožu izazov je za proizvođače kozmetičkih proizvoda (10).

Pokazano je da veoma fine kristalne čvrste lipidne nanočestice, koje su razvijane kao »nosači« za aktivne supstance, takođe mogu da deluju kao blokatori UV zraka, pošto efikasno rasipaju svetlost. Čvrste lipidne nanočestice su vodeno koloidne disperzije čestica submikronskih dimenzija (50-1000 nm). Otkrivene su 1991. godine i uvedene u upotrebu kao efikasni nosači za ciljnu isporuku lekovitih i kozmetički aktivnih supstanci. Sastoje se od biodegradabilnih lipida, PAM, lekovite ili kozmetički aktivne supstance i blok kopolimera. Čvrsto jezgro obično je sastavljeno od glicerida koga okružuje sloj fosfolipida i blok kopolimera, adekvatne konzistencije (**slici 1**) (11).



Slika 1 Šematski prikaz čvrste lipidne nanočestice
Figure 1 Schematic representation of a solid lipid nanoparticle

SLN se mogu kombinovati sa molekulkim UV apsorberima, kako bi se ostvarila bolja zaštita od UV zračenja (12,13). Inkorporiranjem molekulkih UV filtera u čvrste lipidne nanočestice obezbeđuje se duža stabilnost preparata (2). Veliki broj UV filtera danas nalazi primenu u komercijalnim kozmetičkim preparatima koji su U/V ili V/U emulzije ili kremovi, losioni, stikovi.

Kao fotoprotektori mogu se koristiti samo dozvoljene supstance navedene u aneksu VII (pozitivna lista) Kozmetičke direktive (Direktive za kozmetiku) 76/768/EEC, koji prema najnovijim podacima uključuje 25 UV filtera (14, 15).

Oksibenzon (INN), čiji je INCI naziv: Benzophenone - 3 je lipofilni UV filter koji se nalazi na pozitivnoj listi Kozmetičke direktive, i dozvoljen je u maksimalnoj koncentraciji do 10 %, nalazi veliku primenu u komercijalnim kozmetičkim preparatima (emulzije, losioni, kremovi). On se intenzivno proučava u ispitivanjima in vitro i in vivo (16-18). Primenom tehnike tople homogenizacije pod visokim pritiskom mogu se proizvesti fizičko-hemijski stabilne disperzije čvrstih lipidnih nanočestica i nanoemulzija koje sadrže oksibenzon u koncentraciji 2 % i 4 % (tj. 5% i 10 %, u odnosu na lipidni matriks). Sastav uzoraka je dat u **tabeli I** (10).

Tabela I Sastav istraživanih SLN i emulzija (Tego Care[®] 450 - poliglicerol metil glukoza distearat)

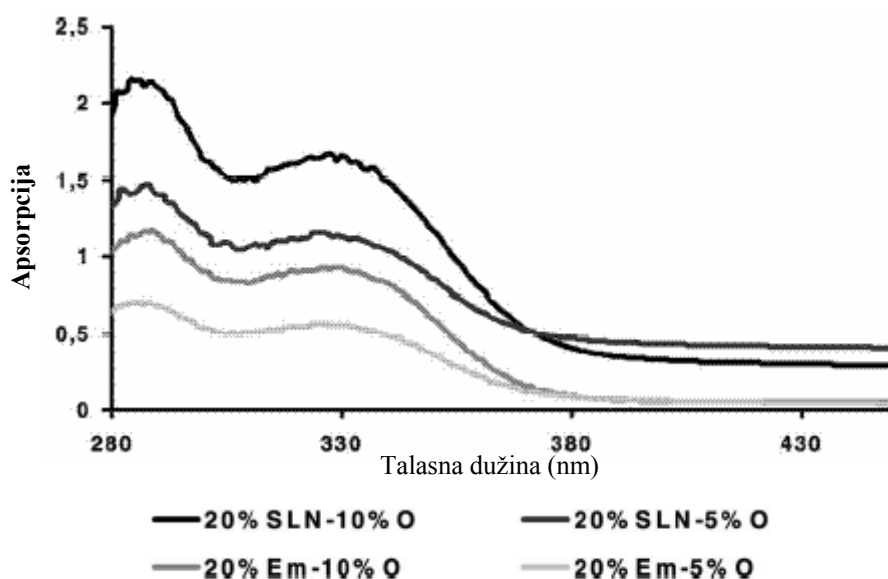
Table I Composition of investigated SLN and emulsion formulations (Tego Care[®] 450 - polyglycerol methyl glucose distearate)

Formulacija	Sastav	% (m/m)
CPTCO 5 % (SLN)	Cetil palmitat	38
	Tego Care 450	5
	Oksibenzon	2
	Voda	55
CPTCO 10 % (SLN)	Cetil palmitat	36
	Tego Care 450	5
	Oksibenzon	4
	Voda	55
MTCO 5 % (Emulzija)	Miglyol 812	38
	Tego Care 450	5
	Oksibenzon	2
	Voda	55
MTCO10% (Emulzija)	Miglyol 812	36
	Tego Care 450	5
	Oksibenzon	4
	Voda	55

Srednja veličina čestica i polidisperzni indeks ovako pripremljenih SLN istraživani su foton korelacionom spektroskopijom posle 200 dana, i nisu uočene značajnije promene. Zbog široke distribucije čestica po veličini, nisu uočeni „Ostvaldovi grozdovi”, koji se javljaju ukoliko je distribucija čestica nehomogena i polidisperzna (10). Sve proizvedene SLN disperzije pokazale su visok zeta potencijal ($- 49.4 \pm 1$ mV) što ukazuje na njihovu dugu stabilnost (10).

Disperzija čvrstih lipidnih nanočestica sa 5 % oksibenzona (u odnosu na lipidni matiks), koji je ispitivan, odgovara modelu „membrane obogaćene lekom ” što ima za posledicu mogućnost iznenadnog oslobađanja UV filtera (18). Kontinuirano oslobađanje može se postići formulacijom odgovarajuće disperzije (10 % oksibenzona), koja predstavlja SLN model „rezervoara obogaćenog lekom ”(10).

Na **slici 2** prikazane su talasne dužine UV svetlosti, koje su korištene pri ispitivanju emulzija ili preparata sa čvrstim lipidnim nanočesticama sa različitim koncentracijama oksibenzona (5 % i 10 %).

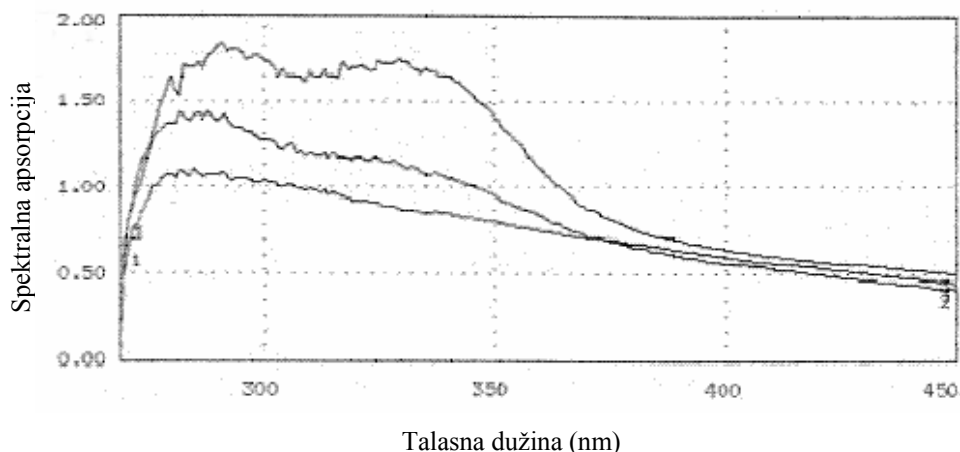


Slika 2 Apsorpcija određenih talasnih dužina od strane skeniranih preparata sa čvrstim lipidnim nanočesticama i referentnih emulzija koje sadrže 5 i 10 % oksibenzona računato u odnosu na udeo lipidne faze

Figure 2 Wavelength scans of SLN formulations and reference emulsions containing 5 and 10% oxybenzone with regard to the lipid matrix ratio

Oba preparata sa SLN (u obe koncentracije UV filtera) pokazala su znatno veću efikasnost od odgovarajućih konvencionalnih emulzija sa istim UV apsorberom. Ovakvi rezultati objašnjavaju se čestičnim karakterom SLN. Pokazalo se da kristali čvrstih lipidnih nanočestica u većoj meri rasipaju UV zrake od jednakih količina tečnih emulzionih kapljica. Smatra se da je primenom SLN moguće smanjiti koncentraciju molekuskog UV filtera za 50 %, a da nivo apsorpcije i nivo zaštite od sunčevog zračenja bude održan na istom nivou (2).

Merenjem mogućnosti apsorpcije, UV zračenje, ispitivanih preparata uočeno je da inkorporiranje molekuskih UV filtera u SLN matriks dovodi do sinergističkog zaštitnog efekta, tj. izmerena UV apsorpcija veća je nego teorijski izračunata vrednost (prost zbir efekata apsorpcije molekuskih UV filtera i disperzije čvrstih lipidnih nanočestica) što je prikazano na **slici 3**. Ovakvi nalazi ukazuju da se ukupna količina molekuskih UV filtera u preparatima čvrstih lipidnih nanočestica može smanjiti, a da se zadrži odgovarajuća efikasnost preparata u pogledu apsorpcije UV zračenja (19).

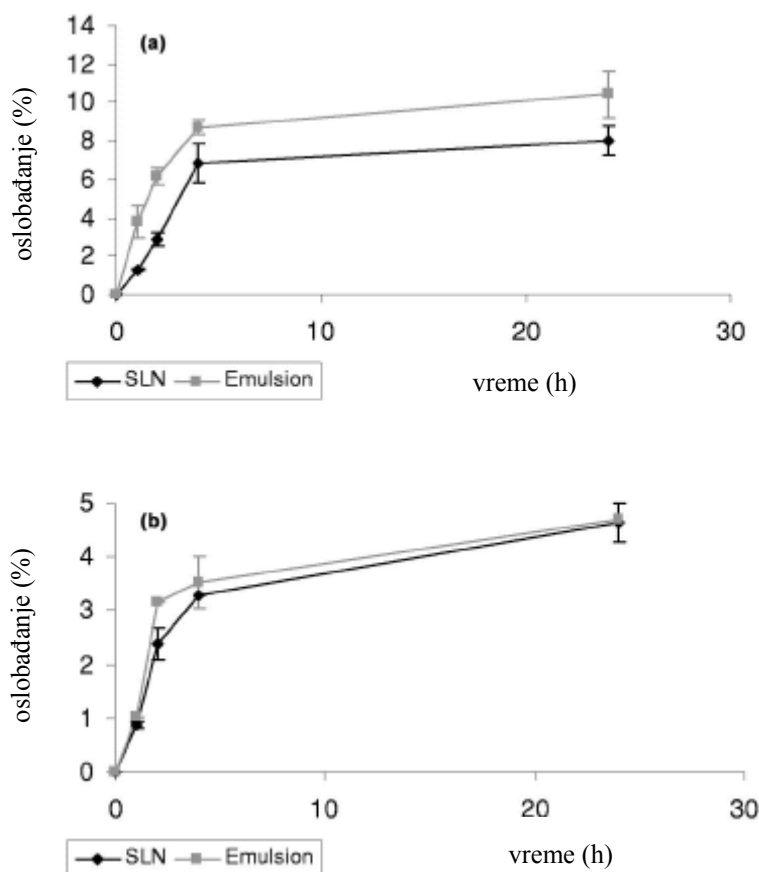


Slika 3 UV scan (apsorpcija prema talasnoj dužini) SLN disperzije koja sadrži UV filtere (gore) prema placebo SLN disperziji (dole); teorijska kriva izračunata iz jednostavne UV apsorpcije molekularnih UV apsorbera i SLN disperzije (sredina)

Figure 3 UV scan (absorption vs. wavelength) of an UV-protective SLN dispersion (upper) vs. placebo SLN dispersion (lower); theoretical curve calculated from the single UV absorption of molecular sunscreen and SLN dispersion (middle)

In vitro ispitivanja oslobađanja supstanci iz nekih nosača

Profili oslobađanja oksibenzona iz različitih preparata koji sadrže 5 % i 10 % UV filtera prikazani su na slike 4a i 4b.



Slika 4 (a) In vitro model: oslobađanje oksibenzona iz SLN (-♦-) i iz emulzija (-■-) koje sadrže 5 % oksibenzona u odnosu na masu lipida (b) in vitro oslobađanje oksibenzona iz SLN (-♦-) i iz emulzija (-■-) koje sadrže 10 % oksibenzona u odnosu na masu lipida

Figure 4 (a) In vitro model: release of oxybenzone from SLN (-♦-) and emulsion (-■-) containing 5 % oxybenzone with regard to the lipid mass (b) In vitro model: release of oxybenzone from SLN (-♦-) and emulsion (-■-) containing 10 % oxybenzone with regard to the lipid mas

Može se zapaziti da se oksibenzon oslobađa u većem stepenu iz emulzija i penetrira dublje u kožu. Penetracija oksibenzona je nepoželjna zbog mogućih fototoksičnih i fotoalergijskih reakcija, kao i zbog sistemskih neželjenih efekata. U emulzijama, uljane kapljice su tečne i supstanca inkorporirana u ulje je slabije vezana, pa je moguće brže oslobađanje. U preparatima sa čvrstim lipidnim nanočesticama, molekuli oksibenzona inkorporirani su u kristalni matriks i njihova difuziona pokretljivost je smanjena (10). Fiksiranje molekulskih UV filtera unutar čvrstog matriksa dodatno smanjuje neželjene efekte koji nastaju zbog njihove penetracije u kožu (19). Primećeno je da nakon primene na kožu dolazi do evaporacije vode iz preparata, fuzije SLN i obrazovanja filma, a oksibenzon se lokalizuje u ovom filmu, i na taj način se smanjuje njegova penetracija (10).

Difuzija kroz nosač je glavni mehanizam kontrolisanog oslobađanja aktivnih supstanci, što je opisano I Fikovim zakonom difuzije. Međutim, ne može se uzeti da je difuzioni koeficijent konstanta za neku supstancu, zbog toga što on u velikoj meri zavisi od koncentracije same supstance. Modeli inkorporiranja supstanci u SLN („rezervoar i membrana obogaćeni aktivnom supstancom”) potvrđuju ove pretpostavke. Manji stepen opterećenja UV filterom vodi obrazovanju čvrstih lipidnih nanočestica sa „membranom obogaćenom oksibenzonom”, koje obezbeđuju brže oslobađanje UV filtera (**slika 4a**). Ako se u SLN inkorporira veća količina oksibenzona (10 %) formiraće se čvrste lipidne nanočestice sa „rezervoarom obogaćenim oksibenzonom” i količina oslobođenog UV filtera se smanjuje za 50 % (**slika 4b**) (10).

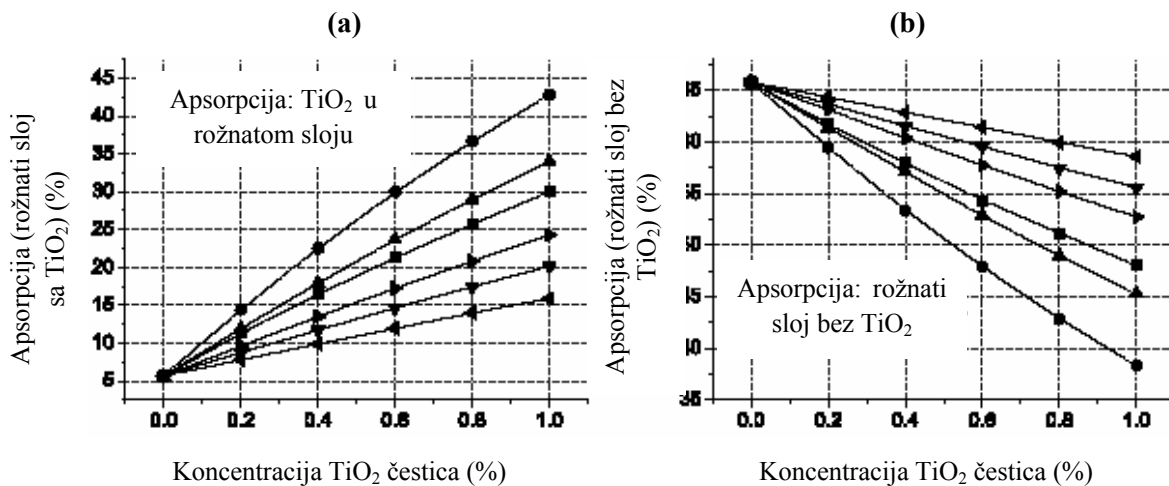
Može se istaći da korišćenje SLN kao nosača za UV filtere pruža mogućnost da se postigne:

- smanjenje brzine oslobađanja aktivne supstance (oksibenzona) kada se koristi preparat sa SLN, u poređenju sa emulzijama, što ima za posledicu da više aktivne supstance ostaje na površini kože (ovaj efekat je veoma poželjan).
- kontinuirano oslobađanje UV filtera zahvaljujući čvrstom lipidnom matriksu. UV filter ostaje duže na površini kože, gde je predviđeno da deluje. Brzina (stepen) oslobađanja i penetracije se smanjuju kada se poveća ukupna koncentracija UV filtera u preparatu .
- smanjenje koncentracije potencijalno štetnih molekulskih UV filtera zahvaljujući osobini SLN da deluju kao fizički UV apsorberi, dok efekat zaštite od sunca (eng. *sun protection factor*) ostaje nepromenjen (10).

Nanočestice titan-dioksida

Pored čvrstih lipidnih nanočestica i neke neorganske čestice nano-dimenzija, (nanočestice titan-dioksida ili cink-oksida) našle su svoje mesto u preparatima za zaštitu od sunca (eng. *sunscreens preparations*). U cilju efikasnije zaštite od UV zračenja, u preparate je moguće ugraditi fine čestice titan-dioksida. Pored rasipanja (raspršivanja) svetlosti nanočestice titan-dioksida pokazuju izrazite apsorbujuće sposobnosti u UV spektralnoj oblasti i smanjuju udeo transmisije svetlosti. Alergijske reakcije koje su posledica primene organskih UV filtera bile su razlog ponovne široke upotrebe neorganskih UV apsorbera (1). U preparatima za zaštitu od sunca, nanočestice štite kožu od UV-B (talasne dužine 290-320 nm) i UV-A (320-400 nm) zraka. UV-C spektar (100-290 nm) skoro je potpuno apsorbovan od strane ozonskog omotača u gornjem sloju zemljine atmosfere (1).

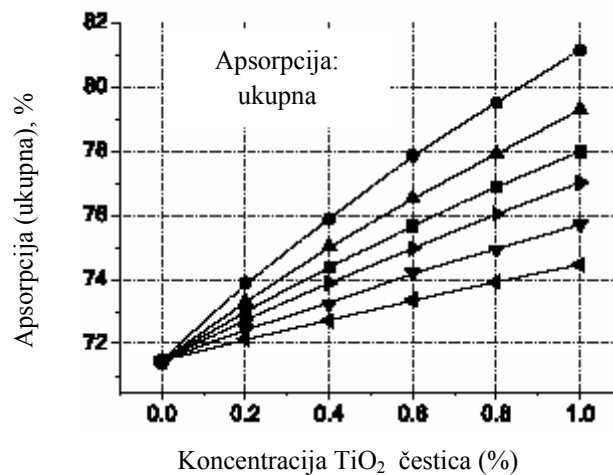
UV zraci talasne dužine od 307-311 nm dovode do najjačih eritema kože; ozonski omotač ne apsorbuje zrake ove talasne dužine i oni dolaze na površinu zemlje. Na **slici 5a** prikazana je apsorpcija u gornjem delu rožnatog sloja, debljine 1 μ m (sa česticama TiO₂) za upadno zračenje (307-311 nm) i za različite dijemetre čestica TiO₂. Očigledno je da se broj apsorbovanih fotona povećava sa povećanjem koncentracije TiO₂ čestica. Na **slici 5a** prikazano je ponašanje čestica TiO₂, dijametra 62 nm, koje u najvećoj meri apsorbuju svetlost ove talasne dužine. Veće čestice (d=150 i 200 nm) pokazuju linearnu apsorpciju sa povećanjem koncentracije. Promene u apsorpciji iznose 5-16 % za čestice dijametra 200 nm i skoro 43 % za čestice dijametra 62 nm. Više fotona se apsorbuje u gornjem delu rožnatog sloja, mali deo dospeva u niže slojeve čiji je dijametar 19 puta veći od dijametra gornjeg sloja, tako da je i apsorpcija manja. Grafički prikaz na **slici 5b**, izgleda kao **slika 5a** u obrnutom obliku, a razlog je veća apsorpcija unutar sloja koji sadrži čestice TiO₂ (1).



Slika 5 Apsorpcija u gornjem (sa česticama titan-dioksida) (a) i donjem delu (b) rožnatog sloja za upadno zračenje od 307–311 nm. Volumenska koncentracija nanočestica se menja od 0 % do 1 %. Dijametri titan-dioksid čestica su: ■: 25 nm, ●: 62 nm, ▲: 85 nm, ▶: 125 nm, ▼: 150 nm i ◀: 200 nm

Figure 5 Absorption within the upper (with TiO₂ particles) (a) and lower part (b) of the horny layer for incident radiation of 307–311 nm. The volume concentration of nanoparticles changes from 0% to 1%. The diameters of the TiO₂ particles are: ■: 25 nm, ●: 62 nm, ▲: 85 nm, ▶: 125 nm, ▼: 150 nm i ◀: 200 nm

Poređenjem prikaza na **slici 5a i 5b** autori su procenili ukupnu apsorpciju unutar celog rožnatog sloja debljine 20 μm što se vidi na **slici 6** i zaključili da je ukupna apsorpcija skoro 75 % za čestice dijametra 200 nm, a 81 % za čestice dijametra 62 nm (1).



Slika 6 Apsorpcija u celom rožnatom sloju (debljina 20 μm) za upadno zračenje od 307–311 nm. Oblici krivih slični su krivama na slici 5 (a) zbog toga što je apsorpcija u gornjem delu rožnatog sloja dominantan faktor. Dijametri čestica su: ■: 25 nm, ●: 62 nm, ▲: 85 nm, ▶: 125 nm, ▼: 150 nm i ◄: 200 nm.

Figure 6 Absorption within the whole horny layer (20 μm thick) for the incident radiation of 307–311 nm. The shapes of the curves are similar to those in figure 5(a) because the absorption in the upper part of the horny layer is a dominating factor. Diameters of the particles are: ■: 25 nm, ●: 62 nm, ▲: 85 nm, ▶: 125 nm, ▼: 150 nm i ◄: 200 nm.

Literatura

1. Popov PA, Priezzhev AV, Lademann J, Myllyolä R. TiO₂ nanoparticles as an effective UV-B skin-protective compound in sunscreens J. Phys. D: Appl. Phys 2005; 38: 2564–70.
2. Wissing SA, Müller RH. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). Int Pharm J 2003; 254: 65-8.
3. Patel NP, Highton A, Moy RL. Properties of topical sunscreen formulations. J Dermatol Surg Oncol 1992; 18: 316–20.

4. Wolf R, Wolf D, Morganti P, Ruocco V. Sunscreens. *Clin Dermatol* 2001;19: 452–9.
5. Goossens A, Beck ME, Haneke E, McFadden JP, Nolting S, Durupt G, Ries G, Adverse cutaneous reactions to cosmetic allergens. *Contact Dermat* 1999; 40: 112–3.
6. Potard G, Laugel C, Schaefer H, Margel J.-P. The striping technique: in vitro absorption and penetration of five UV filters on excised fresh human skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2000; 13: 336–44.
7. Ricci C, Pazzaglia M, Tosti A. Photocontact dermatitis from UV filters. *Contact Dermat* 1998; 38: 343–4.
8. Benech-Kieffer F, Wegrich P, Schwarzenbach R, Klecak, Weber T, Leclaire J, Schaefer H. Percutaneous absorption of sunscreens in vitro: interspecies comparison, skin models and reproducibility aspects. *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol* 2000; 13: 324–35.
9. Fernandez C, Marti-Mestres G, Ramos J, Maillols HC. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of ‘in vitro’ and ‘in vivo’ skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions *J Pharm Biomed Anal* 2000; 24: 55–165.
10. Wissing SA, Müller RH. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration. *J Controlled Rel.*2002; 81: 225–33.
11. Šentjure M, Ahlin P, Štrancar J, Kristl J. Investigation of solid lipid nanoparticles by EPR, www.cmbl.org.pl/sentjure.htm (2005).
12. Wissing SA, Müller RH. A novel sunscreen system based on tocopherol acetate incorporated into solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Cosm Sci.* 2001; 23: 233–43.
13. Wissing SA, Müller RH. Solid lipid nanoparticles (SLNTM) - a novel carrier for UV blockers. *Pharmazie.* 2001; 56: 783–6.
14. Cosmetic Directive 76/768/EEC.
15. Sunscreen regulations compared, *Personal care*, july 2005, 12 – 15.
16. Treffel P, Gabard B. Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filters from two vehicles *Pharm Res* 1996;13: 770–4.
17. Hagedorn-Leweke U, Lippold BC. Absorption of sunscreens and other compounds through human skin in vivo: derivation of a method to predict maximum fluxes. *Pharm Res* 1995; 12: 1354–60.
18. Gupta VK, Zatz JL, Rerek M. Percutaneous absorption of sunscreens through micro-Yucatan pig skin in vitro. *Pharm Res* 1999; 16: 1602–7.
19. Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 54 (1 Suppl): 131S–155S.

Solid lipid nanoparticles – application in sunscreens

**Jela Milić, Snežana Savić, Anđelka Kovačević,
Gordana Vuleta**

Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology,
Faculty of Pharmacy, Belgrade

Summary

There are two different ways of action for sunscreens: physical sunscreens and molecular sunscreens. The presence of sunscreens on top of the horny layer can cause phototoxic and photoallergic reactions. The development of suitable products which prevent penetration of the sunscreen into the skin is a challenge for manufacturers of cosmetic products. It has been shown that solid lipid nanoparticles act as active carriers for sunscreens due to their particulate character i.e. they represent physical sunscreens on their own. Incorporation of molecular sunscreens into SLN has a synergistic effect on the protective characteristics. Therefore, amount of molecular sunscreen could be decreased while maintaining the protection level (compared to a conventional emulsion). Oxybenzone (benzophenone-3) is lipophilic sunscreen is widely used in commercially available cosmetic formulations such as lotions, o/w emulsions and has been studied intensely in vitro and in vivo. The release rate of oxybenzone is decreased when using SLN formulations compared to emulsions, thus more of the active remains on the surface of the skin; this effect is desired. Titanium dioxide (TiO₂) fine particles are embedded with sunscreens into the skin to effectively attenuate UV-B radiation.

Key words: solid lipid nanoparticles, UV filters,
oxybenzone (benzophenone-3), TiO₂ nanoparticles
