

DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO MELANINA PARA AUMENTAR A EFICÁCIA DE DEPILAÇÃO ATRAVÉS DE LUZ PULSADA INTENSA¹

DEVELOPMENT OF NANOPARTICLES CONTAINING MELANIN TO INCREASE THE EFFECTIVENESS OF HAIR REMOVAL THROUGH INTENSE PULSED LIGHT

Gabriela Moraes Barbosa², Cayane Genro Santos³, Candice Caroline Felippi⁴, Renata Vidor Contri⁴, Solange Binotto Fagan⁵ e Renata Platcheck Raffin⁶

RESUMO

A depilação, através de luz intensa pulsada, tem sido cada vez mais utilizada e funciona através de um intenso pulso de luz que transmite energia através da melanina até o bulbo folicular causando a eliminação do mesmo. A grande limitação desta técnica é sua baixa eficiência em pessoas com pelos claros e brancos, pois há pouca melanina capaz de transmitir o pulso. Desta forma, a nanotecnologia surge como alternativa eficaz para veicular um cromóforo, a própria melanina para aumentar a efetividade destes procedimentos estéticos. Nanopartículas lipídicas foram desenvolvidas contendo melanina em diferentes concentrações e foram caracterizadas de acordo com seu aspecto, pH, densidade, diâmetro de partícula e potencial zeta. A formulação mais promissora e estável foi estudada clinicamente quanto à sua eficácia. Três áreas no antebraço de voluntários foram utilizadas para uma aplicação de luz pulsada intensa após aplicação de gel contendo nanopartículas de melanina, melanina não encapsulada ou gel puro. Como resultado, obtivemos nanopartículas cuja suspensão foi acinzentada, homogênea com pH e densidade muito semelhantes, independente da concentração de melanina. Apenas a formulação com 0,0075% de melanina apresentou diâmetro, potencial zeta e estabilidade adequados. O teste clínico de uma aplicação de luz intensa pulsada demonstrou a maior efetividade de depilação das nanopartículas de melanina, com resultado intermediário para melanina livre e o pior resultado para o placebo nos quesitos redução de crescimento dos fios, afinamento dos pelos e redução da quantidade e densidade dos pelos. Assim, podemos concluir que as nanopartículas de melanina foram adequadas no uso pretendido.

Palavras-chave: cromóforo, fotodepilação, nanotecnologia.

ABSTRACT

Hair removal may work via an intense pulse of light that transmits energy through melanin to the follicular bulb causing the disposal thereof. The major limitation of this technique is its low efficiency in people with light and white hairs, because there is little melanin capable of transmitting the pulse. Therefore, nanotechnology has emerged as an effective alternative to provide a chromophore, melanin itself to enhance the aesthetic effectiveness of these procedures. Lipid nanoparticles were developed containing melanin at different concentrations and were characterized according to their appearance, pH, density, particle diameter and zeta potential. The most promising

¹ Trabalho de Extensão - Rede Sibratec de Nanocosméticos em parceria UNIFRA/INVENTIVA.

² Aluna de mestrado do Programa de Pós-graduação em Nanociências. Bolsista CNPq (DTI-B) - Centro Universitário Franciscano. E-mail: gabimbfarm@gmail.com

³ Aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mail: caygenro@gmail.com

⁴ Colaboradoras - Inventiva Indústria e Inovação em Produtos Cosméticos Ltda. E-mail: candice@inventiva.ind.br; projetos@inventiva.ind.br

⁵ Coordenadora. Professora do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mail: solange.fagan@gmail.com

⁶ Orientadora. Professora do Programa de Pós-graduação em Nanociências - Centro Universitário Franciscano. E-mail: reraffin@gmail.com

and stable formulation was clinically studied for their effectiveness. Three areas on the volunteers' forearms were used for an application of intense pulsed light after gel application containing melanin nanoparticles, melanin unencapsulated or pure gel. As a result, we obtained nanoparticles whose suspension was gray, homogeneous with pH and density very similar, regardless of the concentration of melanin. Only the formulation with 0.0075% of melanin presented adequate diameter, zeta potential and stability. The clinical trial of an application of intense pulsed light demonstrated the greater effectiveness for hair removal when applied with nanoparticles of melanin, with intermediate result for free melanin and the worst result with placebo in the categories reduction of hair growth, hair thinning and its reduction of quantity and density. Thus, we can conclude that the melanin nanoparticles were suitable for its intended use.

Keywords: *chromophore, photoepilation, nanotechnology.*

INTRODUÇÃO

Os lasers têm sido usados na dermatologia há 30 anos. Os avanços tecnológicos têm permitido desenvolvimento de equipamentos mais poderosos, versáteis, acessíveis em termos de preço para tratar diferentes situações com segurança e efetividade (LANIGAN, 2008). Assim, o tratamento com lasers para remoção de pelos não desenhados tem se tornado uma grande área de uso destes novos equipamentos. Segundo a *American Academy of Plastic Surgery*, nos EUA, a depilação a laser é o segundo tratamento mais realizado, atrás apenas de aplicação de toxina botulínica. Os tratamentos de fotodepilação evoluíram, iniciando com laser de rubi (694 nm), Alexandrita (755 nm), sistemas de laser de diodo (800-810 nm), YAG (1064 nm) e os sistemas mais modernos de luz intensa pulsada, que é uma fonte de luz não laser (GOLD, 2007).

Independentemente da fonte de luz, a remoção dos pelos de forma duradoura se dá pelo princípio da fototermólise, no qual o dano térmico ocorre na pele apenas em um cromóforo específico, deixando demais cromóforos intocados. Desta forma, na remoção de pelos o cromóforo é a melanina dos pelos e do bulbo capilar, sendo que a luz é capaz de danificar as células tronco pluripotentes dos bulbos e suprir o crescimento dos fios.

Os sistemas de luz intensa pulsada utilizam lâmpadas de xenônio e emitem uma luz policromática com comprimento de onda entre 515 e 1200 nm. A partir daí, filtros são utilizados para selecionar o comprimento de onda desejado. O pulso dura milissegundos com energia suficiente para atingir o bulbo capilar (GOLD, 2007; TRELLES, 2014). A grande demanda por este tipo de depilação trouxe ao mercado equipamentos de uso caseiro com luz intensa pulsada. Estes equipamentos levaram a uma indução da fase telógena seguida por miniaturização dos fios, que foi reversível nos estudos publicados (TRELLES, 2014). Pessoas claras e com pelos escuros são os melhores pacientes para este tratamento, pois pelos com falta de melanina não são capazes de transmitir o calor do laser até o bulbo (LANIGAN, 2008). Melaninas são biopolímeros presentes em uma grande variedade de seres vivos e que apresentam propriedades de absorção de luz, sendo responsáveis pela fotoproteção, fotossensibilização, regulação térmica e ação antioxidante em diferentes organismos (MORAES, 2010).

A via transfolicular tem sido a menos estudada das vias de permeação de ativo na pele, os folículos pilosos representam apenas 0,1% da área da pele. Porém, diversos estudos têm retratado esta via como importante via de penetração e de acúmulo dos ativos na pele (SERRANO et al., 2015). Melanina já foi encapsulada em lipossomas a fim de aumentar sua concentração nos folículos e com isso obter maior eficácia na fotodepilação. Para obter maior permeação, Serrano et al. (2015) associaram aos lipossomas a técnica de microagulhamento, obtendo resultados *in vitro* favoráveis, porém esta técnica é dolorosa e não pode ser usada em casa (SERRANO et al., 2015).

Desta forma, a produção de nanopartículas contendo um cromóforo, neste caso, a própria melanina, torna-se uma alternativa promissora no aumento da eficácia de procedimentos de fotodepilação, permitindo a depilação de pessoas com pelos claros e brancos. Assim, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação da eficácia na fotodepilação de nanopartículas lipídicas contendo melanina.

MATERIAL E MÉTODOS

A melanina sintética (pureza > 97%) foi adquirida da Sigma Aldrich. Todos os demais reagentes utilizados foram de qualidade cosmética ou para análise.

PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO MELANINA

As nanopartículas lipídicas foram produzidas na empresa Inventiva através de processo próprio e protegido por sigilo industrial. As nanopartículas lipídicas contendo melanina foram desenvolvidas alterando a concentração de melanina nas formulações entre 0,0025 e 0,01% (m/v). Para encapsulação, a melanina foi dissolvida em etoxidiglicol antes de ser adicionada na fase oleosa das nanopartículas, durante o processo de produção. A composição qualitativa das formulações encontra-se na tabela 1.

Tabela 1 - Composição qualitativa das formulações.

Material	INCI
Etoxidiglicol	Ethoxydiglycol
Melanina	Melanin
Butil hidroxi tolueno	BHT
Dimeticone	Dimethicone
Ciclometicone	Cyclopentassiloxane
Monoestearato de sorbitano	Sorbitan stearate
Monoleato de sorbitano	Sorbitan oleate
Palmitato de cetila	Cetyl palmitate
Polissorbato 80	Polysorbate 80
Triglicerídeos de cadeia média	Capric/caprylic triglycerides
Água	Aqua
Imidazolidinil ureia	Imidazolidinyl urea
Metil cloro isotiazolinona	Methyl chloro isothiazolinone
Metil isotiazolinone	Methyl ISO thiazolinone

ESTABILIDADE TÉRMICA

As amostras de estudo foram acondicionadas em frascos plásticos leitosos, embalagem final do ativo. Após o envase, as amostras foram armazenadas à temperatura de $45 \pm 2^\circ\text{C}$, em incubadora Cienlab B.O.D. Foram estabelecidos os seguintes tempos de armazenamento: 30 (trinta), 60 (sessenta) e 90 (noventa) dias. Ao final, cada amostra foi avaliada em triplicata quanto às características organolépticas, pH, densidade e centrifugação em comparação com a amostra em temperatura ambiente.

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

As formulações foram avaliadas visualmente quanto ao aspecto e à cor. Para melhor diferenciação quanto à coloração e à presença de partículas, precipitados, separação de fases, as amostras foram dispostas em béqueres de vidro.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

As medições de pH foram realizadas utilizando-se potenciômetro Hanna pH 21. A densidade foi avaliada com o uso de picnômetro PHOX de 10 mL. O diâmetro de partícula e o potencial zeta foram analisados em equipamento ZetaSizer ZS NanoSeries (Malvern Instruments). Para o diâmetro, as amostras foram diluídas 500 x (v/v) em água e para o potencial zeta, a mesma diluição foi utilizada porém em solução de cloreto de sódio 10 mM.

TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO

A formulação final foi avaliada quanto a sua estabilidade à centrifugação. As amostras foram dispostas em tubos de ensaio, os quais foram colocados em centrífuga Centribio 80-2B, e submetidos à centrifugação em velocidade de 3000 rpm, por 20 minutos. Após a centrifugação, fez-se a avaliação visual das amostras para observação de separação de fases e/ou precipitações.

TESTE CLÍNICO DE EFICÁCIA

O teste clínico de eficácia foi realizado no IPclin, Instituto de Pesquisa Clínica Integrada Ltda sob códigos IPC.2015.0071 / IPC.2015.0072 / IPC.2015.0073 e aprovação do comitê de ética nº 49984515.5.0000.8021. Para o estudo, foram recrutadas 34 voluntárias do sexo feminino com

idade entre 18 e 62 anos e fototipos (Fitzpatrick) II a IV. Os produtos testados foram um gel de goma xantana (3%) sem ativos (placebo), um gel de goma xantana (3%) com melanina na concentração de 0,000375% (previamente dissolvida em etoxidiglicol) (Livre) e um gel de goma xantana (3%) contendo 5% de nanopartículas de melanina (NP1).

Inicialmente foi feita uma raspagem na região do teste (antebraço), para potencializar a eficácia da depilação por luz pulsada. Os produtos foram, então, aplicados na região do teste no próprio instituto, por técnico devidamente treinado. A região mais pilosa do antebraço foi dividida em 3 sítios de 3,0 x 3,0 cm para cada voluntário, sendo feita a aplicação de cada produto em um dos sítios, segundo aleatorização. Os produtos foram aplicados com auxílio de seringa descartável de 1 mL, na razão de 2 mg/cm², e espalhados com dedo recoberto por dedeira de látex descartável. Após a aplicação dos produtos, foi realizado procedimento de depilação por luz pulsada nas 3 regiões por esteticista treinada sob a supervisão do médico dermatologista. Foi realizada avaliação médica inicial no momento da inclusão dos voluntários para verificação da ausência de sinais clínicos iniciais incompatíveis com a inclusão dos voluntários. Após uso do produto, os voluntários retornaram ao Instituto para avaliação médica final dos sinais clínicos apresentados e sensações de desconforto referidas.

Para a avaliação da apreciabilidade cosmética, os voluntários responderam a um questionário após 30 dias do procedimento de aplicação do produto e posterior depilação referente a alguns parâmetros, classificando qual dos 3 produtos foi o melhor (determinar a ordem de melhor desempenho – primeiro, segundo e terceiro lugar). Os quesitos foram inibição do crescimento dos pelos na região, afinamento dos pelos na região e diminuição da quantidade e densidade de pelos na região.

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS CONTENDO MELANINA

Quatro formulações foram produzidas com sucesso, com melanina nas concentrações de 0,0075% (NP1), 0,005% (NP2), 0,0033% (NP3) e 0,0025% (NP4). Concentrações superiores a 0,0075% mostraram-se inviáveis uma vez que apresentaram quantidade visível de precipitado preto no fundo do béquer, indicando a não encapsulação de pelo menos parte do ativo.

A tabela 2 resume as características físico-químicas das nanopartículas. Todas as formulações se apresentaram como suspensões leitosas, opacas com coloração cinza. Os valores de pH e densidade foram muito próximos, sem variação entre as amostras (7,30 a 7,54 e 0,994 a 0,995 g/mL, respectivamente).

Tabela 2 - Resumo das características físico-químicas das nanopartículas de melanina.

Formulação	pH	Densidade (g/mL)	Diâmetro (nm)	Índice de polidispersão	Potencial zeta (mV)
NP1 (0,0075% de melanina)	7,30 ± 0,07	0,995 ± 0,000	194,5 ± 4,60	0,190 ± 0,007	-10,60 ± 0,99
NP2 (0,005% de melanina)	7,43 ± 0,05	0,995 ± 0,000	192,9 ± 2,76	0,177 ± 0,009	-8,98 ± 2,14
NP3 (0,0033% de melanina)	7,54 ± 0,07	0,994 ± 0,001	300,8* ± 70,14	0,321 ± 0,056	-9,52 ± 1,75
NP4 (0,0025% de melanina)	7,51 ± 0,21	0,995 ± 0,000	223,1 ± 8,76	0,224 ± 0,40	-16,4 ± 1,70

* Presença de 2 picos.

Como pode ser visto, apenas a formulação NP3 apresentou 2 picos e diâmetro aumentado. As demais apresentaram diâmetro nanométrico com apenas um pico, estreita distribuição de partículas (visto pelos índices de polidispersão menores que 0,2). O potencial zeta também foi muito semelhante entre as amostras, cerca de -10 mV.

Com base nos resultados descritos acima, as formulações NP1 e NP4 foram selecionadas para estudo de estabilidade. A formulação NP1 apresentou queda no valor de pH para 5,47 após 90 dias a 45°C, sem apresentar alteração da densidade e do aspecto. O diâmetro de partícula se manteve estável com valor de 194 nm.

Para a formulação NP4, a redução do pH também foi observada, tendo valor de 5,55. A densidade medida após estabilidade foi de 0,9960, com mínima variação em relação ao tempo inicial. As amostras não apresentaram alteração após centrifugação. O diâmetro de partícula apresentou aumento de tamanho para 430 nm, com presença de 2 picos.

TESTE CLÍNICO DE EFICÁCIA

Todas as 34 voluntárias terminaram o estudo e nenhuma apresentou reação adversa pelo uso dos produtos.

A figura 1 apresenta a classificação da ordem de eficácia de inibição do crescimento de pelos dos produtos. A figura 2 apresenta os resultados em relação ao afinamento dos pelos e a figura 3 em relação à diminuição da quantidade e densidade dos pelos.

Figura 1 - Classificação dos voluntários na ordem de eficácia do gel contendo melanina não encapsulada (Livre), gel contendo nanopartículas de melanina NP1 5% e o gel sem ativos (Placebo) testados em relação à inibição do crescimento dos pelos.

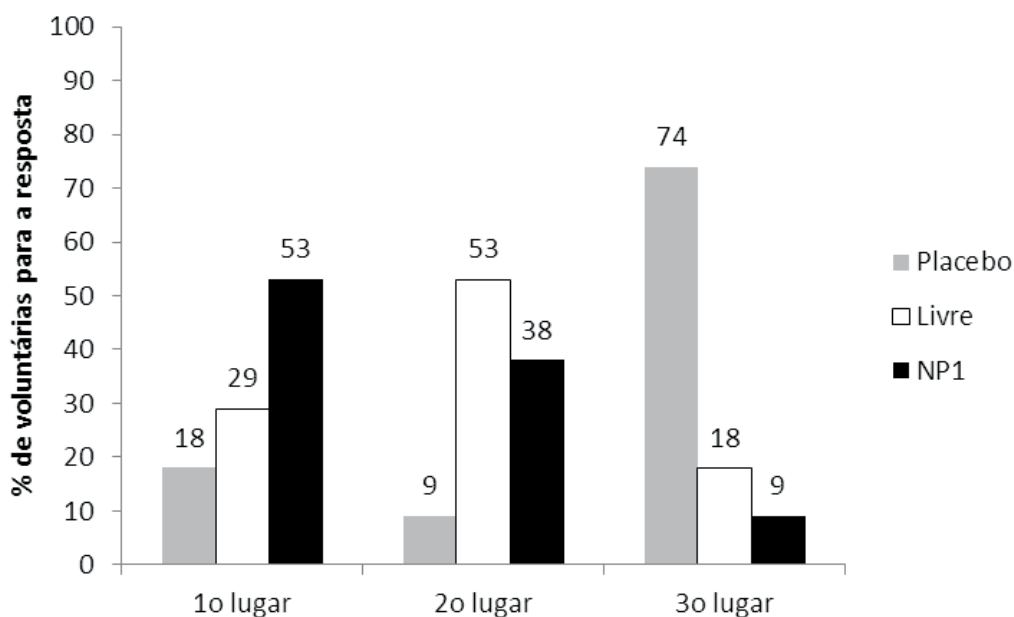


Figura 2 - Classificação dos voluntários na ordem de eficácia do gel contendo melanina não encapsulada (Livre), gel contendo nanopartículas de melanina NP1 5% e o gel sem ativos (Placebo) testados em relação ao afinamento dos pelos.

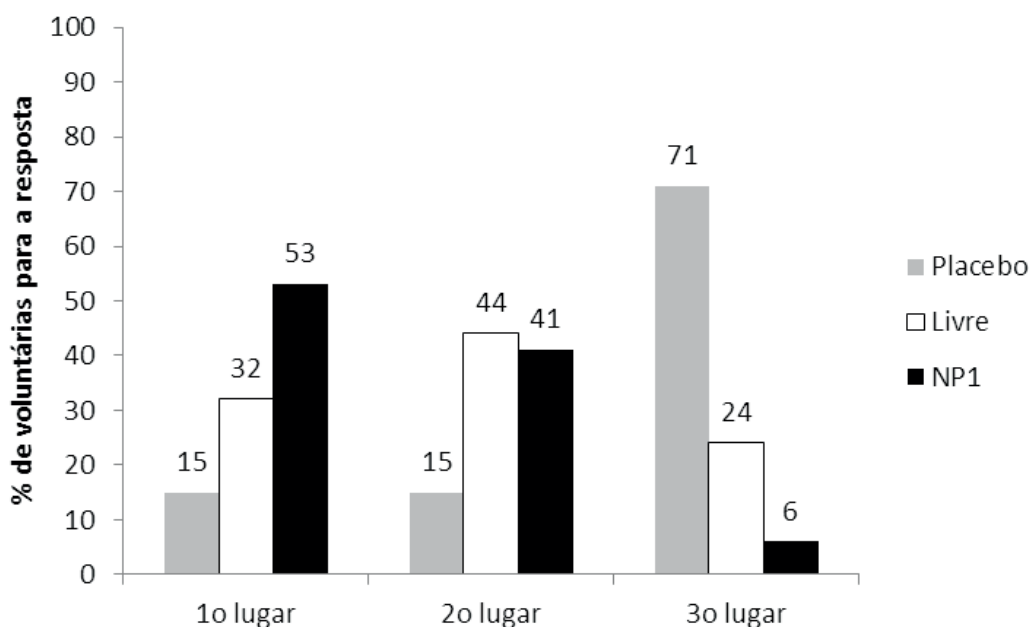
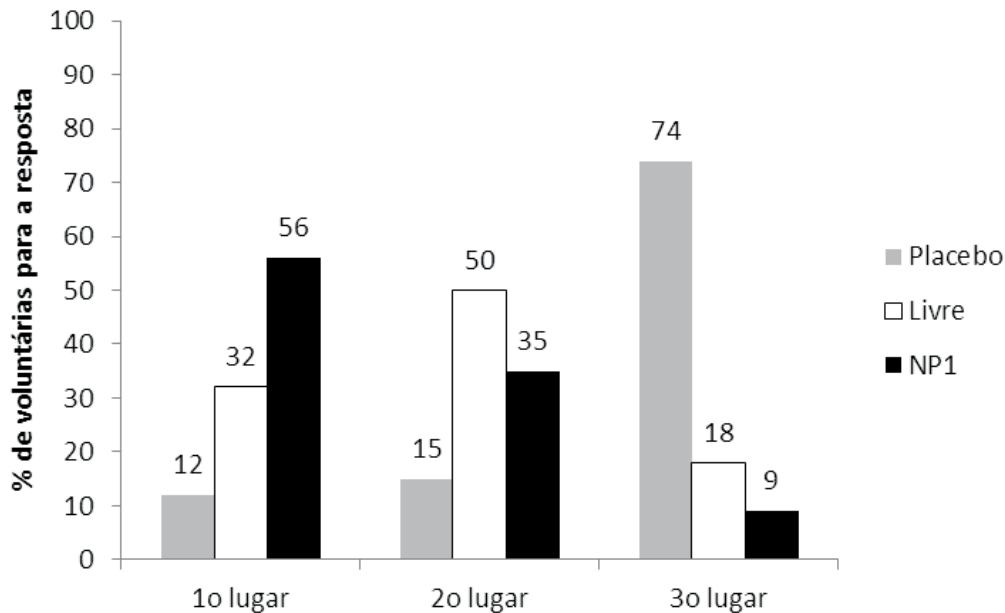


Figura 3 - Classificação dos voluntários na ordem de eficácia do gel contendo melanina não encapsulada (Livre), gel contendo nanopartículas de melanina NP1 5% e o gel sem ativos (Placebo) testados em relação à diminuição da quantidade e densidade dos pelos.



Como pode ser visto nas figuras acima, em todos os casos, o placebo foi o produto que exerceu menor eficácia, sendo o 3º colocado em mais de 70% dos voluntários para todos os quesitos. O gel com melanina não encapsulada foi o que obteve resultado intermediário, sendo que para inibição do crescimento de pelos e redução da quantidade e densidade obteve como 2º colocado 50% ou mais e no quesito afinamento de pelos, obteve 44%, porém 24% como 3º colocado. Por fim, a formulação de melhor desempenho foi com NP1, contendo melanina nanoencapsulada, obtendo como 1º colocado mais de 50% em todos os quesitos e menos de 10% como 3º colocado também em todos os quesitos.

Artigos anteriores já haviam descrito o uso de melanina lipossomada tanto na adesão aos fios quanto na fotodepilação, porém em nenhum dos casos é descrito o uso de nanopartículas lipídicas (LI et al., 1993; SAND et al., 2007). Li et al. (1993) demonstraram pela primeira vez em cultura de células que os lipossomas contendo melanina foram capazes de penetrar na fibra capilar, simulando uma pigmentação normal de fios. Já o segundo estudo, os lipossomas contendo melanina foram aplicados na forma de spray e o laser utilizado na depilação foi o de arranjo de diodo. Neste estudo, os autores concluíram que houve uma redução de pelos nos voluntários, porém foi tão pouca que não compensou o custo do uso do produto (SAND et al., 2007). Por fim, uma abordagem mais recente (SERRANO et al., 2015), os pesquisadores afirmam que o melhor resultado no uso de melanina em

fotodepilação só é obtido com microagulhamento, técnica dolorida que requer uso de um turbo *roller* de agulhamento para perfurar o estrato córneo e permitir a entrada do cromóforo na pele.

CONCLUSÃO

O nanoencapsulamento da melanina foi possível, sendo obtidas formulações estáveis, com diâmetro de partícula adequado e que se manteve ao longo do tempo. Em relação à eficácia na depilação por luz pulsada intensa, o produto gel com nanopartículas de melanina a 5% apresentou o melhor desempenho; o produto gel com melanina livre obteve o segundo melhor desempenho; e o produto placebo obteve o terceiro melhor desempenho na avaliação por questionamento aos voluntários em relação à eficácia depilatória. Com base nos trabalhos anteriores, podemos concluir que as nanopartículas contendo melanina apresentaram resultados superiores aos já descritos sem uso de técnicas dolorosas e que permite o uso de equipamentos de luz pulsada intensa de uso caseiro.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Finep (Rede Sibratec de Nanocosméticos) e o CNPq. Agradecem também o IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada Ltda.

REFERÊNCIAS

GOLD, M. H. Lasers and light sources for the removal of unwanted hair. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 443-453, 2007.

LANIGAN, S. W. Lasers in dermatology. **Medical Laser Application**, v. 23, p. 51-54, 2008.

LI, L. et al. Liposomes can specifically target entrapped melanin to hair follicles in histocultured skin. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 29A, p. 192-194, 1993.

MORAES, M. et al. Polymeric scaffolds for enhanced stability of melanin incorporated in liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 350, p. 268-274, 2010.

SAND, M. et al. A Randomized, Controlled, Double-Blind Study Evaluating Melanin-Encapsulated Liposomes as a Chromophore for Laser Hair Removal of Blond, White, and Gray Hair. **Annals in Plastic Surgery**, v. 58, p. 551-554, 2007.

SERRANO, G. et al. Microneedling dilates the follicular infundibulum and increases transfollicular absorption of liposomal sepia melanin. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 8, p. 313-318, 2015.

TRELLES, M. A. et al. Clinical and microscopic evaluation of long-term (6 months) epilation effects of the impulse personal home use intense pulsed light (IPL) device. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, p. 160-168, 2014.