

## ESTABILIDAD DE LA ENZIMA Cu-Zn SUPERÓXIDO DISMUTASA INMOVILIZADA EN NANOSFERAS 100 PARA UNA FORMULACIÓN COSMÉTICA

### Cu-Zn SUPEROXIDE DISMUTASE STABILITY ON IMMOBILIZED NANOPARTICLES AS AN ALTERNATIVE FOR A NEW COSMETIC FORMULATION

D. Fernández<sup>1</sup>, A. Fernández<sup>2</sup>, Y. Gelabert<sup>3</sup>, C. Pino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador

<sup>2</sup> Investigador Independiente

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones Biomédicas, Cuba

*Artículo recibido: 07/05/2018*

*Artículo aceptado: 28/02/2019*

#### RESUMEN

Se realizó un estudio de estabilidad de tres formulaciones cosméticas F-1, F-2 y F-3 que se obtuvieron con la adición de cera de abeja, ácido esteárico y trietanolamina respectivamente, como agentes emulsificantes. Se utilizó como principio activo la enzima CuZn – Superóxido Dismutasa (CuZn-SOD) proveniente de eritrocitos humanos, inmovilizada en las Nanosferas 100 (CuZn-SOD-N100), sistema matricial de liberación controlada.

Se analizó la influencia que ejerce la temperatura y la incidencia de la luz sobre la actividad de la enzima inmovilizada. El producto muestreado fue ensayado de acuerdo con el cronograma de ensayos de estabilidad en los tiempos 0, 30, 60 y 90 días. Se demostró que los factores analizados influyen notablemente sobre la estabilidad de la CuZn-SOD-N100, siendo la formulación 3 la más estable a la temperatura de refrigeración y estufa, pero no a la incidencia de la luz, donde la formulación 2 es la más resistente a la fotooxidación.

**Palabras claves:** CuZn – Superóxido Dismutasa, estudio de estabilidad, sistema matricial de liberación controlada, Nanosferas 100.

#### ABSTRACT

A stability study of three cosmetic formulations F-1, F-2 and F-3 was carried out, which were obtained with the addition of beeswax, stearic acid and triethanolamine respectively, as emulsifying agents. The enzyme CuZn - Superoxide Dismutase (CuZn-SOD) from human erythrocytes, immobilized in the Nanospheres 100 (CuZn-SOD-N100), controlled-release matrix system, was used as an active principle.

The influence exerted by temperature and the incidence of light on the activity of the immobilized enzyme was analyzed. The sampled product was tested according to the stability test schedule at times 0, 30, 60 and 90 days. It was demonstrated that the factors analyzed significantly influence the stability of CuZn-SOD-N100, with Formulation 3 being the most stable at the refrigeration and stove temperature, but not at the incidence of light, where formulation 2 is the more resistant to photooxidation.

**Keywords:** CuZn - Superoxide Dismutase, Stability study, controlled release matrix system, Nanospheres 100

## 1. INTRODUCCIÓN

La Industria cosmética ha desempeñado un papel importante en el cuidado, conservación y apariencia del cuerpo humano. En la actualidad los productos cosméticos se enfocan a la protección de la piel cuando está expuesta a agresiones externas, fundamentalmente la luz solar, cuyo signo vital es el envejecimiento cutáneo.

Numerosos han sido los principios activos obtenidos de diversas fuentes que se han utilizado para la protección y reparación de la piel envejecida, entre ellos tenemos, la elaboración de cremas faciales con extractos de aceites obtenidos de plantas como: *Mauritua flexuosa* (Morete), *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi) y *Oenocarpus bataua* (Ungurahua) (Mosquera Tayupanta, Noriega, Tapia, & H Pérez, 2012).

Los superóxidos dismutasas (SOD) son enzimas con características antioxidantes debido a sus propiedades como atrapador de aniones superóxidos, tienen un importante rol en la protección antioxidante de muchas especies reactivas del oxígeno, de ahí su utilización en el diagnóstico y la terapia de diversas enfermedades, así como en la cosmética para la formulación de protectores solares y cremas antiacné.

Fue demostrada por de la Luz Romero-Tejeda, Martínez-Damián, & Rodríguez-Pérez (2015) la importancia que presentan los estudios de estabilidad para predecir las condiciones de almacenamiento

de un producto, ya que existió una disminución de la actividad de la enzima SOD en la planta de salvia (*Salvia officinalis* L.) a los 9 días de permanecer en refrigeración, siendo esta planta utilizada en la industria alimentaria y cosmética.

Durante las últimas décadas se ha enfatizado en el desarrollo de nuevos sistemas de inmovilización que permitan prolongar el tiempo de vida de una sustancia, con el objetivo de mejorar su eficacia. Los sistemas más utilizados para controlar la liberación de los principios activos son los sistemas de microencapsulación y los de secuestro o matriciales.

Para aumentar la actividad de la enzima SOD fueron sintetizadas y caracterizadas por Yang, Jiang, Pan y Zhou (2015), nanopartículas de sílice que contienen magnesio. Además, se utilizaron Nanosferas por Nair, Al-Dhubiab, Shan, Attimarad y Harsha (2017), para aumentar la disponibilidad oral del fármaco Candesartan Cilexetil.

En este trabajo se realizó una formulación dermocosmética, cuyo principio activo fue la Cobre Zinc-Superóxido Dismutasa (CuZn-SOD) inmovilizada en Nanosferas 100, un sistema de partículas del orden de los nanómetros. Se realizó un estudio de estabilidad en vida de anaquel con el objetivo de determinar la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la actividad biológica de la enzima CuZn-SOD inmovilizada en Nanosferas 100.

**Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética**

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

Termómetro digital de vástago largo, intervalo: de - 50 °C a 150 °C (Fisherbrand™).

Frascos de polipropileno, volumen de 30 mL (Thermo Scientific™ Nalgene).

Frascos transparentes de boca ancha estándar con tapón de espuma de polipropileno, volumen de 30 mL (Fisherbrand™).

Frascos ámbar de boca ancha con tapones de polipropileno, volumen de 30 mL (Fisherbrand™).

Inmovilizado de CuZn-SOD purificada de eritrocitos humanos en una suspensión de Nanosferas 100 con un rendimiento en la adsorción del 66%. (Centro de Investigaciones Biomédicas, Cuba).

### 2.2. Equipos

Balanza técnica Yamato.

Balanza analítica Sartorius.

Estufa Fischer.

Centrifuga SIGMA 201 m B-Braun.

Viscosímetro rotatorio Haake modelo V-20.

Refrigerador Haier.

### 2.3. Metodología

Se formularon las cremas siguiendo el siguiente procedimiento: Primeramente, se calentó la fase acuosa hasta alcanzar la temperatura de 70 °C, después se adicionó la fase oleosa con agitación constante

y cuando la temperatura fue menor a 50 °C se adicionó el preservo, y finalmente el principio activo CuZn-SOD inmovilizado en Nanosferas 100 (CuZn-SOD-N100) a temperaturas menores de 37 °C.

Las formulaciones F-1, F-2 y F-3 se obtuvieron con la adición de cera de abeja, ácido esteárico y trietanolamina respectivamente como agentes emulsificantes.

El estudio estabilidad se realizó para las formulaciones a las temperaturas: ambiente (30°C ± 2°C), refrigeración (5°C ± 3°C) y estufa (40± 2°C), de acuerdo con la ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE (ICH Q1A, 2003). Para la temperatura ambiente se analizaron las condiciones de luz y oscuridad, envasándose las formulaciones en frascos transparentes y ámbar.

Fue determinada la actividad biológica de la enzima en los tiempos 0, 30, 60 y 90 días, de acuerdo con el Cronograma de Ensayos de Estabilidad, para verificar la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la actividad de la enzima en las formulaciones cosméticas.

### 2.4. Técnica analítica utilizada

Actividad enzimática de la CuZn-SOD: Se realizó por un método indirecto basado en la capacidad de esta enzima para inhibir la reacción de autoxidación del pirogalol. Es un ensayo cinético que transcurre durante 1 minuto a pH 8.20. Para el cálculo de la actividad se tuvo en cuenta que una unidad de actividad enzimática

Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

(UAE) es capaz de inhibir el 50% de la autoxidación del pirogalol (Marklund, Marklund, 1974).

Para las formulaciones cosméticas, las unidades se expresaron en UT (Unidades Totales): unidades de actividad enzimática de CuZn-SOD-N 100 por gramo de crema (U/g).

A partir de las medias de las UT, se calculó el porcentaje de actividad residual (%A.R):

$$\% A.R = \frac{UT_i}{UT_0} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

% AR: Porcentaje de actividad residual (%).

UT<sub>i</sub>: Actividad enzimática en los tiempos 30, 60 y 90 días.

UT<sub>0</sub>: Actividad enzimática a tiempo cero.

Se graficó el logaritmo del porcentaje de actividad residual contra el tiempo, obteniéndose tres rectas correspondientes a cada formulación cosmética.

### 2.5. Análisis estadístico de los resultados

Con el empleo del análisis de regresión y correlación lineal, a través del

programa “Statistic”, fue calculada la pendiente de la recta que es igual a la constante de inactivación de la enzima (Kinact).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1, se muestran los resultados obtenidos de las velocidades de inactivación para las formulaciones con la CuZn-SOD no inmovilizada. La actividad enzimática disminuyó hasta las 6 horas, presentando la enzima en la formulación F-1 un valor mayor de velocidad de inactivación respecto a las formulaciones F-2 y F-3. La enzima sufrió una inactivación total en las tres formulaciones después de las 6 horas de su conservación. En las cremas formuladas con la enzima inmovilizada se obtuvieron valores de actividad enzimática hasta los 90 días, excepto en la formulación F-1 en la condición de estufa donde existió una pérdida total de la actividad enzimática debido a la alta temperatura de conservación que provocó una desnaturalización de la enzima, resultando en una pérdida de la actividad biológica. Este comportamiento se corrobora con lo obtenido al inmovilizar la SOD con diatomita modificada con quitosano que mejora la estabilidad con la conservación y la estabilidad térmica (Song, Zhang, Song y Liu, 2013).

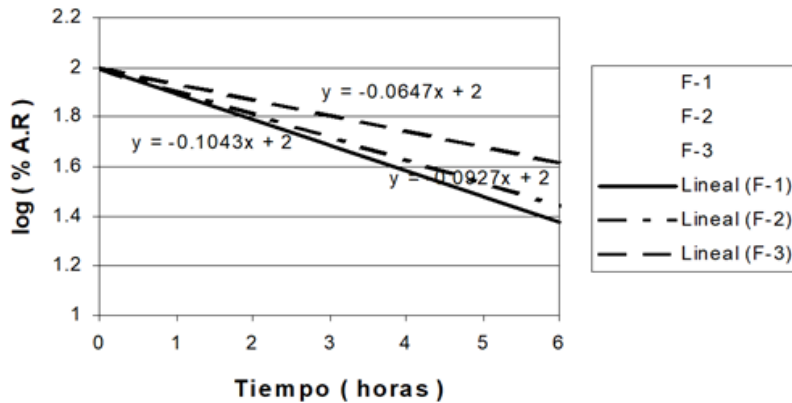


Figura 1. Actividad de la CuZn-SOD en las formulaciones.

La Figura 2, muestra los valores del por ciento de actividad residual en el tiempo, para las formulaciones conservadas en refrigeración. La formulación F-3 presentó el menor valor de  $K_{inact}$ . ( $K_{inact}=0.0008$ ), siendo la F-1 la de mayor  $K_{inact}$  ( $K_{inact}=0.0047$ ), esto refleja que la CuZn-SOD es más inestable en esta

base formulada utilizando cera de abeja como emulsificante, esto puede ser debido a que está compuesta por una variedad de compuestos químicos como peróxidos, hidrocarburos, monoésteres (Borges, 2008), que pueden reaccionar con los compuesto de la formulación causando inestabilidad en esta.

5a. T = 11 °C

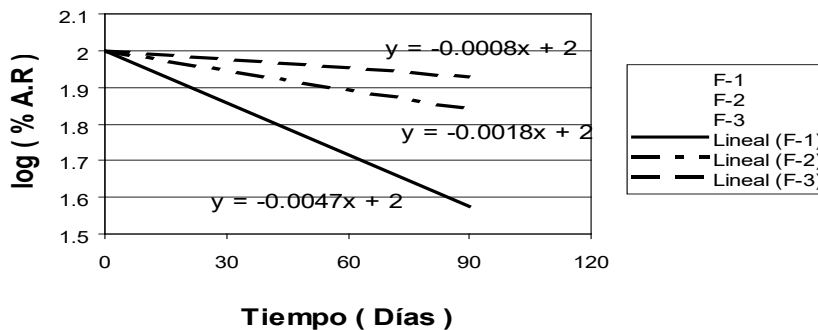


Figura 2. Actividad de la CuZn-SOD-N100 en refrigeración.

Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

De las muestras conservadas a temperatura ambiente, el menor valor de Kinact. lo obtuvo la formulación

F-2 (Kinact. = 0.0023), por lo tanto, la enzima es más estable en esta formulación que en las bases 1 y 3.

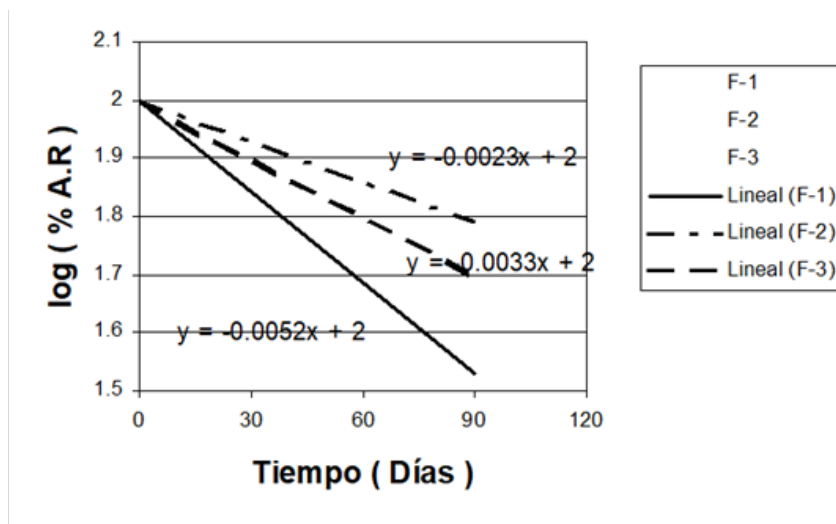


Figura 3. Actividad de la CuZn-SOD-N100 a la temperatura ambiente.

La formulación F-2 presentó como agente emulsificante el ácido esteárico, este ha sido utilizado para formar emulsiones con la trietanolamina logrando obtener un sistema de emulsión óptimo para incorporar al econazol un principio activo liposoluble (Lillini, Pasquali,

Pedemonte, Bregni y Lavaselli, 2016).

De las formulaciones conservadas en la estufa, se encontró la formulación F-3 como la de menor valor de Kinact. (Kinact.= 0.0015), siendo la formulación F-1, la de mayor velocidad de inactivación (Kinact. = 0.0072).

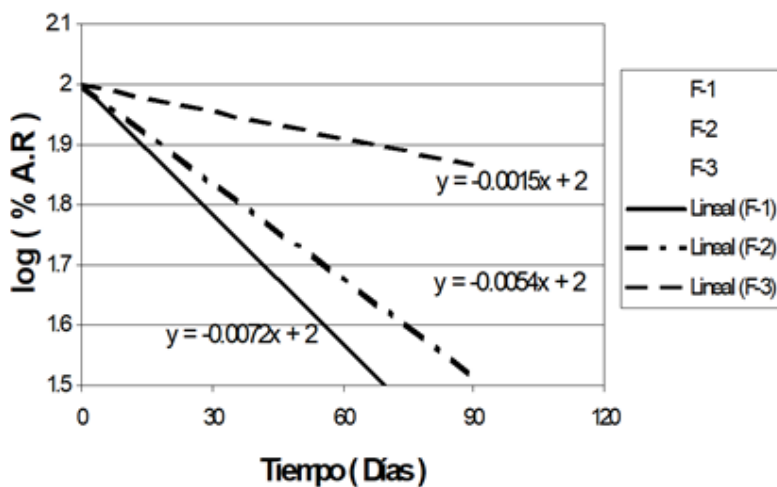


Figura 4. Actividad de la CuZn-SOD-N100 en la estufa

Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation

Este comportamiento pudiera estar relacionado con la afectación del sitio activo de la SOD o con la pérdida de los iones cobres que son necesarios para la acción catalítica. Además, las temperaturas elevadas no son favorables para la enzima inmovilizada, pues provocaría la liberación de la CuZn-SOD de las Nanosferas 100.

En la base 1 fue donde la enzima sufrió mayor degradación debido a la

influencia de la luz, un comportamiento muy similar al encontrado en las tres condiciones de temperatura para esta enzima, indicando que la cera de abeja empleada como agente emulsificante no fue efectiva ya que existió pérdida de la estabilidad de la enzima.

La enzima en la base 2 presentó el menor valor de la constante de inactivación, a pesar de la incidencia de la luz.

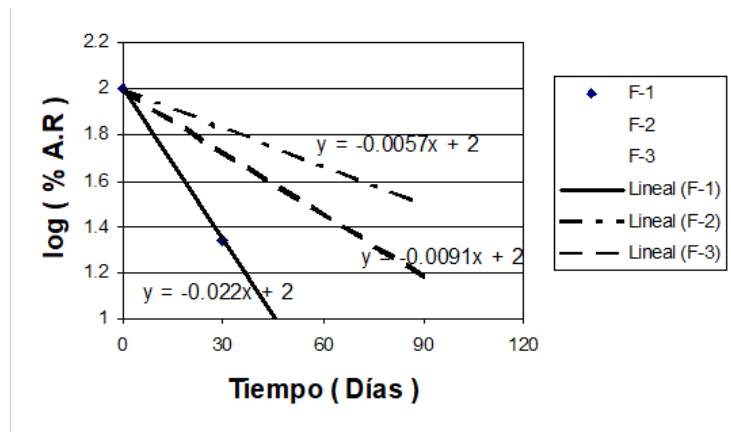


Figura 5. Actividad de la CuZn-SOD-N100 en presencia de la luz

La enzima en la base 3 (Kinact.=0.0005) tuvo el menor valor de velocidad de inactivación en la condición de

oscuridad, lo que indica que la F-.3 debe envasarse en un frasco que proteja de la luz.

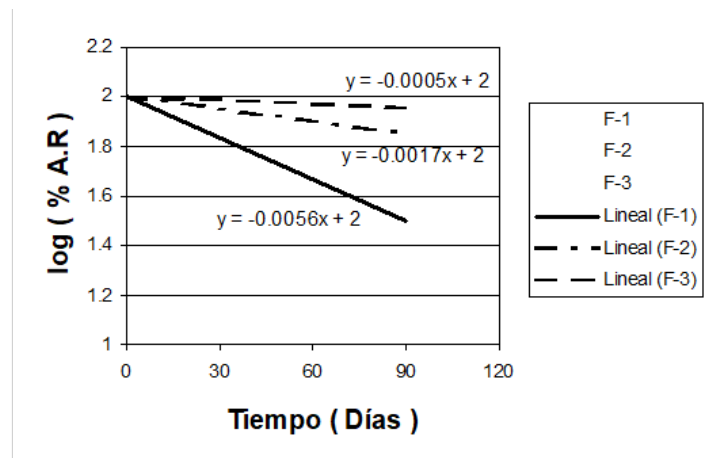


Figura 6. Actividad de la CuZn-SOD-N100 en presencia de la oscuridad

Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation



La presencia de la luz provoca reacciones de fotooxidación generándose especies reactivas de oxígeno, estos pueden reaccionar con los ácidos grasos insaturados (componentes de la fase oleosa de las formulaciones), provocando su oxidación, y afectando el resto de los componentes de la formulación y del inmovilizado de CuZn-SOD.

#### 4. CONCLUSIONES

La CuZn-SOD debe estar inmovilizada en las Nanosferas 100, pues de esta forma mantiene su estabilidad en las formulaciones por más tiempo respecto a la enzima no inmovilizada. La temperatura de almacenamiento influyó sobre la velocidad de inactivación de la CuZn-SOD-N100, siendo la enzima más estable a las temperaturas de refrigeración y estufa en la formulación donde se utilizó trietanolamina, mientras que la enzima formulada con ácido esteárico presentó mayor estabilidad a la fotooxidación.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borges, D. (2006). Cera de abejas. Revista Asociación Cubana de Producción Animal. (Vol. 2): 41-43
- ICH. (2003). Stability Testing of new Drug Substances and Products. ICH Topic Q 1 A (R2). (February).
- Lillini, G., Pasquali, R., Pedemonte, C., Bregni, C. y Lavaselli, S. (2016). Estudio de la estabilidad de emulsiones con estructuras líquido-cristalinas, y su aplicación farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble: Econazol. Rev. Colomb.Quím. Farm, 45(1), 5–20. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v45n1.58011>
- Marklund, S., y Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry, 47(3), 469–474.
- Mosquera Tayupanta, T., Noriega, P., Tapia, W. y H Pérez, S. (2012). Evaluación de la eficacia cosmética de cremas elaboradas con aceites extraídos de especies vegetales amazónicas: *Mauritia flexuosa* (Morete), *Plukenetia volubilis* (Sacha Inchi) Y *Oenocarpus bataua* (Ungurahua). La Granja (Vol. 16). <https://doi.org/10.17163/lgr.n16>
- Nair, A. B., Al-Dhubiab, B. E., Shah, J., Attimarad, M., y Harsha, S. (2017). Poly(Lactic acid-co-glycolic acid) nanospheres improved the oral delivery of Candesartan Cilexetil. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 51(4), 571–579. <https://doi.org/10.5530/ijper.51.4.86>
- Romero-Tejeda, M., Martínez-Damián, M. y Rodríguez-Pérez, J. (2015). Effect of storage temperature on enzyme activity and antioxidant capacity in *Salvia officinalis* L. Shoots. Revista Chapingo Serie Horticultura (Vol. XXI). <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.01.003>
- Song, C., Zhang, Q., L. Song, S. y Liu, X.

**Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética**

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation



(2014). Optimization of superoxide dismutase immobilization carrier and the study on enzymatic properties. WIT Transactions on Ecology and the Environment (Vol. 189). <https://doi.org/10.2495/ICESEP131241>

Yang, M., Jiang, W., Pan, Z. y Zhou, H. (2015). Synthesis, Characterization and SOD-Like Activity of Histidine Immobilized Silica Nanoparticles. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 25(5), 1289–1297. <https://doi.org/10.1007/s10904-015-0239-9>

**Estabilidad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa inmovilizada en nanosferas 100 para una formulación cosmética**

Cu-Zn Superoxide dismutase stability on immobilized nanoparticles as an alternative for a new cosmetic formulation