

MÉTODO PARA DETERMINAR EL FACTOR DE PROTECCIÓN SOLAR *IN VITRO*

SECTOR TÉCNICO

Se reclama un método para la determinación del Factor de Protección Solar, FPS, mediante una técnica *in vitro* que hace uso del ácido hialurónico para refrendar el porcentaje de protección frente a la radiación UV que ofrecen los protectores solares.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El sol es la principal fuente de radiación UV a la cual está expuesta la piel y, dependiendo de la frecuencia de exposición, ocasiona efectos perjudiciales en la salud, como es el eritema cutáneo (quemadura solar), que a largo plazo genera envejecimiento prematuro, dermatitis y, en los casos más severos, conduce a la formación de cáncer de la piel.

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano que posee múltiples funciones tales como: la regulación de la temperatura corporal, la protección al organismo de los agentes externos, como por ejemplo la radiación ultravioleta (UV), entre otras. Este órgano está constituido por la superposición de tres tejidos de estructura diferente con funciones muy específicas. Desde el exterior hacia el interior se encuentran: la epidermis o epitelio; la dermis o tejido conjuntivo, constituido principalmente por fibroblastos que producen proteínas tales como el colágeno y el ácido hialurónico; y la hipodermis: tejido conjuntivo adiposo, que constituye el tejido subcutáneo (Bailón y Chiadmi, 2007).

Dentro de una amplia lista de constituyentes de la piel que se han estudiado, y que reaccionan frente a la radiación UV, se destaca el ácido hialurónico (AH), el cual muestra una alta sensibilidad a la radiación UVA-UVB dependiente del tiempo de exposición, y su degradación se ha asociado al envejecimiento prematuro de la piel (Naylor, 2011).

La investigación desarrollada llevó a seleccionar intencionalmente además del ácido hialurónico, otros componentes sensibles a la radiación ultravioleta como lo son colesterol, colágeno y elastina, en los cuales, los principales efectos cuantificados se relacionan con fenómenos de degradación de algunos grupos cromóforos de sus estructuras y pérdida del entrecruzamiento o compactación de sus fibras como una consecuencia del tiempo e intensidad de la exposición a la radiación UV. Así entonces, se ha logrado establecer que cada uno de estos constituyentes de la piel son afectados por la radiación UV de manera acumulativa, cuantificable y cuya afectación está directamente relacionada con los efectos deletéreos sobre la salud.

Sobre el colesterol por ejemplo, importante en la conformación de la barrera responsable de la permeabilidad de la piel y el intercambio de agua, se logró establecer que la radiación ocasiona una degradación acumulativa evidenciada por la disminución en su concentración en función del tiempo de exposición, cuantificada mediante espectrofotometría y cromatografía de gases acoplada a masas.

En cuanto al colágeno, estructura proteica ampliamente distribuida en la piel que brinda integridad mecánica, se logró establecer mediante cuantificación por hidroxiprolina que es altamente sensible a la radiación UV produciendo degradación y, a su vez, ruptura de fibras evidenciada histológicamente en tejido *ex vivo*. Del mismo modo la elastina, otra proteína presente en la piel cuya función estructural es dar elasticidad, se encuentra entrecruzada con las fibras de colágeno y también es susceptible a la

radiación UV presentando ruptura en su estructura, observada histológicamente en tejido *ex vivo* y a través de la degradación de dispersiones acuosas cuantificada mediante espectrofotometría.

Por otro lado, el desarrollo de productos efectivos que eviten el daño causado por la sobreexposición a los rayos solares se ha convertido en un desafío constante en los últimos tiempos; éstos protectores solares consisten en formulaciones a base de compuestos, bien sea orgánicos o inorgánicos, que actúan como filtros y que mediante diversos mecanismos como absorción, reflexión o dispersión de la luz, evitan que la radiación ultravioleta ocasione los efectos deletéreos sobre las estructuras de la piel (Schalka y Silva, 2011).

Hasta la fecha, la única metodología aceptada por las agencias regulatorias mundiales para la determinación del Factor de Protección Solar FPS, es el ensayo "*in vivo*" mediante estudios clínicos con voluntarios sanos en los que se evalúa el grado de protección que brinda el producto frente al eritema causado por los rayos ultravioleta que llegan directamente a la piel. Esta metodología ha venido siendo mejorada en cuanto al cálculo del FPS, como ha sido reportada en las patentes US5148023, JP2001091355 y TW200819728.

Adicionalmente, a nivel mundial ha existido una gran preocupación, no sólo por el aumento de cáncer de piel a causa de la radiación solar, sino por los diversos cuestionamientos que se han suscitado frente al hecho de la utilización de voluntarios sanos expuestos a radiación para determinar la eficacia de los protectores solares. En este sentido, es importante el desarrollo de metodologías alternativas que permitan un acercamiento al nivel de protección que ofrecen los productos con este propósito y así facilitar el desarrollo de los mismos y disminuir el riesgo asociado a la exposición de voluntarios.

Alternativamente, se han desarrollado metodologías "*in vitro*" las cuales se basan en dos enfoques: uno de ellos involucra la medida de absorción o transmisión de radiación UV a través de capas del producto que brinda la protección, el cual se aplica sobre placas de cuarzo o biomembranas y, en el otro, se evalúan las características de absorción de los agentes protectores solares, determinados mediante el análisis espectrofotométrico de soluciones diluidas (Dutra *et al.*, 2004).

Las metodologías "*in vitro*" que han sido desarrolladas (WO2008044596, TW200925580, WO2012125292, WO2013188320 y US2016025481, ISO 24444:2010) para la evaluación del FPS, emplean sustratos de polimetilmetacrilato (sigla en inglés PMMA), el cual no es susceptible a la radiación UV, por lo cual el efecto es evaluado sobre el producto de protección que contiene filtros que reaccionan a la radiación.

Por las razones anteriormente expuestas, se propone una metodología alternativa "*in vitro*" que evalúa el efecto de la radiación UV sobre materiales constituyentes de la piel como el ácido hialurónico y su variación cuando interfiere en el proceso de radiación una muestra de protector solar (producto a evaluar). El AH es posible emplearlo tanto en forma de película delgada (estado sólido) como en dispersión (estado líquido).

La metodología se propone para evaluar la propiedad de fotoprotección que ofrece un producto o ingrediente en el diseño y desarrollo de productos de protección solar, contribuyendo así al avance tecnológico.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra el montaje del sistema de evaluación para película delgada que consiste en: un portamuestras (PM) que permite colocar una película delgada de AH, una película de soporte para la muestra en polimetilmetacrilato (PMMA), material inerte a la radiación.

La **Figura 2** presenta el montaje del sistema de evaluación para dispersión acuosa que consiste en: un portamuestras (PM) para la dispersión de AH el cual va dentro de una celda de cuarzo (C), y una de sus caras es utilizada como soporte para aplicar homogéneamente la muestra a evaluar.

La **Figura 3** detalla el sistema óptico para medir el efecto de la radiación en parámetros de transmitancia y que se dispone usando una fuente de voltaje (1) que permite encender la lámpara o fuente de radiación UV (2). La luz proveniente de la lámpara (2) se hace pasar por el chopper o estroboscopio (3) el cual pulsa la luz a una determinada frecuencia antes de su llegada al monocromador (4) y a su salida es controlada por el amplificador Lock-in (9). En el monocromador (4), la luz se descompone en sus longitudes de onda fundamentales y una luz monocromática pasa a través de una rendija (5) para finalmente incidir perpendicularmente sobre la superficie del sistema. El conjunto muestra - ácido hialurónico es colocado en el portamuestras (6), de manera que la luz transmitida por éste es recogida en el detector (7). La señal de salida (después del detector) es amplificada en el preamplificador (8) y analizada por el amplificador Lock-in (9).

La **Figura 4** muestra la gráfica del modelo de correlación entre el porcentaje (%) de protección al AH y su correspondencia en FPS.

La **Figura 5** muestra el porcentaje de protección frente a la radiación UV para diferentes productos del mercado etiquetados con FPS 50.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En esta invención se han realizado pruebas sobre cuatro materiales constituyentes de la piel que son susceptibles a daño por la radiación UV, a saber: *colesterol, colágeno, elastina y ácido hialurónico (AH)*. Éste último es un glicosaminoglicano de origen natural que consiste en un polímero lineal de peso molecular de 50.000-13.000.000 daltons. Es un polisacárido hecho a partir de unidades repetidas de ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina, unidas por enlaces β 1-3 y β 1-4 alternantes. El AH utilizado en esta invención y al que llamaremos sustrato, fue adquirido de fuente comercial y corresponde a un polvo fino, blanco y de olor característico con peso molecular dentro del rango anteriormente descrito.

Gracias a las características fisicoquímicas y de formación de película del AH fue posible obtener el sustrato en dos estados a la misma concentración: líquido como dispersión acuosa traslúcida y ligeramente viscosa, y sólido como película delgada transparente. Ambos estados son susceptibles a la radiación.

Para la elaboración del sustrato en estado líquido, se prepara una dispersión acuosa con una concentración inferior al 1% p/v de AH (la cual está relacionada con la cantidad de AH presente en la piel, la respuesta frente a la radiación y el manejo del material), a una temperatura entre 17 y 21°C y agitación en un rango de 1200 a 1500 rpm durante 1 hora. Para el estado sólido, con la preparación descrita se realiza un vertimiento sobre un molde de poliestireno con dimensiones de 1.6 × 1.1 cm y mediante el método casting, dejando secar durante 3 horas a una temperatura entre 45 - 55 °C. Posteriormente, las películas se retiran de los moldes y se almacenan a una temperatura entre 17 y 21°C y una humedad relativa entre 18 y 22% hasta su posterior uso.

El montaje para la evaluación del sustrato en estado sólido (Figura 1) consiste en una película delgada de AH en la base del portamuestras, sobre ésta va una película delgada de soporte cuyo material, polimetilmetacrilato (PMMA), es inerte a la radiación; sobre ésta última se aplica homogéneamente el producto que va a servir de protector para el AH frente a la radiación UV.

El segundo montaje corresponde a la evaluación del sustrato en estado líquido (Figura 2), que consiste en utilizar directamente la dispersión de AH incorporado dentro de una celda de cuarzo estándar, material que es transparente a la radiación UV y por lo tanto es utilizado como soporte para aplicar homogéneamente el producto que va a servir de protector para el AH.

Ambos montajes permiten ser expuestos a condiciones de radiación UV controladas en cuanto a tiempo y tipo de radiación, ya que durante la investigación se logró definir que la degradación del AH es dependiente de la longitud de onda a la cual se expone y del tiempo de exposición. Una vez terminada la exposición de los montajes a la radiación UV, se evalúa el efecto de la radiación sobre el AH mediante la verificación de su transmitancia en el rango UV del espectro electromagnético. Para esto, se puede utilizar tanto la película delgada como la dispersión acuosa, teniendo en cuenta que se comportan de igual manera frente a la radiación y que el portamuestras del aparato permite la utilización de uno u otro indistintamente.

Las medidas de transmitancia del AH se realizan utilizando el sistema óptico que se muestra en la **Figura 3**. Se utiliza incidencia normal del haz de luz para el rango de longitudes de onda entre los 200 - 400 nm.

Una fuente de voltaje (1) permite encender la lámpara o fuente de radiación UV (2). La luz proveniente de la lámpara (2) llega al monocromador (4). Antes de que la luz llegue al monocromador (4) ésta se hace pasar por el chopper o estroboscopio (3), el cual pulsa la luz a una determinada frecuencia y es controlada por el amplificador Lock-in (9). En el monocromador (4), la luz se descompone en sus longitudes de onda fundamentales y una luz monocromática pasa a través de una rendija (5), para finalmente incidir perpendicularmente sobre la superficie de la película o la celda respectivamente. El montaje es colocado en el portamuestras (6), de manera que la luz transmitida por éste sea recogida en el detector (7). La señal de salida (después de detector) es amplificada en el preamplificador (8) y analizada por el amplificador Lock-in (9).

El portamuestras (6) es intercambiable y por esta razón permite medir la intensidad de la luz transmitida para ambos montajes (película delgada y dispersión).

La metodología está enmarcada en la determinación de un valor estimado de FPS a través de una correlación matemática entre el valor FPS "in vivo" de cada producto y un porcentaje de protección al AH ofrecido por dichos productos. El método incluye los siguientes aspectos:

- 1) Caracterización de propiedades físicas tanto del soporte de PMMA como del AH (en sus dos estados) en términos de espesor, rugosidad, densidad, estabilidad frente a medios oleosos y acuosos.
- 2) Definición de las características de ensayo: Longitud de onda de exposición y tiempo de exposición. Estandarización del método de aplicación de las formulaciones de referencia y prueba sobre el montaje soporte - sustrato teniendo en cuenta cantidad por unidad de área, forma de aplicación, presión de aplicación, tiempo de secado, tiempo de radiación, periodo entre el momento de la exposición a la radiación y la medida espectrofotométrica.

3) Evaluación del efecto de la radiación sobre el AH en términos de porcentaje de degradación a las condiciones descritas con el fin de obtener una referencia del grado máximo de degradación.

4) Utilización de los productos a evaluar y cálculo en términos de porcentaje de protección respecto a la referencia obtenida, para determinar la capacidad que tienen éstos protectores solares de evitar la degradación del AH, es decir cuánto impiden la degradación a partir del máximo alcanzado.

Bajo las condiciones descritas, el máximo de degradación que alcanza el AH sin ningún tipo de protección es superior al 30%, valor utilizado como referencia para el cálculo del porcentaje de protección que ofrecen los productos de protección solar.

Estandarización y validación de la metodología

Para darle validez a la metodología propuesta, previamente se llevaron a cabo series de ensayos que permitieron evidenciar el comportamiento del AH frente a la radiación, dependiendo de la concentración de filtros solares y estandarización de las condiciones de ensayo en cuanto a tiempo de exposición y aplicación del producto. Se utilizaron dos filtros estándares reportados por la literatura por separado (uno de tipo barrera física y otro químico), vehiculizados en un sistema de emulsión tipo w/o a concentraciones progresivas para evaluar la respuesta del método a las condiciones de evaluación. Como filtro químico se utilizó el Homosalato en concentraciones de 2 - 20 % y como filtro físico se utilizó dióxido de Titanio en concentraciones de 2 - 15 %. Se estableció un modelo de correlación polinómico de orden 3 de valores de protección para el AH en función de la concentración del filtro correspondiente para ambos casos. Así mismo, se encontró reproducibilidad en las determinaciones y precisión adecuada con coeficientes de variación inferiores al 3%.

Una vez establecida la respuesta del método a las condiciones de estudio, se evaluaron diferentes productos de protección solar comercializados en el ámbito nacional y cuyo rotulado reportaba valores de FPS entre 15 y 100. Luego de las determinaciones y mediante un análisis estadístico, se estableció el modelo de correlación para el porcentaje de protección del AH en función del FPS etiquetado, encontrando que responde a una función polinómica de orden 3 con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9$.

Una de las principales determinaciones para la validación de la metodología, fue la evaluación de la repetibilidad y la precisión intermedia, la cual fue establecida para productos con FPS bajo, medio y alto con mediciones intradía e interdía, obteniéndose coeficientes de variación inferiores al 4.5%.

Finalmente, se establece un modelo de correlación entre los niveles de protección alcanzados para el AH y los valores de FPS a los cuales corresponde dicha protección. Esto confirma, que la metodología propuesta es una herramienta útil para la estimación alternativa de FPS a partir de la evaluación del efecto de la radiación sobre la degradación del AH como sustrato de estudio.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN PRÁCTICA

Una vez establecido el modelo de correlación entre el porcentaje de protección del AH y su correspondencia en FPS, se llevó a cabo la determinación del FPS estimado para 7 productos del mercado etiquetados con FPS 50. Para el ensayo se utilizó la dispersión acuosa de AH al 0,7% p/v y por consiguiente la aplicación homogénea de los productos se realizó sobre la superficie de cuarzo de una celda estándar, lo correspondiente a $1\text{mg}/\text{cm}^2$ siguiendo lo establecido por la norma ISO 24444:2010 "determinación in vivo del factor de protección solar (FPS)". Una vez secado el producto, se realizó la

exposición a la radiación UV controlando la longitud de onda y el tiempo de exposición. La evaluación se realizó por triplicado con un coeficiente de variación inferior al 3,5%. Una vez obtenidos los datos se procedió a realizar el cálculo del porcentaje de degradación del AH en cada caso y frente a la degradación máxima (sin ningún producto aplicado) se calculó el porcentaje de protección encontrando que se alcanzaron valores entre el 60 y 75% como se observa en la Figura 5. Al utilizar el modelo matemático desarrollado en la metodología se encontró que el FPS estimado corresponde a valores superiores a 50, resultados aceptables y concordantes con lo esperado para la metodología propuesta.