



Bioq. LARISA POZO

DESARROLLO DE FORMULACIONES TÓPICAS DE EXTRACTOS NATURALES PARA TRATAMIENTOS DE AFECCIONES EN PIEL DE ORIGEN INMUNO-INFLAMATORIO

Bs As | JUNIO | 2024

Directoras: Dra. María Victoria Defain Tesoriero y Dra Ana Paula Perez



INTI

Instituto Nacional
de Tecnología Industrial



Instituto de
Calidad Industrial
INCALIN_UNSAM



**Ministerio
de Economía**
República Argentina

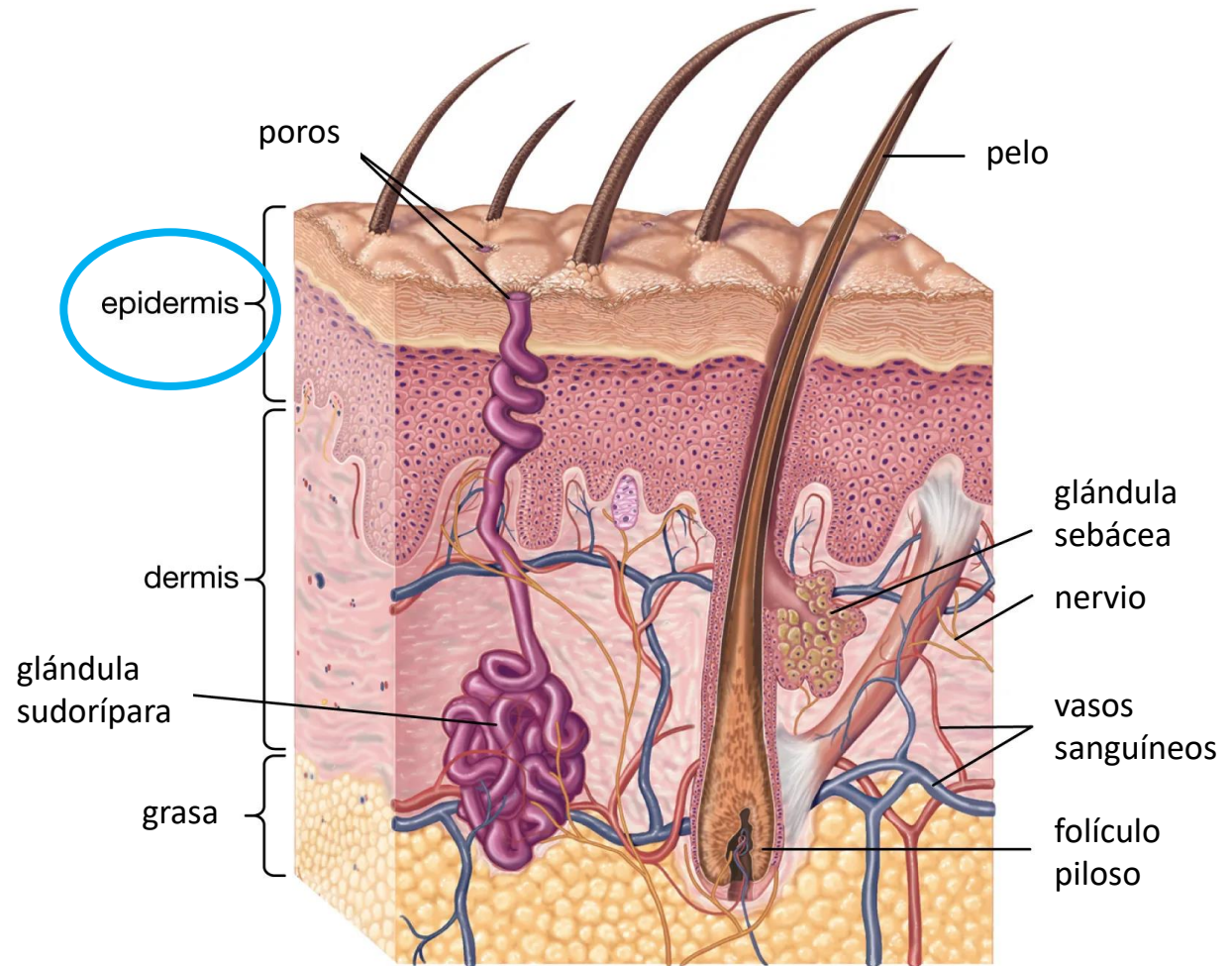
**Secretaría de Industria
y Desarrollo Productivo**

Índice

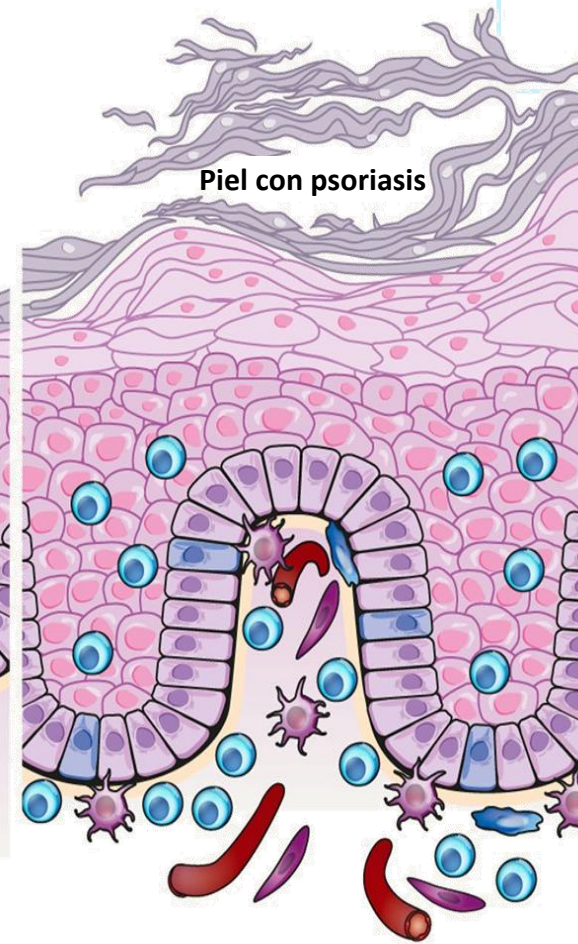
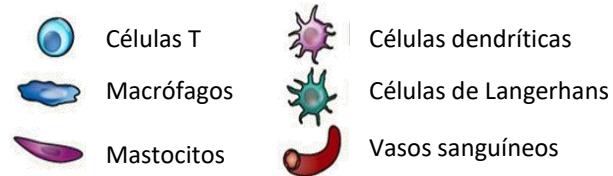
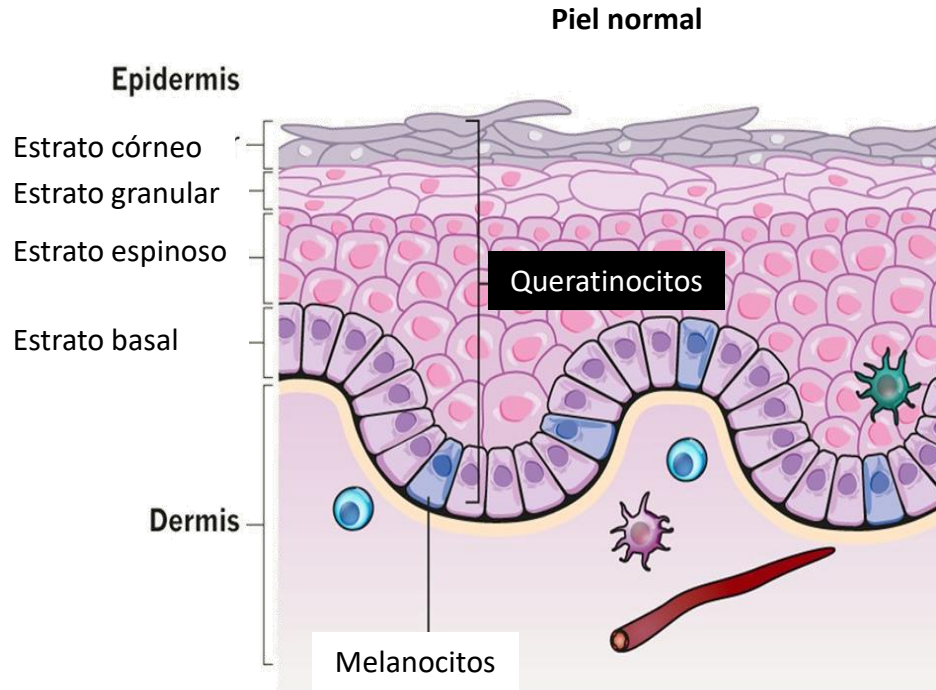
- Introducción
 - Histopatología de la piel con psoriasis
 - El Sistema Endocannabinoide en Piel
 - Los Fito-cannabinoides
 - Nanopartículas Lipídicas Nanoestructuradas
- Objetivo
- Metodologías y Resultados
- Hitos/Objetivos alcanzados
- Acciones a futuro
- Logros
- Bibliografía



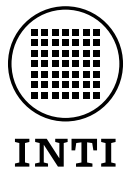
Piel: Epidermis Normal



Histología

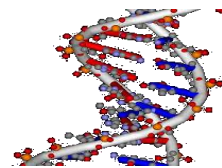


Adaptado de Crow, J. 2012

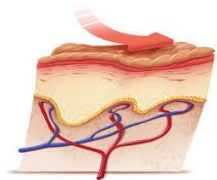


Instituto Nacional
de Tecnología Industrial

Predisposición genética



Algún agente disparador



Hiperproliferación de los
queratinocitos

Diferenciación
tardía

Parakeratosis
Acantosis

Infiltrado Inflamatorio

Th1 (CD4)

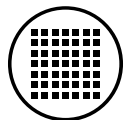
Th17

IL-17A, IL-17F,
IL-22, IL-21,
TNF α

INF γ
TNF α
IL-23
IL-12

Epidermis
Dermis

DC- MO-T-Neu
T



INTI

Instituto Nacional
de Tecnología Industrial



- Respuesta Inmune exacerbada
- Hiper-proliferación de queratinocitos
- Aumento en la vascularización



Perfil Th1/Th2

Disminución de la expresión de PPAR γ

Hay $\uparrow$ en la expresión de K6/16



Psoriasis

Tratamientos

Tópicos



Corticoides



Immuo-moduladores

COSTO

Teratogenia, neoplasias malignas y hepatotoxicidad; mientras que las biomoléculas pueden generar reactivación de infecciones preexistentes, como hepatitis B

COMPLEJO

COSTO

Aproximadamente el 40% de los pacientes con psoriasis requiere fototerapia o terapias sistémicas



La fototerapia

Las terapias sistémicas

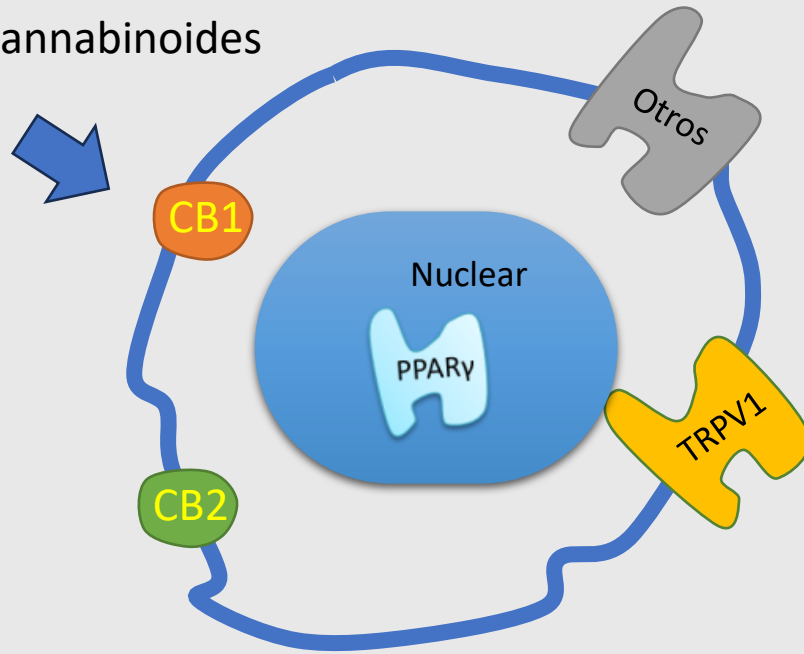


→ Biológicas

→ Pequeñas moléculas

Immunomoduladores

Cannabinoides



Sistema Endocannabinoide

EN PIEL

Namazi, 2005; Nagarkatti et al, 2009, Roelandt et al, 2012; Toht et al, 2011;
Maccarone et al, 2003; Cassanova et al, 2003

Queratinocitos
Melanocitos

- ↑ Diferenciación
- ↓ Proliferación

Cél. Inmunes
Inmunomodulación

- Proapoptótico
- Modula liberación de citoquinas
- Inducción rta T-reguladora
- ↓ la pres de Ag

Cél. sensitivas

- Picazón
- Dolor

Cél. Vasos Capilares

- ↓ vascularización
- ↓ angiogénesis

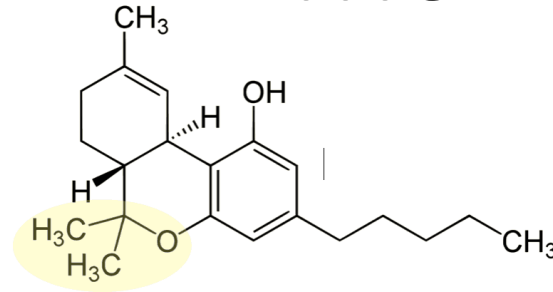


Fito- cannabinoides

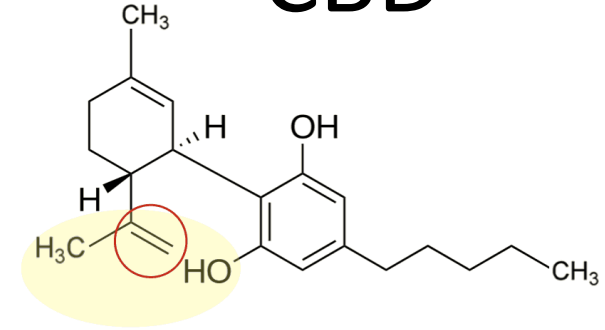
Cannabis sativa



THC



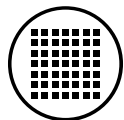
CBD



TetraHidroCannabinol y CannaBiDiol

Moléculas liposolubles

Sensibles a la degradación por luz y a la oxidación



Instituto Nacional
de Tecnología Industrial

INTI

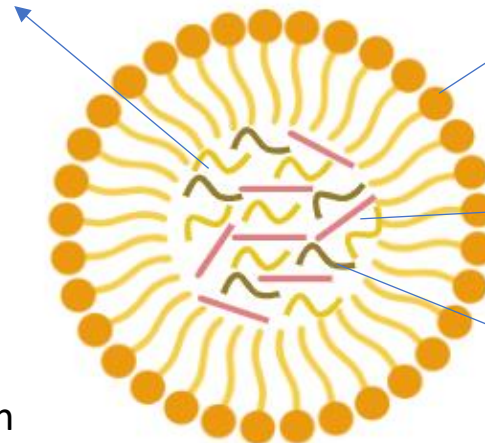


Nanopartícula Lipídica Nanoestructurada

- Los fitocannabinoides se disuelven en los lípidos.
- Su estructura los protege de la degradación.
- Su tamaño favorece su penetración.
- La combinación LL-LS estabiliza la formulación evitando la expulsión de los principios activos.

Principio Activo

Tensioactivo



Lípido Sólido

Lípido Líquido



Instituto Nacional
de Tecnología Industrial

INTI



Objetivo

Desarrollar nanopartículas lipídicas nanoestructuradas que preserven y protejan los fitocannabinoides incorporados en su estructura.



Objetivos específicos alcanzados a la fecha

01.

Obtención de extractos etanólicos

- Extracción
- Secado
- Descarboxilación

02.

Caracterización de los extractos

- TLC
- GC-MS

03.

Ensayos de pre-formulación

- Compatibilidad Lípidos
- Selección de tensioactivos

04.

Desarrollo de las NLN

- Formulación
- Caracterización: Tamaño de partícula y Estabilidad



Obtención del extracto

Flores secas



Extracción etanólica

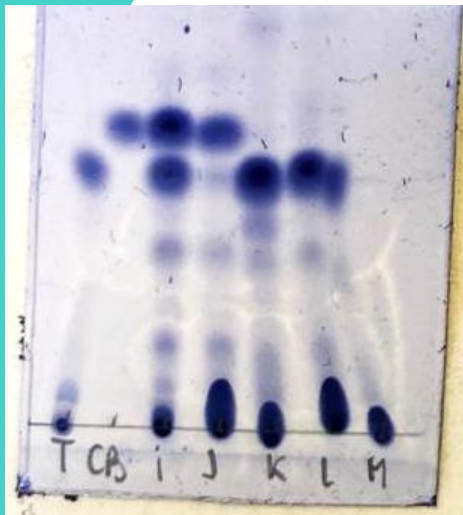


Evaporación a 100° C

Descarboxilación



Caracterización de extracto



TLC con revelado de Mo

Calle T: Estándar de THC

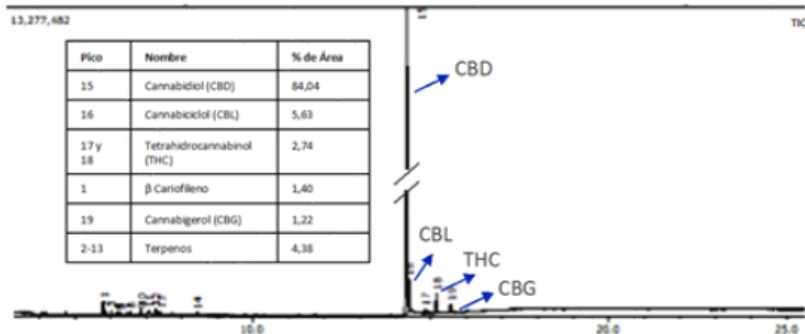
Calle CB: Estándar de CBD

Calle I: Extracto quimiotipo II (mezcla de THC y CBD)

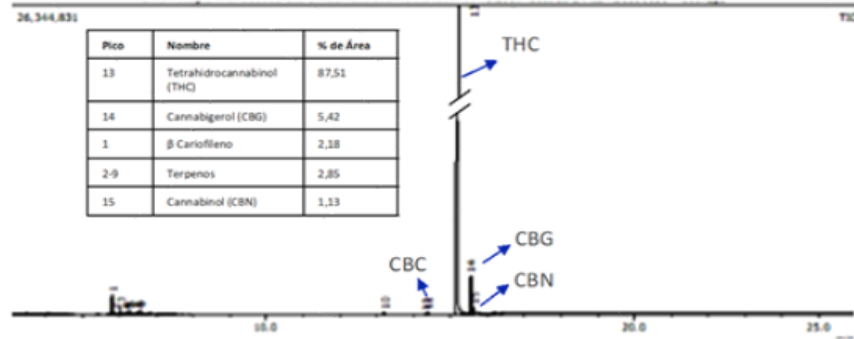
Calle J: Extracto quimiotipo III (CBD)

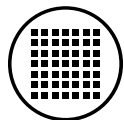
Calle K, L, M: Extracto quimiotipo I (THC)

Análisis por GC-MS de extracto con alto contenido en CBD



Análisis por GC-MS de extracto con alto contenido en THC



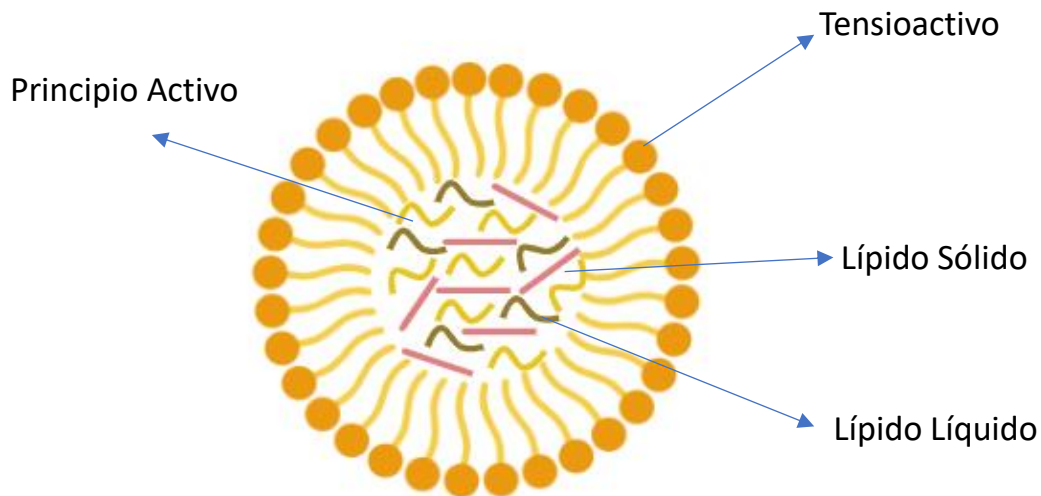


Instituto Nacional
de Tecnología Industrial

INTI



Nanopartícula Lipídica Nanoestructurada





- Compatibilidad Ext-LS

A MENOR CANTIDAD DE LS AGREGADO,
MAYOR COMPATIBILIDAD CON EL
EXTRACTO

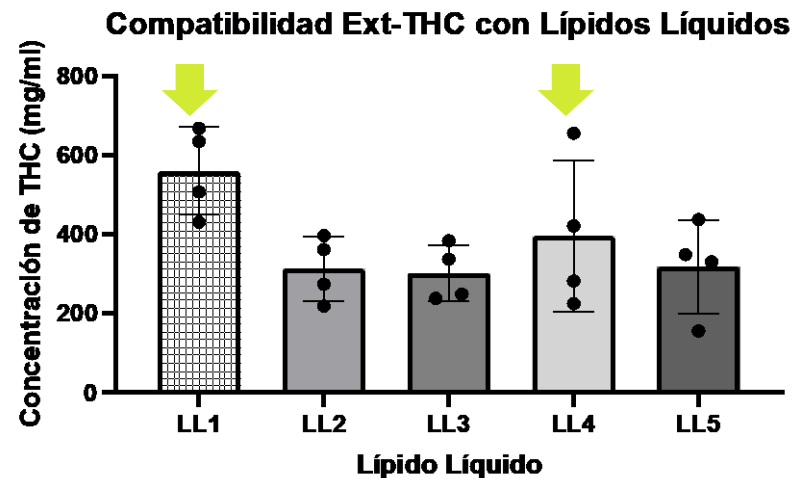
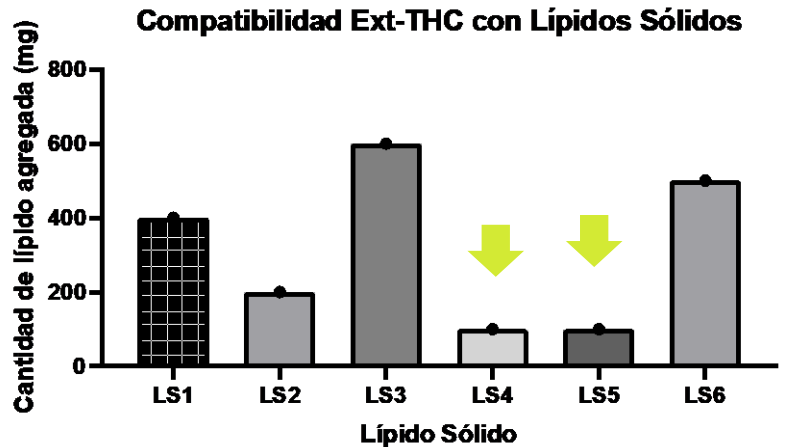
- Compatibilidad Ext-LL

A MAYOR CONCENTRACIÓN DE
EXTRACTO, MAYOR COMPATIBILIDAD
CON EL LL

Ensayos de preformulación



THC



- Compatibilidad Ext-LS

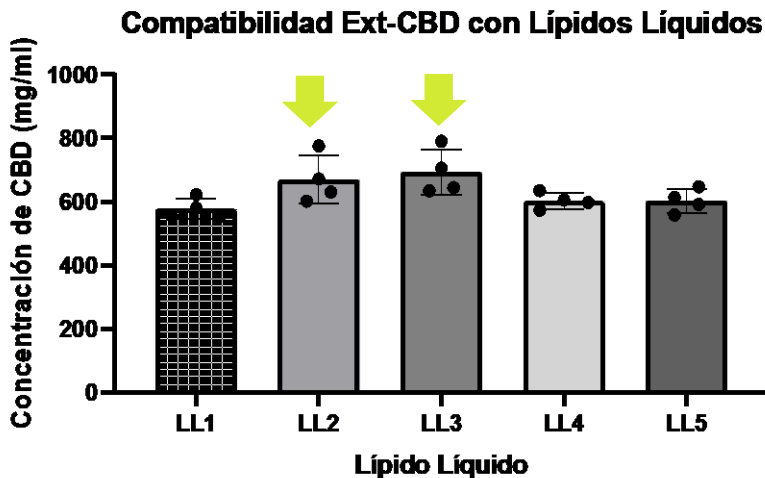
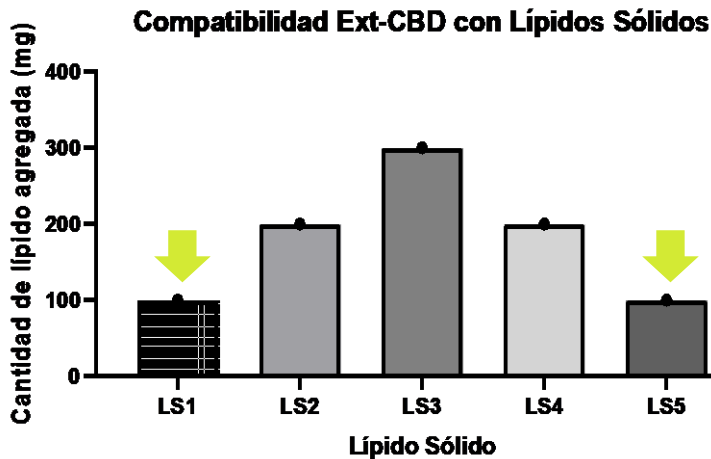
A MENOR CANTIDAD DE LS AGREGADO,
MAYOR COMPATIBILIDAD CON EL
EXTRACTO

- Compatibilidad Ext-LL

A MAYOR CONCENTRACIÓN DE
EXTRACTO, MAYOR COMPATIBILIDAD
CON EL LL

Ensayos de preformulación

CBD



Formulación NLN-THC

$$\text{HLBr } A \times \%A + \text{HLBr } B \times \%B = \text{HLBr } (A+B)$$

HLBrA: HLBr del lípido A

HLBrB: HLBr del lípido B

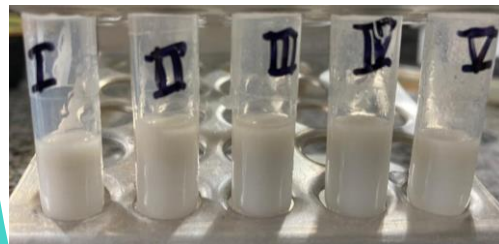
%A: porcentaje relativo en peso de lípido A en la mezcla A+B

%B: porcentaje relativo en peso de lípido B en la mezcla A+B

HLBr(A+B): HLBr de la mezcla A+B

Teórico : 14,2

Teórica



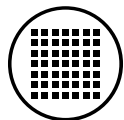
3 ciclos de

[Congelado a -15°C (1 h)
Baño a 60°C (15 min)
Centrifugación a 2000 g (20 min)

Empírica



I = 15,7
II = 15,2
III = 14,7
IV = 14,2
V = 13,7

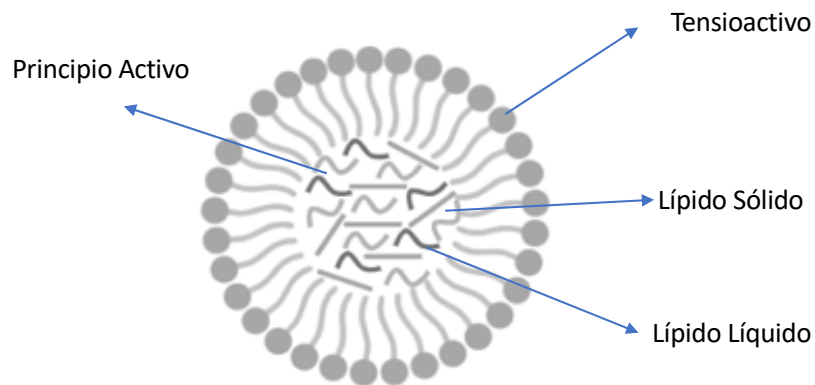


Instituto Nacional
de Tecnología Industrial

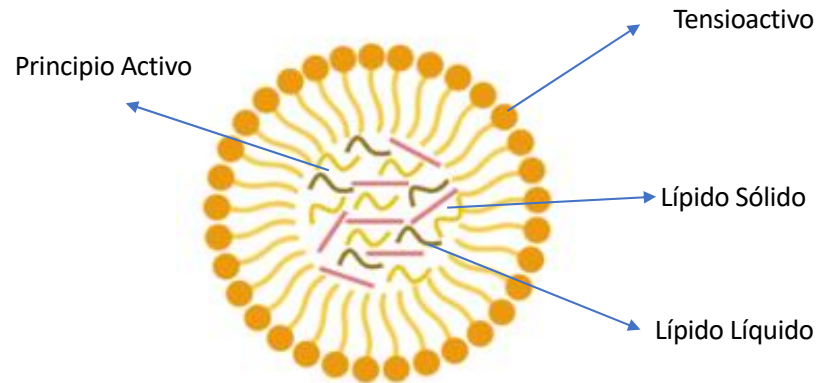
INTI



Nanopartícula Lipídica Nanoestructurada



NLN₁-CBD



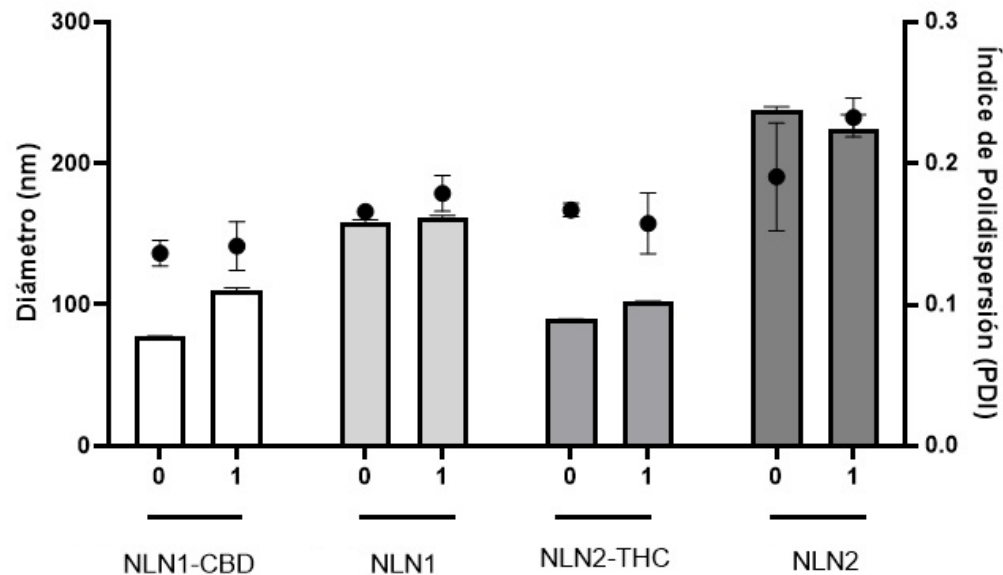
NLN₂-THC

Caracterización de las NLN



Nano Z Sizer, ZEN3600

Diámetro e Índice de Polidispersión



Potencial Z (mV)

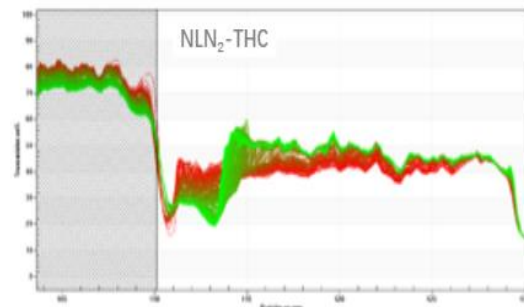
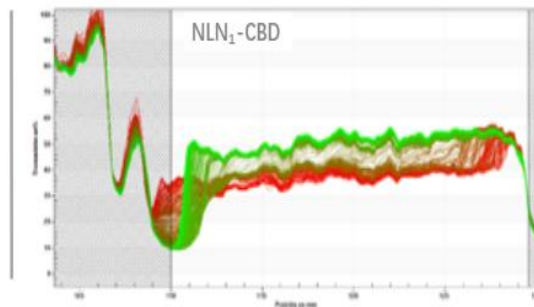
NLN1-CBD	NLN1	NLN2-THC	NLN2
+41,4 ± 2,35	+36,67 ± 0,35	-27,87 ± 2,22	-23,37 ± 1,40

Caracterización de las NLN

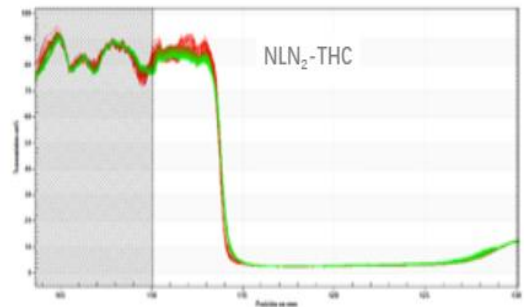
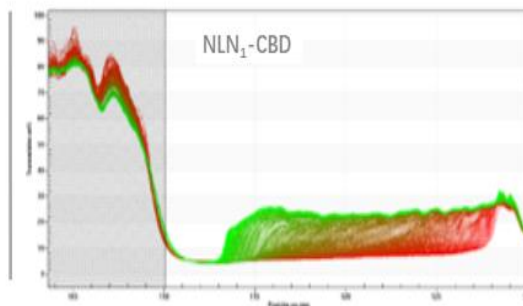


LUMiSizer®

Mes = 0



Mes = 1





Objetivos Alcanzados

- Se estandarizó un método de extracción con el cual se obtuvieron todos los extractos utilizados.
- Se identificaron lípidos y tensioactivos con afinidad por THC y CBD.
- Se lograron obtener dos formulaciones de nanopartículas lipídicas nanoestructuradas con 10% de extracto.
- Las nanopartículas lipídicas nanoestructuradas fueron caracterizadas en tamaño y potencial Z.
- Se determinó la estabilidad física de las nanopartículas lipídicas nanoestructuradas mediante el ensayo de estabilidad acelerada.



39

V Jornadas de Jóvenes Bionanocientíficos (JoBloN)

3 de noviembre 2023

"Cero + Infinito" FCEN - Ciudad Universitaria - CABA



Desarrollo y caracterización de nanopartículas lipídicas de extractos de *Cannabis sativa*

Larisa Pozo¹, A. Paula Perez², Iliana V. Lobatto³ y M. Victoria Defain Tesoriero¹

Nanopartículas lipídicas conteniendo extractos de *Cannabis sativa*: desarrollo y caracterización

¹ Larisa Pozo, ² Cecilia Alberti, ² Iliana Valeria Lobatto, ³ Diego Nutter, ⁴ Eric Turiensky,

⁵ Ana Paula Pérez y ¹ María Victoria Defain Tesoriero. lpozo@inti.gob.ar

¹ Departamento de Tecnologías en Nuevas Formulaciones, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). ² Departamento de Desarrollo Analítico y Control de Proceso, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI). ³ Asociación Civil cbg0000. ⁴ G.E.T. Cannabis FAUBA. ⁵ Centro de Investigación y Desarrollo en Nanomedicinas (CIDeN). Universidad Nacional de Quilmes.



**3er CONGRESO
ARGENTINO DE
CANNABIS Y SALUD**



**OT Para desarrollo
de fórmula
cosmética
aprovechamiento de
subproductos.**

Bibliografía



- Crow, J. Psoriasis uncovered. *Nature* 492, S50–S51 (2012). <https://doi.org/10.1038/492S50a>
- Desmet E, Ramadhas A, Lambert J, Van Gele M. In vitro psoriasis models with focus on reconstructed skin models as promising tools in psoriasis research. *Exp Biol Med* (Maywood). 2017 Jun;242(11):1158–1169. doi: 10.1177/1535370217710637. PMID: 28585891; PMCID: PMC5478008.
- Namazi (2005) Namazi MR. Cannabinoids, loratadine and allopurinol as novel additions to the antipsoriatic ammunition. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2005;19:319–322. doi: 10.1111/j.1468-3083.2004.01184.x
- Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hegde VL, Nagarkatti M. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem*. 2009 Oct;1(7):1333–49. doi: 10.4155/fmc.09.93. PMID: 20191092; PMCID: PMC2828614.
- De Vita D, Madia VN, Tudino V, et al. Comparison of different methods for the extraction of cannabinoids from cannabis. *Nat Prod Res*. 2020;34(20):2952–2958. doi:10.1080/14786419.2019.1601194
- Roelandt, T., Heughebaert, C., Bredif, S., Giddelo, C., Baudouin, C., Msika, P., Roseeuw, D., Uchida, Y., Elias, P.M. and Hachem, J.-P. (2012), Cannabinoid receptors 1 and 2 oppositely regulate epidermal permeability barrier status and differentiation. *Exp Dermatol*, 21: 688–693. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01561.x>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924194>
- Balázs I. Tóth, Nóra Dobrosi, Angéla Dajnok, Gabriella Czifra, Attila Oláh, Attila G. Szöllösi, István Juhász, Koji Sugawara, Ralf Paus, Tamás Bíró, Endocannabinoids Modulate Human Epidermal Keratinocyte Proliferation and Survival via the Sequential Engagement of Cannabinoid Receptor-1 and Transient Receptor Potential Vanilloid-1, *Journal of Investigative Dermatology*, Volume 131, Issue 5, 2011, Pages 1095–1104, ISSN 0022-202X, <https://doi.org/10.1038/jid.2010.421>.
- Maccarrone M, Di Rienzo M, Battista N, Gasperi V, Guerrieri P, Rossi A, Finazzi-Agrò A. The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(36):33896–903. doi: 10.1074/jbc.M303994200. Epub 2003 Jun 18. PMID: 12815050.
- M. Llanos Casanova, Cristina Blázquez, Jesús Martínez-Palacio, Concepción Villanueva, M. Jesús Fernández-Aceñero, John W. Huffman, José L. Jorcano, Manuel Guzmán. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest*. 2003;111(1):43–50. <https://doi.org/10.1172/JCI16116>
- Wang M, Wang YH, Avula B, et al. Decarboxylation Study of Acidic Cannabinoids: A Novel Approach Using Ultra-High-Performance Supercritical Fluid Chromatography/Photodiode Array-Mass Spectrometry. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2016;1(1):262–271. doi:10.1089/can.2016.0020
- Zaharia LS, Trofin I, Vaireanu DI, Dabija G. Influence of temperature and heating time on the decarboxylation of Δ9-thca and cbda in the cannabis inflorescences. *UPB Sci Bull Ser B Chem Mater Sci*. 2020;82(3):73–84.
- Joshi M, Patravale V. Formulation and evaluation of nanostructured lipid carrier (NLC)-based gel of valdecoxib. *Drug Dev Ind Pharm*. 2006;32(8):911–918. doi:10.1080/03639040600814676
- Croda. The HLB System. *Society*. 2004;37(10):1390–1393. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924194>
- Ohba N. Hydrophile-Lipophile Balance Values for O/W Emulsions Stabilized by Nonionic Surfactants. II. “Required Hydrophile-Lipophile Balance Values” of the Oil Mixture. *Bull Chem Soc Jpn*. 1962;35(6):1021–1025. doi:10.1246/bcsj.35.1021
- Yamashita Y, Miyahara R, Sakamoto K. *Emulsion and Emulsification Technology*. Elsevier Inc.; 2017. doi:10.1016/B978-0-12-802005-0.00028-8
- Americas I. The HLB System. *Society*. 1980;37(10):1390–1393.

MUCHAS GRACIAS

-  INTIArg
-  @INTIargentina
-  INTI
-  @intiargentina
-  canalinti



INTI

Instituto Nacional
de Tecnología Industrial



**Ministerio
de Economía**
República Argentina

**Secretaría de Industria
y Desarrollo Productivo**

Próximos pasos

1.

PERMEACIÓN TRANSDÉRMICA

Estudiar la permeación y penetración de las nanoformulaciones en modelos in vitro y ex vivo de piel sana y/o enferma

2.

ESTABILIDAD QUÍMICA

Estudiar la actividad protectora de las nanoformulaciones de fito-cannabinoides frente a factores deteriorantes

3.

ENSAYOS EN CÉLULAS

Determinar la citotoxicidad, la actividad anti-proliferativa y la actividad antiinflamatoria de NLN-THC y NLN-CBD, libres o incorporados en las nanoformulaciones sobre cultivos de líneas celulares.

