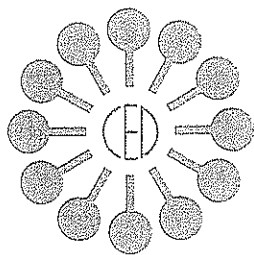


# COMUNICACIONES

presentadas a la

**XXVI JORNADAS DEL COMITE  
ESPAÑOL DE LA DETERGENCIA**



# COMITÉ ESPAÑOL DE LA DETERGENCIA TENSIOACTIVOS Y AFINES (C.E.D.)

C/. JORGE GIRONA, 18-26 · TELS. 204 02 12 · 204 06 00 · FAX 204 59 04 · 280 53 00 · TELEX 97977 IDEB E · 08034-BARCELONA

Dr. A. de la Maza  
CID/CSIC  
Barcelona

Barcelona, 4 abril 1995

Ref.: Liposomas formados con lipidos del estrato corneo: preparacion;  
caracterizacion interacción con tensioactivos.

Deseo agradecerle, en nombre del Comité Científico de las XXVI Jornadas del CED y en el mío propio, su fructífera colaboración en el desarrollo de las mismas, lo que sin duda ha contribuído en el éxito alcanzado.


Confianto poder contar de nuevo con su interesante participación en futuras Jornadas, le saluda atentamente,

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'J. Sánchez Leal'.

J. Sánchez Leal  
Secretario General

JSL/ms

8

  
Editado en Barcelona, en 1995, por:  
«COMITE ESPAÑOL DE LA DETERGENCIA,  
TENSIOACTIVOS Y AFINES»  
(C.E.D.)  
C/ Jordi Girona Salgado, 18-26  
08034 - BARCELONA  
ESPAÑA

Con la colaboración de:



Generalitat de Catalunya  
Departament d'Indústria i Energia  
Direcció General de Seguretat Industrial

ISBN 84-605-2036-6

Depósito Legal SE-295/1995

*Reg. 82368*

## INDICE DE MATERIAS

	Pág
Una perspectiva tecnológica de la evolución del hombre. X. DOMINGO .....	1
Influencia de los componentes del aceite libre sobre la solubilidad y la viscosidad de los sulfonatos de alquilbenceno lineal. L. COHEN, R. VERGARA, A. MORENO, J.L. BERNA .....	
Intermediate by-products in methyl ester sulphonation. D.W. ROBERTS, C.J. CLEMETT, C.D. SAUL, A ALLAN, R.A. HODGE ....	
Evaluación del efecto de tensioactivos en <i>E.coli</i> por citometría de flujo; comparación de marcadores de potencial de membrana. J. COMAS, J. VIVES-REGO .....	
Toxicidad de los alcoholes grasos etoxilados en función del tipo de distribución de los homólogos oxietilenados. M.T. GARCIA, I. RIBOSA, E. CAMPOS, R. SALVIA .....	43
Skin friendly surfactants in dish wash products. M. FENDER. A. DOMSCH .....	53
Alkyl polyglycosides a new generation of surfactants for the use in manual dishwashing agents. C. NIEENDICK, K.H. SCHMID .....	
Liposomas formados con lípidos del estrato córneo; preparación; caracterización e interacción con tensioactivos. O. LOPEZ, A. DE LAMAZA, L. CODERCH, J.L. PARRA .....	79
Interaction between direct dyes and nonionic surfactants. S. PEGIADOU-KOEMTZOPOULOU, I. ELEFThERiADIS; A. KEHAYOGLOU	95
Mild and clean amphoteric surfactants in hand dish wash. V. GUILLOU, P. BOITTIAUX .....	107
Colour measurement and quality control in the chemical industry. J. MÖLLER-KEMSA, F. BRÜCKER .....	117
Persalt bleaches as components of heavy duty household detergents and update. W.J. ROSENFELDER .....	

LIPOSOMAS FORMADOS CON LIPIDOS DEL ESTRATO CORNEO:  
PREPARACION; CARACTERIZACION E INTERACCION CON  
TENSIOACTIVOS.

O. LOPEZ, A. DE LA MAZA, L. CODERCH y J. L. PARRA

\* Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (C.S.I.C.)  
Centro de Investigación y desarrollo (C.I.D.)

SUMMARY

We have investigated the formation and the physico-chemical properties of liposomes prepared from a lipid and aminoacid mixtures extracted from pig stratum corneum when sonicated at 80°C in water containing Tris buffer and 100 mM NaCl, supplemented with 10 mM of 5-(6)Carboxyfluorescein. The mean vesicle size distribution and the polydispersity of liposomes were determined by photon correlation spectroscopy, the lipid composition were obtained by TLC/FID. Aminoacid analysis was carried out using an aminoacid autoanalyzer and the internal volume and the bilayer permeability was determined by spectrofluorometry.

The results indicate that lipid-aminoacid mixtures extracted from pig stratum corneum are capable of forming bilayers. On the other hand, the permeability studies showed a different effect of three surfactants, namely, Triton X-100, sodium dodecyl sulfate (SDS) and N-cetyl-N,N,N-trimethyl-ammonium bromide.

RESUMEN

En el presente trabajo, se estudia la formación y las propiedades físico-químicas de liposomas, formados a partir de mezclas de lípidos y aminoácidos extraídos del estrato córneo porcino. Tales mezclas, forman liposomas cuando se procede a una sonicación a 80°C en tampón Tris y 100mM NaCl, añadiendo además 10 mM de 5-(6)Carboxifluoresceína. La distribución media de tamaño y el índice de polidispersidad de los liposomas, fueron determinadas por espectroscopía de correlación fotónica, la composición lipídica fue obtenida por TLC/FID, para el análisis de aminoácidos se utilizó un autoanalizador de aminoácidos y el volumen interno así como la permeabilidad de la bicapa fueron determinados por espectrofluorimetría.

Los resultados indicaron que las mezclas lípido-aminoácido extraídas de estrato córneo porcino, son capaces de formar liposomas. Por otro lado, los estudios de permeabilidad mostraron el diferente efecto sobre las bicapas respecto a tres tensioactivos: Tritón X-100, sodio dodecil sulfato (SDS) y N-cetil-N,N,N-trimetilamonio.

Postal addresses:

\* C/Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, SPAIN

## INTRODUCCION

El estrato córneo (SC), la capa más externa de la epidermis en los mamíferos, constituye un compartimento protéico (corneocitos) y otro lipídico (espacio intercelular). Esta matriz intercelular está organizada en bicapas y se ha postulado que proporciona las propiedades de permeabilidad del SC, así como asegura la cohesión entre los corneocitos (1,2). La composición analítica de los lípidos y aminoácidos del estrato córneo ha sido ampliamente estudiada en trabajos anteriores (3-6).

A fin de establecer que los lípidos del estrato córneo formaban bicapas, Wertz y Abraham (7-9), prepararon liposomas a partir de mezclas lipídicas cuya composición era aproximadamente la de los lípidos del estrato córneo. Sin embargo, sería interesante conocer si mezclas lípido-aminoácido, directamente extraídas del SC porcino son capaces de formar liposomas.

En este trabajo, se ha determinado la idoneidad de estas mezclas incluídas en el estrato córneo para formar bicapas; asimismo, se han estudiado sus parámetros físico-químicos, tales como la permeabilidad, distribución del tamaño de partícula, eficacia de encapsulación, volumen interno, temperatura de transición, etc. La comparación de estos resultados, respecto a los obtenidos al realizar experimentos análogos con bicapas formadas con fosfolípidos, podría contribuir a un mejor conocimiento de la estructura y propiedades del estrato córneo. Por otro lado, los estudios de la diferente interacción bicapa-tensioactivo, llevados a cabo con Tritón X-100, SDS y N-cetil-N,N,N-trimetilamonio, podrían proporcionar una información importante acerca de las distintas características de estos tensioactivos y su efecto sobre este tipo de estructuras liposómicas.

## MÉTODOS Y MATERIALES

### Separación del estrato córneo.

Se utilizaron para este estudio cerdos de 6 meses aproximadamente, con un peso de entre 20 y 30 Kg, proporcionados por el matadero y llevados al laboratorio intactos.

La mayor parte del pelo se retiró de la superficie de la piel mediante una maquinilla eléctrica. Seguidamente, las secciones de piel fueron suspendidas en agua a 70°C durante 4-5 min., y la epidermis pudo ser extraída con ayuda de una espátula. Las porciones de epidermis se mantuvieron en 100 ml de una solución 0,5% de tripsina en tampón fosfato isotónico salino (PBS) a pH 7,4 y una temperatura de 4°C, durante 12 horas (la tripsina y el PBS fueron suministrados por Sigma, St. Louis MO, USA). A continuación, las porciones de estrato córneo se pasaron a través de un tamiz y se lavaron y suspendieron en abundante agua destilada. Posteriormente, se les añadió 100 ml de solución tripsina/PBS recién preparada, y se agitaron rotatoriamente a temperatura ambiente durante 2 horas, al término de las cuales se procedió a su recogida sobre un tamiz, lavado con agua destilada, secado bajo vacío y almacenamiento a -20°C hasta su uso (10,11).

### Extracción lipídica.

Las porciones del estrato córneo, fueron suspendidas sucesivamente en tres mezclas separadas de cloroformo/metanol (2:1, 1:1 y 1:2, v/v) durante dos horas cada vez, y finalmente fueron extraídas con metanol durante 12 horas a fin de retirar incluso las trazas de lípidos polares (11,12). Los líquidos de extracción fueron mezclados, concentrados hasta sequedad, pesados y previamente a su análisis se redisolviéron en cloroformo/metanol.

### Análisis lipídico.

El extracto de lípidos obtenido, fué analizado en primer lugar mediante cromatografía de capa fina (TLC), donde la fase móvil utilizada para los lípidos no polares, fué una disolución de hexano/eter dietílico/ácido acético (80:20:1), y para los lípidos polares cloroformo/metanol/agua (65:25:4). Después de eluidos y una vez secos, se procedió a una carbonización de los cromatogramas con 50% de ácido sulfúrico a 220°C para una mejor identificación de los diferentes lípidos.

El análisis cuantitativo, se obtuvo usando un cromatógrafo de capa fina acoplado a un detector por ionización de llama (TLC/FID, Iatroscan MK-5, Iatron lab. inc. Tokyo, Japan). Para ello se depositó el extracto lipídico directamente sobre unas columnas de silica gel (Chromarods tipo S-III) con la ayuda de un depositador semiautomático (SES 3202/IS-02 semiautomatic sample spotter). Las columnas fueron desarrolladas posteriormente con las siguientes mezclas de eluyentes:

- 1° Cloroformo/metanol/agua (57/12/0,6) Hasta 2,5 cm.
- 2° Cloroformo/metanol/agua (57/12/0,6) Hasta 2,5 cm.
- 3° Hexano/eter dietílico/ácido fórmico (50/20/0,3) 8 cm.
- 4° Hexano/benceno (35/35) 10 cm.

Se procedió a un scan total para la identificación de todos los componentes lipídicos, y el mismo procedimiento fue aplicado sobre diferentes soluciones estándar a fin de obtener las curvas de calibración que permitieron la cuantificación de cada componente.

### Análisis de aminoácidos.

La última extracción con metanol, puede retirar además de los lípidos más polares, algunos aminoácidos de peso molecular bajo contenidos también en el estrato córneo. Para conocer la cantidad y tipo de estos aminoácidos se



utilizó un autoanalizador de aminoácidos (Biotronik)

#### Preparación de liposomas.

La mezcla de lípidos se secó bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente, y se preparó una dispersión acuosa de los lípidos, suspendiéndolos en tampón Tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS, Merk) y 100 mM NaCl, añadiendo además 10 mM 5(6)-carboxifluoresceína (CF; Eastman Kodak, Rochester, NY) hasta obtener una concentración final de 10 mgr/ml a pH 7,4. Esta suspensión fue sonicada en un baño sonicador (514 ECT Selecta) a 80°C durante unos 15 min. aproximadamente (13,14).

Para el estudio del volumen interno de estas estructuras, y para determinar la alteración en la permeabilidad de la bicapa, debida a la presencia de los tres tensioactivos usados, las vesículas que contenían CF se pasaron a través de una columna cromatográfica de resina Sephadex G-50 (Pharmacia, Uppsala, Sweden), de manera que quedara separada la CF libre de la encapsulada.

#### Estudio de la temperatura de transición mediante RMN <sup>1</sup>H.

Para determinar la temperatura de transición de fase de los lípidos, se preparó como muestra una suspensión de 1 mg del extracto lipídico en 1 ml de agua deuterada (99,99% D) sonicada durante 15 min. en un baño sonicador a 80°C y se realizó un espectro de resonancia magnética de protón en un rango de temperaturas entre 25 y 90°C (Varian Unity de 300 MHz).

#### Determinación de la polidispersidad y de la distribución de tamaño de partícula en las bicapas.

El tamaño medio de vesícula y la polidispersidad de la suspensión de liposomas, fue determinada por

espectroscopía de correlación fotónica (Malvern Autosizer 4700c PS/MV), las medidas se tomaron a 37°C y un ángulo de detección de 90°.

**Determinación de la eficacia de encapsulación de los liposomas.**

La eficacia de encapsulación, se define como la cantidad de CF encapsulada en la preparación de liposomas (expresada en términos de porcentaje en volumen), y para determinarla se utilizaron métodos espectrofotométricos. La concentración de CF contenida en las vesículas fue evaluada después de la destrucción de los liposomas por adición de una cantidad suficiente de los tensioactivos estudiados, usando para ello un espectrofluorímetro RF-540 Shimadzu equipado con un compartimento termoregulador.

**Volumen interno.**

El volumen interno de los liposomas se define como aquel encerrado por una cantidad dada de lípido y se expresa como ml/mg de lípido. Este parámetro depende del radio de los liposomas formados. El volumen interno fue determinado mediante análisis espectrofluorofotométricos.

**Medida de la permeabilidad de los liposomas.**

La medida de la fluorescencia de la CF difundida desde el interior de los liposomas, se determinó utilizando el espectrofluorímetro Shimadzu RF-540, fijando la longitud de onda de excitación de la CF a 495 nm, y el máximo de emisión de la misma a 515 nm.

Los liposomas se sometieron a la acción de distintas concentraciones de diferentes tensioactivos en cubetas de cuarzo a 25°C. La cantidad total de CF encapsulada se determinó por destrucción total de los mismos añadiendo 60

microlitros de una solución acuosa tamponada de Tritón X-100 al 10% v/v a un volumen de 4 ml de suspensión de liposomas (15). La cantidad de CF difundida después de cada tratamiento se calculó aplicando la siguiente ecuación (16):

$$\%CFdifundida = (I_t - I_o) / (I - I_o) \times 100$$

Donde  $I_o$ , corresponde al valor de intensidad de fluorescencia inicial antes de adicionar tensioactivo al liposoma,  $I_t$ , corresponde al valor de la intensidad de fluorescencia transcurridos 30 minutos después de haber añadido el tensioactivo, e  $I$  corresponde a la intensidad de fluorescencia medida a la misma longitud de onda que en los casos anteriores (515,4 nm) después de destruido el liposoma por adición de Tritón X-100.

## RESULTADOS

### Análisis lipídico y de aminoácidos.

La mezcla extraída con cloroformo-metanol (0,245 g de un peso seco inicial de epidermis de 2,506 g) estaba constituida predominantemente por lípidos (0,228 g) y también por una pequeña cantidad de aminoácidos (0,016 g). Por lo tanto, el extracto lipídico resultó representar un 18,35% respecto del peso seco de la epidermis y un 9% respecto el peso del estrato córneo seco. Por otro lado, el porcentaje de aminoácidos presentes alcanzó el 6,7% del total extraído.

Para determinar los porcentajes de cada lípido que fueron incorporados a los liposomas formados por la mezcla extraída, así como la obtención de las rectas de calibrado correspondientes a los componentes standard, se aplicó la técnica de TLC/FID.

En la siguiente tabla se muestran las rectas de calibrado para cada componente lipídico:

TABLA I

COLESTEROL	$Y = 39661,96X + 9761,31$
TRIGLICERIDO	$Y = 19286,44X + 736,95$
SULFATO DE COLESTEROL	$Y = 15468,37X + 350,11$
CERAMIDAS	$Y = 38341,91X + 14184,25$
ACIDOS GRASOS	$Y = 16790,92X + 5315,51$
ESTER DE COLESTEROL	$Y = 23296,63X + 573,27$

Los porcentajes en peso de cada uno de los lípidos contenidos en el estrato córneo, respecto del total extraído se muestran a continuación:

TABLA II

CERAMIDAS	36,02%
COLESTEROL	27,42%
ACIDOS GRASOS	24,53%
SULFATO DE COLESTEROL	4,23%
ESTER DE COLESTEROL	4,23%
TRIGLICERIDO	3,08%

Se observó que los lípidos del estrato córneo, consisten principalmente en ceramidas, colesterol, ácidos grasos libres, y pequeñas cantidades de sulfato de colesterol, ester de colesterol y triglicéridos. El análisis, mostró a las ceramidas como especie dominante del estrato córneo y también la ausencia de fosfolípidos (14,17). Las extracciones con cloroformo-metanol resultaron ser bastante selectivas a la hora de retirar el total de los lípidos del estrato córneo, pero es posible que se produzca un deterioro en la estructura de los corneocitos; debido a esto, el tratamiento con estos disolventes provocó la extracción de algunos

aminoácidos por la desintegración de los corneocitos (11,18). Los porcentajes en peso de los aminoácidos presentes en la mezcla son los siguientes:

TABLA III

ASP	0,3051	THR	0,3539	SER	0,7612
GLU	1,4774	PRO	0,4103	GLY	0,5761
ALA	0,5425	CYS	0,0772	VAL	0,2533
MET	0,0000	ILE	0,1555	LEU	0,3461
TYR	0,1818	PHE	0,2760	HIS	0,3960
TRP	0,0000	LYS	0,1041	ARG	0,5124

#### Volumen interno y eficacia de encapsulación.

Con la composición de lípidos y aminoácidos descrita anteriormente y siguiendo el método descrito en la parte experimental, se formaron liposomas. El volumen interno de estas estructuras, resultó ser extraordinariamente pequeño si se compara con los valores del mismo parámetro para vesículas de fosfolípido, tomando un valor de aproximadamente 0,1 microlitros de CF encapsulados por miligramo de lípido. También se presentaron unos valores muy bajos de la eficacia de encapsulación. La formación de vesículas multilamelares podría explicar la obtención estos valores tan bajos.

#### Distribución de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y temperatura de transición de fase.

La distribución de tamaño de la suspensión de liposomas formados como se ha indicado anteriormente, mostró un índice de polidispersidad de 0,240 lo cual indica una distribución homogénea. El tamaño medio de partícula resultó ser de 289,7 nm.

La temperatura de transición de fase de la suspensión de liposoma, fue determinada como se describe en la parte experimental. El espectro RMN se tomó cada 5 grados,

desde una temperatura de 25 a 90°C y se observó una inflexión a 60°C, por lo que se tomó este valor como la temperatura de transición de fase, por debajo de la cual es imposible que la mezcla extraída del estrato córneo pueda formar liposomas por sonicación.

#### Estudios de permeabilidad

A fin de estudiar los cambios de permeabilidad en liposomas, promovidos por los tensioactivos, se trataron los liposomas previamente caracterizados con los siguientes tensioactivos: Tritón X-100, SDS y N-cetil-N,N,N-trimetilamonio. Se utilizó una concentración fija de tensioactivo añadiendo 250 microlitros de tensioactivo sobre 3 ml de liposoma, resultando finalmente una concentración de 0,08 mM. Se investigó el aumento de la difusión de la CF contenida en el interior de las vesículas en función del tiempo, y se estableció así una cinética para cada uno de los tensioactivos, como se indica en la figura 1:

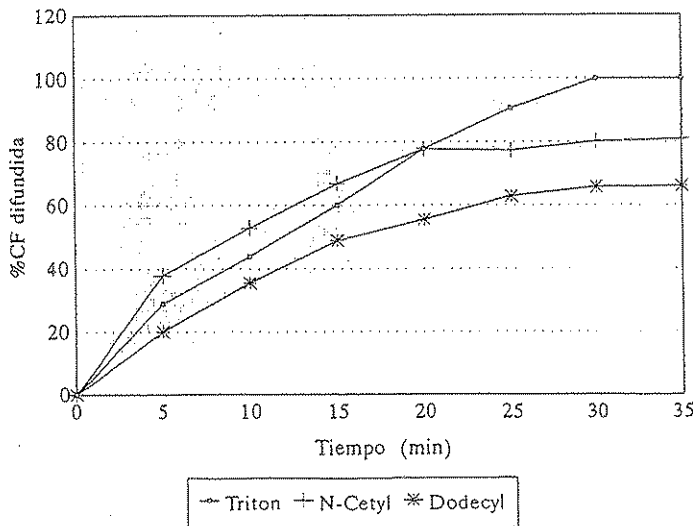


Figura 1 : Cinética de la difusión de la CF contenida en el interior de los liposomas por acción de los tensioactivos.

Puede observarse que con una concentración 0,08 mM de tensioactivo, no se alcanza una difusión completa de la CF encapsulada en las suspensiones tratadas con el tensioactivo aniónico (N-cetil-N,N,N-trimetilamonio) y catiónico (SDS), mientras que el tensioactivo no iónico (Tritón X-100) es capaz de destruir completamente las vesículas en el mismo espacio de tiempo y a la misma concentración. Estos resultados que ponen de manifiesto al Tritón como agente más enérgicamente destructor de bicapas, están en consonancia con trabajos científicos anteriores (19-21).

Se puede asimismo observar que durante los primeros 20 min, el N-cetyl se muestra más activo que el Tritón X-100, es decir, en principio la difusión de la CF parece ser más rápida en las bicapas tratadas con N-cetyl, pero a partir de los 20 min se produce un cambio; la CF difundida de los liposomas tratados con Tritón, continúa aumentando hasta alcanzar el 100%, es decir hasta la destrucción completa de las vesículas; en tanto que los tratados con N-cetyl, parece que en el mismo intervalo de tiempo han alcanzado ya el equilibrio en la permeabilidad, aproximadamente el 80% de CF difundida. Por otra parte el tensioactivo aniónico (SDS) se mantiene en todo momento por debajo de los otros dos en cuanto a permeabilidad, mostrándose menos activo, y llegando a conseguir un 65% de difusión de la CF encapsulada.

### CONCLUSIONES

Se puede concluir, que mezclas de lípidos y aminoácidos extraídos del estrato córneo porcino, forman liposomas en las condiciones indicadas anteriormente, y que la baja eficacia de encapsulación que presentan puede ser debido a que son multilaminares.

Se vió que este tipo de estructuras, presentaban una permeabilidad espontánea durante las dos primeras horas, prácticamente nula. Y que frente a diferentes tensioactivos

tenían diferentes respuestas, siendo el Tritón capaz de destruirlas por completo, el N-cetyl solo en parte y resultando el SDS el menos activo.



## REFERENCIAS

1. Grayson S, Elias PM: Isolation and lipid biochemical characterization of stratum corneum membranes complexes: Implications for the cutaneous permeability barrier. *J Invest Dermatol* 78: 128-135 (1982).
2. Elias PM: Epidermal lipids, barrier function and desquamation. *J Invest Dermatol* 80: 44-49 (1983).
3. Abraham W, Wertz PW, Downing DT: Linoleate-rich acylglucosyl ceramides of pig epidermis: Structure determination by proton magnetic resonance. *J Lipid Research*. 26: 761-765 (1985).
4. Ranasingh AW, Wertz PW, Downing DT, Mackeine JC: Lipid composition of cohesive and desquamated corneocytes from mouse ear skin. *J Invest Dermatol* 86: 187-190 (1986).
5. Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kamashima M and Hidano A: Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: An etiologic factor in atopic dry skin. *J Invest Dermatol* 96: 523-526 (1991).
6. Wertz PW and Downing DT: Stratum corneum: Biological and biochemical considerations. In: Hadgraft J; Guy RH (eds). *Transdermal drug delivery. Developmental issues and research initiatives*. Dekker, New York 1989 pp 1-22.
7. Wertz PW, Abraham W, Landman L and Downing DT: Preparation of liposomes from stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol* 87: 582-584 (1986).
8. Wertz PW: Liposome dermatics: Chemical aspects of the skin lipids approach. In: Braun-Falco O, Korting HC and Maibach H (eds). *Liposome dermatics*, Grisback

conference, Springer-Verlog, Berlin 1992 pp 38-43.

9. Abraham W, Wertz PW, Landman L and Downing DT: Stratum corneum lipids liposomes: Calcium induced liposomes by alkyl sulfate surfactants. *Langmuir* 8: 2422-2426 (1992).
10. Wertz PW, Downing DT: Acylglucosylseramides of pig epidermis: Structure determination. *J Lipid Res* 24: 753-758 (1982).
11. Swartzendruber DC, Kitko DJ, Wertz PW, Madason KC, Downing DT: Isolation of corneocyte envelopes from porcine epidermis. *Arch Dermatol Res* 280:424-429 (1988)
12. Wertz PW, Swartzendruber DC; Kitko DJ, Madison KC, Downing DT: The role of the corneocyte lipid envelope in cohesion of stratum corneum. *J Invest Dermatol* 93:169-172 (1989).
13. Wertz PW, Abraham W, Landman L and Downing DT: Preparation of liposomes from stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol* 87: 582-584 (1986).
14. Abraham W, Downing DT: Preparation of model membranes for skin permeability studies using stratum corneum lipids. *J Invest Dermatol* 93:809-813 (1989).
15. Deamer DW, Uster PS: Liposome preparation: Methods and mechanisms. In: *Liposomes Ostro MJ (eds), Marcel Dekker, inc New York 1983 Chapter 1.*
16. De La Maza A and Parra JL: Disintegration of liposomes by anionic surfactant and formation of mixed micelles. *Langmuir* 9:870-873 (1993).
17. Elias PM: Lipids and the epidermal permeability

- barrier. Arch Dermatol Res 270: 95.117 (1981).
18. Wertz PW, Swartzendruber DC, Kitko DC, Madison KC, Downing DT: The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. J Invest Dermatol 93: 169-172 (1989).
  19. De La Maza A, García MT, Sánchez Leal J, Parra JL: Efecto de los tensioactivos no iónicos sobre la permeabilidad da los liposomas. Invest e Inform Textil y de Tensioac. Vol XXXV n° 4 (1992).
  20. Allen TM, Romans AY, Kercret H, Segrest JP: Detergent removal during membrane reconstitution. Biochim Biophys Acta 601 328 (1980).
  21. Ribosa I, García MT, De La Maza A, Trullas C: Estudio del proceso de solubilización de estructuras fosfolipídicas por agentes tensioactivos: J Com Deterg XX (1989).