



BIOCOSMETICS - SKIN AGING
1993 IFSCC BETWEEN-CONGRESS CONFERENCE
Platja d'Aro, Costa Brava, SPAIN
September 21 - 23, 1993

1993 IFSCC INTERNATIONAL CONFERENCE

Platja d'Aro, 21-23 September 1993

Costa Brava Spain



ANNEX 1

BIOCOSMETICS - SKIN AGING
1993 IFSCC BETWEEN-CONGRESS CONFERENCE
Platja d'Aro, Costa Brava, SPAIN
September 21 - 23, 1993

1993 IFSCC INTERNATIONAL CONFERENCE

Platja d'Aro, 21-23 September 1993

General Secretary's Office:

1993 IFSCC International Conference
Pau Claris, 107, principal
08009 Barcelona
SPAIN

Tel. : (3) 488.18.08

Fax : (3) 488.32.10

BEFORE THE 30TH APRIL 1993:

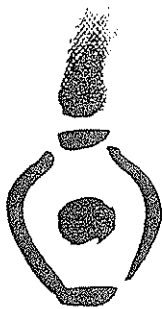
Text of your manuscript (maximum 5,000 words), and short summary (10-15 lines).
Please, use the enclosed paper and follow strictly the typing instructions also
enclosed (Annex 2).



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
QUÍMICOS COSMÉTICOS

Secretaría general: Sociedad Española de Químicos Cosméticos
Pau Claris 107, pral. - 08009 BARCELONA (ESPAÑA)
Tel. (93) 488 18 08 Fax (93) 488 32 10





BIOCOSMETICS - SKIN AGING
1993 IFSCC BETWEEN-CONGRESS CONFERENCE
Platja d'Aro, Costa Brava, SPAIN
September 21 - 23, 1993

Dr. Alfonso de la Maza
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
QUIMICA Y TEXTIL (CSIC)
Jordi Girona, 18-26
08034 Barcelona

22 de Febrero de 1993

Apreciado Dr. De la Maza:

El Comité Científico del 1993 IFSCC International Cosmetic Conference ha examinado cuidadosamente su abstract titulado "Modelización de las composiciones lipídicas del estrato córneo en la formación de liposomas" y ha decidido aceptarlo para la Sesión de Posters.

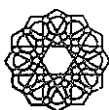
Nos permitimos recordarle que la fecha límite para la recepción de manuscritos es el 30 de Abril y que deberá adjuntar al mismo un breve resumen (en Inglés) de 10-15 líneas, para proceder a su publicación en el libro de preprints (máximo 5.000 palabras), y que se deberá preparar según las instrucciones anexas.

Aprovechamos esta oportunidad para agradecerle su participación en este importante evento.

Atentamente,

Francesc Casadó, Ph. D
Presidente
Comité Científico

Att.: Annex



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
QUÍMICOS COSMÉTICOS

Secretaría general: Sociedad Española de Químicos Cosméticos
Pau Claris 107, pral. - 08009 BARCELONA (ESPAÑA)
Tel. (93) 488 18 08 Fax (93) 488 37 10





BIOCOSMETICS - SKIN AGING
1993 IFSCC BETWEEN-CONGRESS CONFERENCE
Platja d'Aro, Costa Brava, SPAIN
September 21 - 23, 1993

Secretaria General:
General Secretary's Office:

**SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUIMICOS
COSMETICOS**

Pau Claris, 107
08009 Barcelona
España

N.I.F.: G-08329062

MAZA RIBERA DE LA , ALFONSO
CENTRO INVEST. Y DESA. C.S.I.C
JORDI GIRONA 18-26
08034 BARCELONA
ESPAÑA
NIF =

Factura 096
Invoice

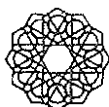
Fecha 15/06/93
Date

Nº Pers.	Concepto Concept	Precio Price	Importe Import
1	INSCRIPCION CONGRESISTA	60870	60870
TOTAL			60870
IVA 15 % TAXES			9130
TOTAL Fac. Inv.			70000

Congresista n
Delegate Num. 096

Acompañante nº
Acc. Pers. Num

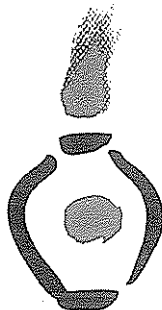
Ejemplar a presentar para entrega de documentación
Model to present for documentation delivery



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
QUIMICOS COSMETICOS

Secretaria general: Sociedad Española de Químicos Cosméticos
Pau Claris 107, pral. - 08009 BARCELONA (ESPAÑA)
Tel. (93) 488 18 08 Fax (93) 488 32 10





BIOCOSMETICS - SKIN AGING
1993 IFSCC INTERNATIONAL CONFERENCE
Platja d'Aro, Costa Brava, SPAIN
September 21 - 23, 1993

Dr. Alfonso de la Maza
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
QUIMICA Y TEXTIL (CSIC)
Jordi Girona Salgado, 18-26
08034 Barcelona

Barcelona. 29 de Octubre de 1993

Apreciado Dr. De la Maza:

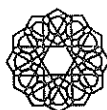
La sesión de posters del 1993 IFSCC INTERNATIONAL CONFERENCE, la más participada de las últimas Conferencias celebradas, ha contribuido, sin duda alguna, al éxito de la manifestación tanto en el sentido de atracción de congresistas como en el del alto contenido de interés científico.

En dicha sesión, el poster que Ud. presentó se encuentra entre los que más interés han despertado. Por ello, felicitamos a Ud., agradeciéndole su participación, y rogamos haga extensiva nuestra satisfacción a todos sus colaboradores.

Atentamente.

Joaquim Sisto
Presidente SEQC

Francesc Casadó
Comité Científico



SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
QUÍMICOS COSMÉTICOS

Secretaria general: Sociedad Española de Químicos Cosméticos
Pau Claris 107, pral. - 08009 BARCELONA (ESPAÑA)
Tel. (93) 488 18 08 Fax (93) 488 32 10



MODELIZACION DE LAS COMPOSICIONES LIPIDICAS DEL ESTRATO CORNEO EN LA FORMACION DE LIPOSOMAS

A. de la Maza, L. Coderch, P. Bosch, J.L. Parra y A. Manich

INSTITUTO DE TECNOLOGIA QUIMICA Y TEXTIL, C.S.I.C.

1. INTRODUCCION

Los liposomas formados por fosfolipidos son los que han centrado un número más importante de investigaciones en relación con aspectos de estructuración supramolecular, difusión de las bicapas fosfolipidicas y solubilización de las mismas. No obstante, en los últimos años, se han descrito liposomas preparados por la fracción lipídica más representativa del estrato córneo ya que pueden simular la disposición lipídica multilamelar responsable de la barrera de permeabilidad cutánea y, asimismo, pueden constituir un adecuado sistema de vehiculización de compuestos activos a través de la piel (1).

En el proceso de queratinización de la epidermis, se ha detectado, en relación con los componentes lipídicos, una progresiva desaparición de fosfolipidos que, a su vez, se corresponde con un incremento de ceramidas. Una composición lipídica representativa del estrato córneo podría estar constituida por Ceramidas (40%), Colesterol (25%), Acidos grasos libres (25%) y Sulfato de colesterol (10%)(2).

Es importante considerar la formación de liposomas que contengan ceramidas en lugar de fosfolipidos con el fin de intentar mimetizar mejor las estructuraciones lipídicas del estrato córneo.

2. OBJETIVOS

En este trabajo, se ha pretendido evaluar las combinaciones lipídicas más idóneas para formar liposomas teniendo en cuenta intervalos de concentración relativa de los distintos lipidos que se aproximan a la composición lipídica del estrato córneo aceptada a nivel

internacional. Con dichas combinaciones de composición lipídica, se han efectuado una serie de experimentos con el fin de modelizar su comportamiento en función de las concentraciones relativas de los lípidos seleccionados. De este modo, se puede aportar una información científica válida para conocer con más precisión las posibilidades de estructuración lipídica del estrato córneo y su correlación con las características óptimas de formación de liposomas, teniendo en cuenta sus tamaños de partícula, capacidad de encapsulación y su grado de permeación.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Se han utilizado los lípidos siguientes: Ceramida tipo III (Sigma), Colesterol y Ácido palmítico (Fluka) y Sulfato de colesterol, sintetizado en nuestros laboratorios a partir de colesterol (Pureza superior al 99%). El agente fluorescente 5-(6)carboxifluoresceína (CF), fue suministrado por Eastman Kodak y purificado por cromatografía en columna.

Métodos

Preparación de liposomas.

La mezcla de lípidos seleccionada se disolvió en Cloroformo/Metanol 2:1 y se evaporó en rotavapor a 40°C y 350 mm de Hg, en corriente de N₂. Posteriormente, los lípidos se hidrataron con una solución tampón 110 mM de ClNa y TRIS 5 mM a pH 7,0 conteniendo, asimismo, una concentración 10 mM de CF. Dicha hidratación se efectuó mediante ultrasonicación a 80°C durante 15 minutos. Se separó la CF no encapsulada mediante el paso de la suspensión de liposomas a través de una columna rellena de Sephadex 6-50 (medium), obteniéndose, de este modo, vesículas multilaminares (MLV).

Quasielastic Light Scattering

La determinación del tamaño de partícula y polidispersidad de las suspensiones de liposomas se realizó por medio del Photon Correlator Spectrophotometer (Malvern Autosizer IIc). Las lecturas de tamaño de partícula se realizaron a 25°C y con un ángulo de 90°.

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 515,4 nm (3).

La suspensión de liposomas (5 ml), que contenía 1 mg de lipidos/ml, se sometió a la acción de una concentración constante de tensioactivo (50 μ l de una solución 50 mM de Triton X-100), en cubeta de cuarzo a 25°C. La cantidad total de CF encapsulada, se determinó por destrucción total de los liposomas añadiendo 100 μ l de una solución acuosa tamponada de Tritón X-100 150 mM, a un volumen de 2 ml de suspensión de liposomas. La cantidad de CF difundida se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ CF difundida} = \frac{I_t - I_0}{I_\infty - I_0} \times 100$$

Donde I_0 , 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 (100 μ l de una solución 150 mM).

Determinación del volumen interno y de la eficacia de encapsulación

El volumen interno y la eficacia de encapsulación de los liposomas, se determinaron a partir de medidas de fluorescencia de los liposomas que contenían CF, después de ser separados del material fluorescente no encapsulado. A tal fin, los liposomas se desintegraron con Triton X-100 y se midió su valor espectrofluorimétrico.

Método de Optimización de las combinaciones lipídicas

Se ha empleado un diseño factorial ortogonal de Box y Behnken para tres variables (ceramida, ácido palmítico y colesterol) a tres niveles que oscilaban entre si en $\pm 15\%$ de los valores de estas variables en relación con la composición lipídica media seleccionada. El valor de sulfato de colesterol ha servido para completar la composición hasta el 100%.

Con esta experimentación se han planteado relaciones funcionales a base de polinomios de segundo grado $y = \sum b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{ij} x_i x_j$ para $i \leq j$ siendo x_i los niveles de concentración de los componentes, y b_0 , b_i , b_{ij} los coeficientes de las ecuaciones de

regresión ajustadas por el método de los mínimos cuadrados para cada una de las respuestas (y) estudiadas (4).

Mediante análisis de la varianza se ha valorado la significación de las ecuaciones y de las distintas variables, obteniéndose modelos válidos de interpretación de los fenómenos investigados.

Para llevar a cabo el correspondiente diseño de optimización, se han seleccionado 15 composiciones lipídicas cuyas concentraciones relativas se indican en la Tabla I.

Las respuestas analizadas han sido las siguientes: tamaño de partícula, polidispersidad, grado de permeación, volumen interno y capacidad de encapsulación.

TABLA I. Composiciones lipídicas seleccionadas.

Muestras	Ceramida %	Colesterol %	A. Palmítico %	S.Colesterol %
1	40	21,25	21,25	17,50
2	34	25	21,25	19,75
3	46	25	21,25	7,75
4	40	28,75	21,25	10
5	34	21,25	25	19,75
6	46	21,25	25	7,55
7	40	25	25	10
8	40	25	25	10
9	40	25	25	10
10	34	28,75	25	12,25
11	46	28,75	25	0,25
12	40	21,25	28,75	10
13	34	21,25	28,75	16
14	46	25	28,75	0,25
15	40	28,75	28,75	2,50

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Formación de liposomas. En todas las composiciones estudiadas, se ha podido constatar la formación de estructuras liposómicas. Asimismo, se ha evaluado la estabilidad "per se" de los liposomas que, contrariamente a los liposomas formados por fosfolípidos, mantienen una integridad en cuanto a su capacidad permeante muy estimable. Después de transcurridas 24 horas desde la preparación de los liposomas, es cuando se inicia la difusión de la CF encapsulada.

En líneas generales las ecuaciones de optimización indican que las variables que afectan predominantemente a las estructuras vesiculares, teniendo en cuenta las cinco respuestas estudiadas, son el contenido en ceramida y Acido palmítico. A continuación, se indica sucintamente como afecta la composición relativa de los lípidos a distintas características de los liposomas.

Permeabilidad. Para concentraciones altas de ceramida y ácido palmítico se obtiene la mínima difusión de la CF hacia el exterior del liposoma (aproximadamente, un ²32% de permeabilidad). Este hecho está directamente ligado con una proporción baja de colesterol y sulfato de colesterol.

Eficacia de encapsulación y volumen interno. Se obtiene un valor máximo para ambos parámetros, característicos de las vesículas lipídicas, a bajas concentraciones de ceramida y Acido palmítico, es decir a altas concentraciones de colesterol y sulfato de colesterol. En estas condiciones experimentales, se consigue el ^{máximo} de permeabilidad de las bicapas así como el mayor índice de encapsulación.

Tamaño de partícula y polidispersidad. El tamaño de partícula de los liposomas aumenta a medida que el contenido en colesterol disminuye, el contenido en ceramida aumenta y la concentración de ácido palmítico aumenta. El índice de polidispersidad está en todos los casos por debajo de 0,45 aunque valores de 0,1 se ajustan perfectamente a la ecuación establecida especialmente para altas concentraciones de palmítico y cerámica y bajos niveles de colesterol y sulfato de colesterol.

5. CONCLUSIONES

Utilizando un sistema modelo de composiciones lipídicas que simulan las del estrato córneo, y variando sus concentraciones relativas en un intervalo del 15% por encima y por debajo del valor real, en todos los casos se obtienen estructuras liposómicas. A partir de los parámetros optimizados, se deduce un tamaño de partícula medio de 250-300 nm un, volumen interno de 3,4% y una eficacia de encapsulación del mismo orden, lo cual correspondería a estructuras de tipo multilaminar.

Las concentraciones relativas de los cuatro lípidos seleccionados están implicadas en la obtención de características físico-químicas definidas para cada estructura liposómica, siendo los lípidos que ejercen mayor influencia la ceramida y el ácido palmítico.

La técnica de optimización puede ser muy útil para evaluar la influencia de los distintos componentes lipídicos utilizados en la preparación de liposomas sobre distintas características físico-químicas de dichas bicapas.

6. BIBLIOGRAFIA

1. W. Abraham, P.W. Wertz y D.T. Downing, *Biochim. Biophys. Acta.* 939, 403-408, (1988).
2. D.T. Downing, *J. of Lipid Research*, 33, 301-313, (1992).
3. M. Pajean, A. Hue y D. Herbage, *Int. J. of Pharmac.*, 77, 31-40, (1991).
4. G.E.P. Box y D.W. Behnken, *Technometrics*, 2, 445, (1960).