

IX CONGRESO NACIONAL DE DERMOFARMACIA

GRANADA

1 - 4 de Abril de 1998

*Dermofarmacía:
Piel y salud*



ESTUDIO «IN VIVO» DE LA FUNCIÓN BARRERA DEL ESTRATO CÓRNEO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO. EFECTO DE LOS LIPOSOMAS

*L. Coderch, M. de Pera, J. Fonollosa, A. de la Maza y J.L. Parra
Departamento Tensioactivos, CID, CSIC.*

INTRODUCCIÓN

Las principales funciones de la piel y en particular la capa más externa de la epidermis, el estrato córneo, consisten en proporcionar una barrera frente a las agresiones externas, impidiendo la absorción percutánea de compuestos xenobióticos y previniendo la pérdida excesiva de agua de la epidermis^{1,2}. En los últimos años, está adquiriendo un gran protagonismo el uso de liposomas como sistemas de liberación estratégicos en la aplicación tópica de un gran número de compuestos³.

Aunque se han descrito muchas teorías especulativas sobre la interacción liposomas-piel, en la actualidad no se conocen los mecanismos exactos implicados en la absorción de un principio activo y la aplicación de un contenido lipídico adicional que modifique la función barrera del estrato córneo. Actualmente, hay una concordancia científica en atribuir al espacio lipídico intercelular un gran protagonismo en el mecanismo global de la absorción percutánea y en la prevención de la pérdida transepidérmica de agua⁴.

La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) es una técnica biofísica muy adecuada para caracterizar la organización y el orden conformacional en sistemas lipídicos, membranas biológicas y membranas celulares intactas⁵. Esta técnica no invasiva de espectroscopia de infrarrojo se ha utilizado últimamente para evaluar *in vivo* el orden en las estructuras lipídicas del estrato córneo^{6,7}.

En el presente estudio se ha pretendido determinar la modificación estructural de los lípidos a diferentes profundidades del estrato córneo. Para ello, se han evaluado las frecuencias de la vibración del CH de los lípidos de la piel sometida o no al efecto de un liposoma convencional de fosfatidilcolina, tanto en su superficie como en las distintas capas del estrato córneo, después de efectuar sucesivos *strippings*. Las propiedades que determinan la permeabilidad del estrato córneo como la pérdida de agua, el contenido lipídico y el estado de hidratación de la piel, se han evaluado mediante las técnicas biofísicas no invasivas de TEWL, Sebumeter y Corneometer, respectivamente.

La correlación existente entre los datos estructurales de los lípidos por FTIR y las propiedades hidratantes de la epidermis de la piel sin tratar pueden permitir conocer

la función del espacio lipídico intercelular en el mecanismo global de la absorción percutánea. Así mismo, el estudio de la piel a la que se le ha aplicado un liposoma puede permitir conocer su efecto sobre la función barrera del estrato córneo ayudando a elucidar el mecanismo de acción de los liposomas en la aplicación tópica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Técnicas Biofísicas no invasivas

La determinación de las propiedades responsables de la permeabilidad del estrato córneo de los voluntarios humanos como el contenido lipídico, la pérdida transepidérmica de agua y el estado de hidratación de la piel se ha llevado a cabo mediante el Sebumeter SM 810 PC, el Tewameter TM 210 (TEWL) y el Corneometer CM 825, todos ellos de la firma Courage Khazaka. El Sebumeter mide el contenido lipídico de la piel basado en la fotometría de una cinta especial de plástico no adhesiva que se vuelve transparente en contacto con los lípidos. El evaporímetro determina la TEWL a través de la humedad relativa y la temperatura, empleando para su cálculo la ley de Fick, que cuantifica la cantidad de agua que se evapora a través de una superficie en un tiempo determinado. El corneómetro determina la cantidad de agua presente en el estrato córneo basado en la capacitancia del sistema cutáneo. Cuanto menor sea la cantidad de agua, más dificultad de paso tendrá la corriente eléctrica.

La espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) es una técnica no invasiva en la que la muestra se superpone directamente sobre un cristal transparente de selenuro de zinc. Si el cristal, de forma trapezoidal, está montado a un ángulo crítico, el haz de luz efectuará múltiples reflexiones internas entrando y saliendo de la muestra, de modo similar a un efecto multiplicador en el paso óptico. El ángulo de cristal en relación al haz determina el número de reflexiones en la muestra y también controla la profundidad de penetración. Esta última es proporcional a la longitud de onda de la radiación de IR e inversamente proporcional a la frecuencia. En un espectro de ATR-IR de piel, las señales a frecuencias bajas provienen de capas de piel más profundas comparadas con las señales a más altas frecuencias. En general, en el intervalo de frecuencias de interés, la profundidad de penetración es cerca de 1 μm .

En este estudio se ha utilizado un espectrofotómetro Nicolet, modelo 901-510, con un accesorio de ATR horizontal para sólidos Spectra Tech., modelo 0012-305, y un cristal plano de selenuro de cinc (7,5x1cm² con ángulo 45°) modelo 0050-703. Los espectros son la media de 100 scans (con un período de recogida de datos de 80s) con una resolución de 4 cm⁻¹ y rango de frecuencias de 4000 a 400 cm⁻¹.

En el análisis espectral cualitativo de ATR-FTIR se han examinado las siguientes vibraciones de los grupos CH₂ provenientes de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos del estrato córneo:

1. Vibración de tensión asimétrica (~2.920 cm⁻¹) (*asymmetric stretch*)
2. Vibración de tensión simétrica (~2.850 cm⁻¹) (*symmetric stretch*)
3. Flexión de tijera (~1.450 cm⁻¹) (*scissoring*)
4. Flexión de balanceo (~720 cm⁻¹) (*rocking*)

Experimentos

El fin de este estudio es evaluar las propiedades espectrales de IR y las propiedades de permeabilidad a diferentes profundidades de la barrera del estrato córneo tras someter

la piel o no a la acción de liposomas. Para conseguirlo, las diferentes capas del estrato córneo se han exfoliado mediante *tape stripping*.

Cinco voluntarios sanos (22-40 años) participaron en este estudio. Después de aclimatarse durante 30 minutos en una habitación acondicionada (20°C, 60% HR), se delimitó un área de 2 x 10 cm² en el antebrazo, en la cual se aplicaron 50 µl de la muestra a evaluar. Pasados 30 minutos, se llevaron a cabo 15 sucesivos *strips* con cinta adhesiva Scotch 810 magic tape de 19 mm (3 M Francia). Se efectuó el espectro de FTIR y se evaluaron las propiedades de permeabilidad antes de la aplicación de las muestras (-1), antes del primer *strip* (0), después del *strip* 1, 2, 7 y 15 (1, 2, 7, 15).

La solución de liposomas unilamelares de aproximadamente 200 nm se preparó con fosfatidilcolina de soja (S-100 Lipoid, Alemania) por extrusión de vesículas unilamelares grandes obtenidas por el método de evaporación por fase inversa⁹. La solución final contiene 10 mg/ml de fosfatidilcolina en solución salina NaCl 0,9%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras determinar el tipo de piel de los cinco voluntarios y comprobar que no habían sido sometidas a ningún tratamiento previo con hidratantes o emulsionantes con el Sebumeter, se aclimataron los sujetos y se delimitaron las zonas a evaluar. Se efectuó el espectro de FTIR y se evaluaron las propiedades de permeabilidad de la piel intacta. Como se pretendía evaluar el efecto del liposoma que se hallaba suspendido en una solución salina, se aplicó en un brazo la solución liposómica y en el otro solución salina como blanco para descartar el posible efecto de dicha solución. Pasados 30 minutos, se volvieron a efectuar las determinaciones biofísicas y se empezaron a efectuar los *strip-pings* repitiendo después de los *strips* 1, 2, 7 y 15 las mediciones mencionadas.

Las medias de los valores obtenidos para cada parámetro evaluado se representan frente al número de *strip* tomándose (-1) como valor para la piel intacta y (0) como valor de piel sometida a aplicación liposómica o salina. Así se ha podido ver la modificación de la piel al aplicarse las dos soluciones tanto a nivel superficial como en las diferentes profundidades del estrato córneo.

El grado de hidratación de la piel y de pérdida transepidérmica de agua a diferentes profundidades del estrato córneo se pueden observar en las figuras 1 y 2 respectivamente. En la figura 1 se puede destacar el aumento del grado de hidratación de la piel a medida que se profundiza en el estrato córneo, siendo el gradiente mucho más alto en los primeros *strips*, es decir, en las capas más externas. La similitud entre las dos curvas indica la poca influencia que ejerce la solución liposómica en el estado de hidratación de la piel. En la figura 2 se puede observar también un aumento en la pérdida transdérmica de agua a medida que se profundiza en el estrato córneo; sin embargo, en este caso el gradiente es mucho más marcado en los últimos *strips*, o sea, en las capas más internas del estrato córneo. También en este caso hay un paralelismo entre las dos curvas que corrobora la poca influencia que tienen los liposomas en la pérdida transdérmica del agua. De acuerdo con estos resultados, Kalia y cols. demostraron que el estrato córneo, membrana de estructura heterogénea, se comporta como una barrera homogénea frente al transporte de agua *in vivo*, y observaron su concordancia con la variación del valor de TEWL en función de la profundidad del estrato córneo, presentando un aumento más acusado después de eliminar 6-8 µm, es decir, en los *strips* más profundos, mientras que el aumento de la hidratación de la piel es más pronunciado en las capas más externas, que comprenden aproximadamente los primeros 4 µm¹¹.

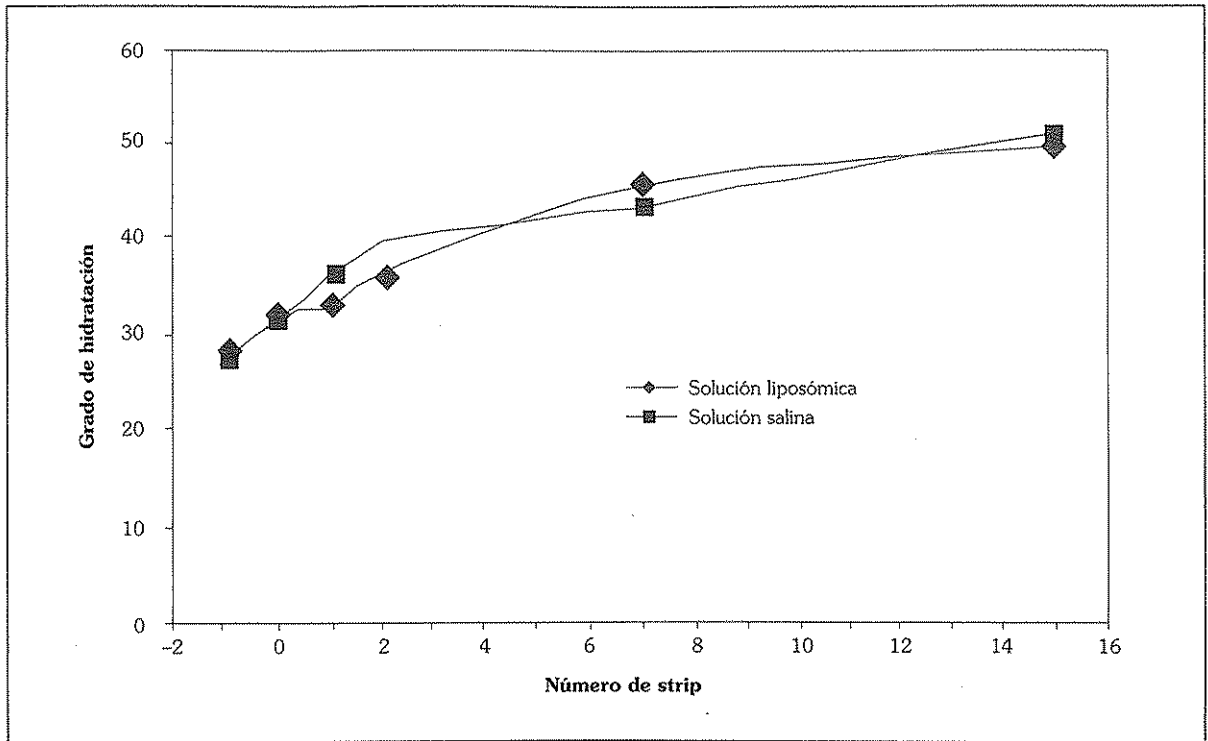


Figura 1. Dependencia del grado de hidratación del estrato córneo con la profundidad del mismo. Strip (-1) se asigna a la piel intacta.

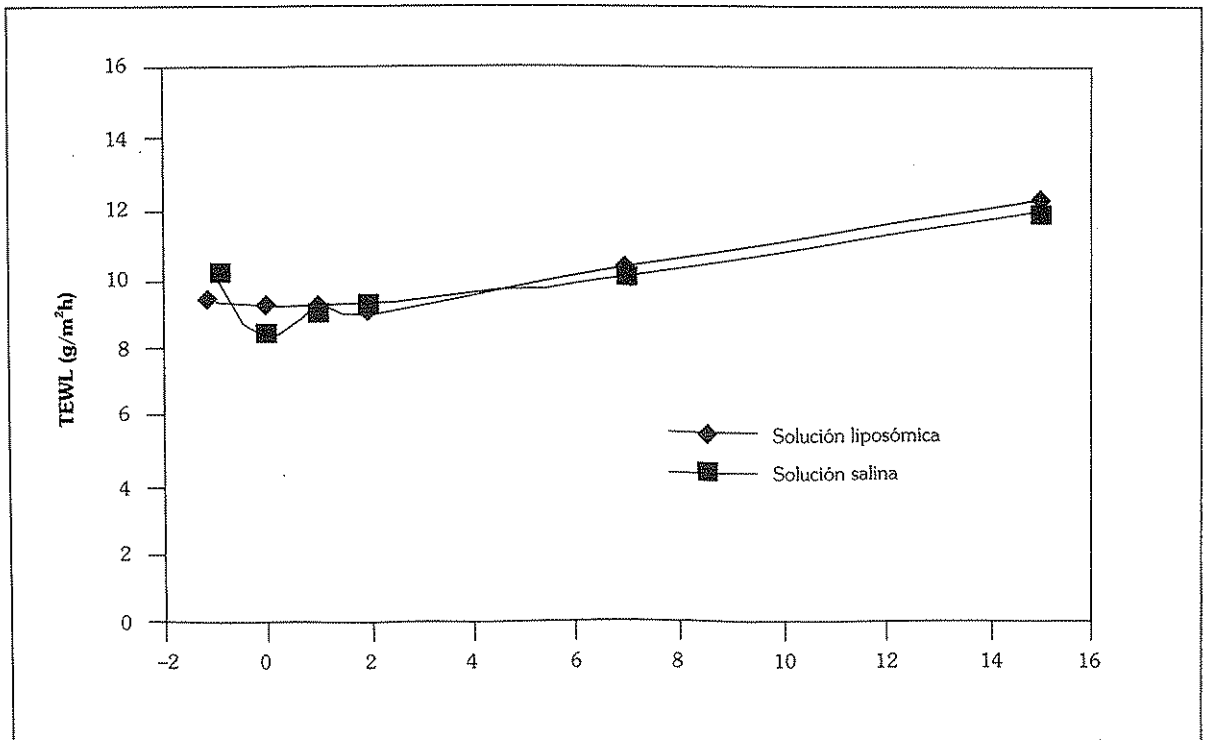


Figura 2. Variación de la pérdida transepidérmica de agua en función del número de strip. Strip (-1) se asigna a la piel intacta.

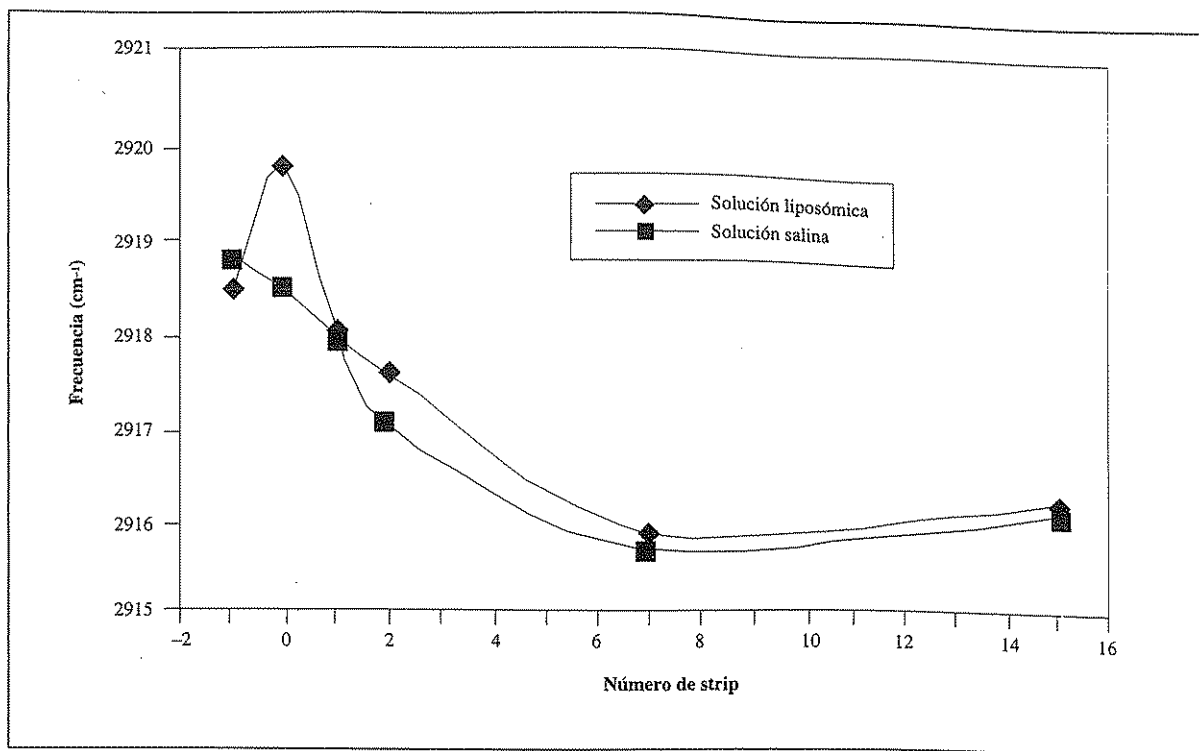


Figura 3. Variación de la frecuencia de vibración de tensión C-H asimétrica en función de la profundidad del estrato córneo. Strip (-1) se asigna a la piel intacta.

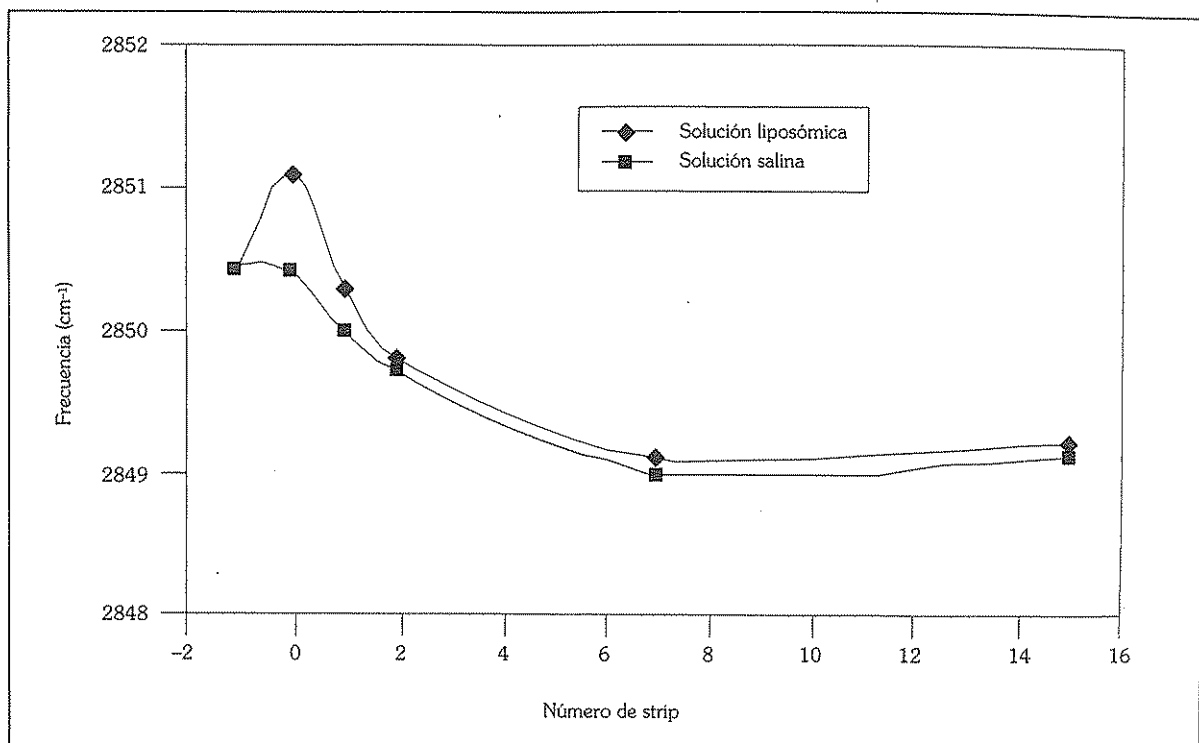


Figura 4. Variación de la frecuencia de vibración de tensión C-H simétrica en función de la profundidad del estrato córneo. Strip (-1) se asigna a la piel intacta.

Como se ha indicado en el apartado experimental, se estudiaron los espectros de FTIR de la piel en los diferentes estadios detallados anteriormente. Así, se hizo especial hincapié en las bandas de las vibraciones tanto de tensión como de flexión de los grupos CH_2 que indican el orden de las estructuras lipídicas a diferentes profundidades del estrato córneo.

Las medidas de las vibraciones de flexión, tanto la de tijera ($\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$) como la de balanceo en el plano ($\sim 720 \text{ cm}^{-1}$) se han utilizado como un método muy sensible para monitorizar cambios cualitativos intermoleculares en el empaquetamiento de los lípidos alquílicos. Así, cuando estas vibraciones sufren un acoplamiento que hace que se desdoble cada una en dos picos (tijera ~ 1.460 y 1.470 cm^{-1} y balanceo ~ 720 y 730 cm^{-1}), este hecho implica la presencia de una estructura cristalina ortorrómbica. Por el contrario, la ausencia de este acoplamiento sin desdoblamiento de picos implica la pérdida de este orden molecular apoyando la existencia de un estado de gel^{8, 11}. En nuestro caso se han estudiado estas zonas haciendo la segunda derivada de los espectros y se ha hallado para las diferentes aplicaciones, tanto a nivel superficial como a diferentes profundidades del estrato córneo, desdoblamiento de picos que implican la presencia en todos los casos de una ordenación de los lípidos del estrato córneo como una estructura cristalina ortorrómbica.

Las medidas de las vibraciones de tensión tanto asimétrica ($\sim 2.920 \text{ cm}^{-1}$) como simétrica ($\sim 2.850 \text{ cm}^{-1}$) se han utilizado para monitorizar cambios cualitativos intramoleculares en el orden conformacional de las cadenas de los lípidos alquílicos. Así, una conformación muy ordenada, con la mayoría de las cadenas alquílicas en conformación *trans*, da lugar a frecuencias más bajas, mientras que un aumento del desorden, debido a presencia de conformaciones *cis* desplaza la energía de estas vibraciones a frecuencias más altas¹¹. En nuestro caso se han estudiado estas zonas del espectro y los valores medios obtenidos para cada tipo de vibración en los diferentes estadios evaluados se han representado en las figuras 3 y 4.

En primer lugar, cabe resaltar en las dos figuras la disminución de las frecuencias a medida que se profundiza en el estrato córneo, lo que implica un aumento del orden de las estructuras lipídicas principalmente hasta el *strip* 7. Por otro lado, cabe destacar el marcado aumento de las frecuencias en el caso de la piel tratada con liposomas sobre todo a nivel muy superficial, manteniéndose ligeramente por encima en el interior del estrato córneo. En estudios realizados sobre la penetración percutánea de fluoresceína sódica encapsulada en el mismo tipo de liposoma, se obtuvieron resultados de penetración paralelos a los hallados en este estudio, lo que puede apoyar la teoría de que el mecanismo de penetración intensificado por liposomas es principalmente debido a una modificación estructural del estrato córneo¹². Así este significativo aumento de desorden y, por lo tanto, el incremento de la fluidez de las bicapas lipídicas más externas del estrato córneo explicarían el efecto de promotor de los liposomas en la absorción percutánea demostrado tanto por métodos *in vitro* como *in vivo*.

CONCLUSIONES

El estudio de las propiedades hidratantes de la piel a diferentes profundidades del estrato córneo indica el aumento marcado del grado de hidratación de la piel, sobre todo en las capas más externas, así como el aumento de la pérdida transepidérmica de agua al efectuar los *strips*, sobre todo en los más profundos. Cabe destacar el efecto inapreciable de la aplicación de una solución liposómica en estas propiedades.

La evaluación de las frecuencias de la vibración del CH-stretch es una medida del orden conformacional de las cadenas alquílicas de los lípidos del estrato córneo: a mayor frecuencia, mayor grado de libertad conformacional y mayor permeabilidad. Así, el grado de orden de los lípidos intercelulares aumenta a medida que se profundiza en el estrato córneo, manteniéndose casi constante a partir del séptimo *strip*. Este aumento del orden muy acusado en las capas más superficiales del estrato córneo se puede relacionar con el mayor grado de hidratación que aumenta notablemente a nivel superficial.

El estudio espectroscópico de la piel sometida a la aplicación de liposomas, tanto en su superficie como en las diferentes capas del estrato córneo (tras efectuar los diferentes *strippings*) permite determinar la modificación estructura de mayor desorden de los lípidos, sobre todo a nivel superficial, y relacionar este hecho con una variación en su permeabilidad obtenida en otros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

1. J.L. Parra y L. Pons «La Ciencia Cosmética. Bases fisiológicas y criterios prácticos». Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. (1995).
2. H. Schaefer y T.E. Redelmeier «Skin Barrier. Principles of Percutaneous Absorption». Ed. Karger. (1996).
3. O. Braun-Falcó, H. C. Korting y H. I. Maibach. «Liposome Dermatics» Spring. Verl., (1992).
4. A. Rougier, C. Lotte y H. I. Maibach, Proc. 17th IFSCC Congress, I, 490-510 (N. Y., 1990).
5. R.N.A.H. Lewis and R.N. McElhanye. «Infrared Spectroscopy of Biomolecules» Ed. H. H., Mantsch, and D. Chapman, pp 159-202, Wiley-Liss, Inc., New York (1996).
6. H.E. Boddé, L.A.R.M. Pechtold, M.T.A. Subnel and F.H.N. de Hann. «Liposome Dermatics» Eds. O. Braun-Falcó, H.C. Korting y H.I. Maibach. Spring. Verl., (1992), pp. 137-149.
7. R.O. Potts, V.H.W. Mark, R.H. Guy and M.L. Francoeur (1991) in «Skin Lipids» (Elias, P.M., Ed), Vol 24, pp 173-210. Academic Press, Inc., San Diego.
8. D.J. Moore, M.E. Rerek and R. Mendelsohn. (1997) Biochemical and Biophysical Research Communications, 231, 797-801.
9. M.T. Paternostre, M. Roux and J.L. Rigau. (1998) Biochemistry, 27, 2668-2677.
10. Y.N. Kalia, F. Pirot, and R.H. Guy (1996) Biophysical Journal, 71, 2692-2700.
11. C.L. Gay, Richard H. Guy, G.M. Golden, V.H.W. Mak, and M.L. Francoeur. (1994) J. Invest. Dermatol. 103:233-239.
12. L. Coderch, M. Oliva, M. Pons, A. de la Maza, A. M. Manich, J.L. Parra (1996). Int. J. Pharm., 139, 197-203.