



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

U. N. A. M.

U. N. A. M.

U. N. A. M.

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

Departamento de
Exámenes Profesionales

"EFECTO DEL OLEATO DE SACAROSA Y LAUREATO DE
SACAROSA SOBRE LA PERMEABILIDAD DEL ESTRATO
CORNEO HUMANO IN VIVO."

P U B L I C A C I O N

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

HILDA ADRIANA AYALA BRAVO

ASESOR: DRA. ADRIANA GANEM RONDERO

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

La Publicación: Efecto del oleato de sacarosa y laureato de sacarosa
sobre la permeabilidad del estrato corneo humano in vivo.

que presenta la pasante: Hilda Adriana Ayala Bravo
con número de cuenta: 9555619-6 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Junio de 2003.

PRESIDENTE	<u>J.O. Guadalupe Franco Rodríguez</u>	
VOCAL	<u>D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Adriana Ganem Rondero</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dr. David Quintanar Guerrero</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.en F.C. Cecilia Hernández Barba</u>	

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y permitirme estar hoy aquí.

A mis padres:

Mónica Bravo por ser una mujer ejemplar, por apoyarme en todo momento y por su cariño incondicional.

Joaquín Ayala † por que se que esta conmigo en cada paso que doy.

A mis hermanos y cuñados:

Guillermina, Laura, Alma, Norma, Juan, Nemesio y Antonio, por su ejemplo, por dar todo sin esperar nada a cambio, por estar conmigo en los momentos difíciles, por su compañía y sobre todo por estar juntos.

A mis sobrinos:

Janete, Yadira, Jacqueline, Jazmín y Marco Antonio, por existir y porque se que sus logros serán mejores.

A *todos* mis amigos:

Por los momentos compartidos, por estar cuando los he necesitado y por que lejos o cerca siempre serán parte de mi.... "*Forever QFB23*" y en especial a las que han compartido con migo esta última etapa de mi formación *Alma, Eli, Faby, Jovanna...*etc.

GRACIAS!!!

LOS QUIERO MUCHO

AGRADECIMIENTO

A mi familia por todo su apoyo.

Con respeto y admiración:

A mi asesora *Dra. Adriana Ganem* y al *Dr. David Quintanar*, por brindarme la oportunidad de trabajar con ustedes, por el gran apoyo para concluir este trabajo y sobre todo por su gran calidad humana.

A las personas que colaboraron como voluntarios en esta investigación: *Alma, Armando, Blanca, Dra. Adriana, Elizabeth, Erika, Fabiola, Luz Angélica, Miriam y Raúl*, por su valiosa ayuda y su disposición para realizar en ustedes muchas de las pruebas que requirió este trabajo.

A los *Drs. Aarti Naik, Yogeshvar N. Kalia* y *José M. Cornejo*, por su colaboración para terminar esta investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la *Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán* y a todos mis profesores, por contribuir a mi formación profesional.

*A todos ustedes
GRACIAS !!*

El trabajo de Investigación se realizó en el laboratorio L-323 de la

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
(TECNOLOGIA FARMACÉUTICA)**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

UNAM



ÍNDICE

	Página
Introducción	1
Objetivos	4
Carta de aceptación	5
Artículo original	6
Artículo traducido al español	13
Anexos	37

INTRODUCCION

Dentro de las opciones de titulación que brinda la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, está la llamada *Titulación por Publicación y Examen Oral*, con la cual se pretende aprovechar el arbitraje de una publicación en alguna revista nacional o internacional, avalando la calidad del trabajo.

El presente trabajo toma esta opción propuesta por la Facultad presentándose el artículo: **EFFECTS OF SUCROSE OLEATE AND SUCROSE LAUREATE ON *IN VIVO* HUMAN STRATUM CORNEUM PERMEABILITY**, aceptado para su publicación en la revista *Pharmaceutical Research*.

Para ello se determinó la interacción de los ésteres de sacarosa (oleato y laureato de sacarosa) con los componentes del estrato córneo (lípidos y proteínas) mediante dos pruebas biofísicas: Espectroscopía de Infrarrojo por transformadas de Fourier / Reflectancia de Total Atenuada (FTIR/ATR) y pérdida de agua transepidérmica (TEWL).

Por otro lado, se evaluó el efecto de los dos ésteres sobre el pasaje *in vivo* de 4-hidroxibenzonitrilo (4-HB), mediante la técnica de “tape stripping” y cuantificado por FTIR/ATR.

En esta publicación se reportan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de los ésteres de sacarosa sobre las propiedades de barrera del estrato córneo.

Los ésteres de sacarosa son sustancias que favorecen el incremento en la permeación membranal, llamados promotores de absorción, son capaces de disminuir de manera reversible la barrera de permeabilidad. Estudios realizados anteriormente sugieren que el movimiento de sustancias a través de epitelios estratificados como la piel, ocurre por difusión pasiva a través de los espacios intercelulares. Actualmente existe evidencia suficiente para pensar que la principal vía de entrada es la intercelular, esto es, a través de los lípidos que rodean a los corneocitos por lo que se considera que la principal barrera de permeabilidad está constituida por la matriz lipídica que llena éstos espacios.

Una de las limitaciones de ésta vía está asociada con la función de barrera del epitelio, lo cual restringe la cantidad absoluta de fármaco que puede ser absorbida a través de un área razonable por un cierto periodo de tiempo, por lo que éste método puede ser aplicado sólo para fármacos con una cierta potencia. La baja permeabilidad de la mayoría de las sustancias, ha guiado las investigaciones hacia la búsqueda de estrategias para favorecer su transporte, entre ellas podemos citar el uso de promotores de absorción, con los cuales se pretende aumentar de manera reversible la permeabilidad del tejido.

Los promotores abarcan un amplio rango de entidades químicas que van desde solventes como el agua, alcoholes, polioles, sulfóxidos, ácidos grasos, surfactantes, sales biliares, etc. Esta gran diversidad estructural ha dificultado la tarea de esclarecer el mecanismo de acción.

Actualmente, la investigación en éste campo se centra fundamentalmente en el estudio del mecanismo de acción de los promotores, lo que ha permitido evidenciar ciertas características estructurales necesarias para una mayor eficiencia y con ello, los estudios se han encaminado a la búsqueda de nuevos promotores más efectivos y al mismo tiempo menos irritantes, estos estudios se han realizado a través de la Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformadas de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR), que es una innovadora técnica que permite estudiar el efecto de promotores de absorción sobre los componentes membranales de la piel (lípidos y proteínas). Lo más interesante de ésta técnica es que los estudios pueden realizarse in vivo, lo cual refleja fielmente lo que ocurre en condiciones reales de aplicación de una formulación. La FTIR-ATR, junto con el TEWL (Transepidermal Water Loss) y el DSC (Calorimetría diferencial de barrido), constituyen actualmente las técnicas biofísicas más empleadas para elucidar el mecanismo de acción de las sustancias con acción promotora.

De acuerdo a los resultados del presente estudio, los ésteres de sacarosa empleados en este trabajo, prometen ser efectivos promotores, sobre todo el laureato al 2% en transcutoil, el cual presentó un efecto mayor como promotor de absorción, ya que con este se observaron mayores cambios en la estructura del epitelio, lo que nos indica que este promotor penetró causando cambios en la barrera del epitelio, evidenciándose con los espectros obtenidos después de tratar la piel con este promotor. Dicho efecto fue reversible ya que después de 4h

el espectro infrarrojo del estrato córneo tratado con el sucroester retomaba el perfil del espectro del estrato córneo no tratado. Así mismo se estudió la penetración del 4-HB a través de piel de voluntarios. El 4-HB es un compuesto modelo que absorbe a una longitud de onda tal, que los picos del estrato córneo en infrarrojo no interfieren. De éste modo, se evaluó el grado de penetración por la técnica “tape stripping” cuantificando directamente en las cintas con el FTIR / ATR.

Esto permitió evidenciar la acción de los promotores sobre la profundidad de penetración y la cantidad permeada de 4-HB.

Dentro de la estructura de este trabajo se presenta primeramente la carta de aceptación, posteriormente el escrito original seguido por la traducción de este trabajo al español y finalmente se anexan algunas evaluaciones previas (solubilidad, CMC), los resultados de espectroscopía de los sucroesteres, del estrato corneo sin tratar y tratado con los sucroesteres, así como la curva de calibración utilizada para cuantificar y algunos gráficos de TEWL.

OBJETIVOS

General:

- Evaluar el efecto *in vivo* de los ésteres de sacarosa sobre los componentes del estrato corneo utilizando Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier-Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) y pérdida de agua transepidermal (TEWL), así como sobre el transporte a través de la piel de 4-hidroxibenzonitrilo, mediante la técnica de “tape stripping”.

Particulares:

- Evaluar el efecto de dos ésteres de sacarosa (laureato y oleato) sobre la permeabilidad de la piel, empleando dos solventes (agua y Transcutol) y dos concentraciones (2 y 10% w/v).
- Determinar la acción de los dos ésteres de sacarosa sobre los lípidos del estrato corneo empleando la técnica de FTIR-ATR.
- Medir la pérdida de agua transepidermal (TEWL) al aplicar los SE, como un parámetro para evaluar la eficiencia de la barrera de permeabilidad.
- Realizar estudios de penetración *in vivo* empleando como molécula modelo el 4-hidroxibenzonitrilo, con el fin de determinar la influencia de los SE sobre su transporte a través de la piel.
- Con las pruebas biofísicas y de penetración realizadas contribuir al esclarecimiento del mecanismo de acción de los SE estudiados.

PHARMACEUTICAL RESEARCH

Kinam Park, Associate Editor
Akina, Inc.
Business & Technology Center
1291 Cumberland Ave., #E130
West Lafayette, IN 47906-1385

Tel: (765) 464-0390
Fax: (765) 464-0820
E-mail: kp@akinainc.com

An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists

March 12, 2003

Adriana Ganem-Quintanar
Rio Panuco 38
Colinas del Lago
Cuautitlan Izcalli
Estado de Mexico, 54744

Re: MS#02-0256: Effects of sucrose oleate and sucrose laurate on *in vivo* human stratum corneum permeability by Ayala-Bravo, Quintanar-Guerrero, Naik, Kalia, Comejo-Bravo, and Ganem-Quintanar.

Dear Dr. Ganem-Quintanar:

Thank you very much for revising the manuscript according to the reviewer's comments. I am now delighted to inform you that after a close analysis of your revised manuscript it can now be accepted for publication.

I would like to suggest the following editorial changes in your final paper.

1. Include page numbers.
2. Follow the *Pharmaceutical Research* format for references: Please follow the indications in the attached sheet entitled "Author's List" section 11. (i.e. references 1 and 4 should not have a space between volume number and page numbers, reference 3 should have volume number bolded, reference 15: no comma after name of journal, etc)
3. Please reduce the figure and table sizes. As a part of our efforts to maximize the space utilization of the journal, we ask all authors to reduce the size of figures and tables whenever possible. These can be prepared as a column size (which is 3.25-inch wide) or, if absolutely necessary, as a bi-column size (which is 6.75-inch wide). Please do not simply reduce the figure and table sizes by photocopier reduction. Symbols and letters should be large enough for easy reading. Please adjust the symbol and font sizes on your graphic program.

I am sorry to ask you to reduce the size of figures and tables, but this is the only way to save the valuable space of the journal, which has limited pages for each issue, and publish the manuscript within 3 months after acceptance.

I would like to receive three copies of your revised manuscript (with one set of original figures), a completed transfer of copyright form, and a computer disk or CD (with information on a word-processing software) within 60 days of receipt of this letter. It is the policy of *Pharmaceutical Research* that the revised manuscript will be considered as a new manuscript if it is not received within four months.

Thank you very much for submitting your manuscript to *Pharmaceutical Research* and look forward to receiving your revised manuscript soon.

Sincerely,



Kinam Park
kp/ps
Enclosures

Copy: Dr. Vincent H.L. Lee, Editor-in-Chief

Effects of Sucrose Oleate and Sucrose Laureate on *In Vivo* Human Stratum Corneum Permeability

Hilda A. Ayala-Bravo,¹ David Quintanar-Guerrero,¹ Aarti Naik,² Yogeshvar N. Kalia,² José M. Cornejo-Bravo,³ and Adriana Ganem-Quintanar¹

Received February 20, 2003; Accepted April 30, 2003

Purpose. The purpose of this work was to 1) investigate the effect of sucrose esters (sucrose oleate and sucrose laureate in water or in Transcutol®, TC) on the stratum corneum (SC) barrier properties *in vivo* and 2) examine the impact of these surfactant-like molecules on the *in vivo* percutaneous penetration of a model penetrant 4-hydroxybenzotriazole (4-HB).

Methods. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy and transepidermal water loss measurements were used to evaluate the sucrose oleate- and sucrose laureate-induced biophysical changes in SC barrier function *in vivo*. In addition, the effect of the enhancers on 4-HB penetration was monitored *in vivo* using ATR-FTIR spectroscopy in conjunction with tape-stripping of the treated site.

Results. Treatment of the skin with 2% sucrose laureate or sucrose oleate in TC significantly increased the extent of 4-HB penetration relative to the control. Furthermore, when skin treated with these formulations was examined spectroscopically, the C-H asymmetric and symmetric stretching bands of the lipid methylene groups were characterized by 1) decreased absorbances and 2) frequency shifts to higher wavenumbers. These effects on the SC lipids and 4-HB penetration were more pronounced for sucrose laureate when combined with TC.

Conclusions. A combination of sucrose esters (oleate or laureate) and TC is able to temporally alter the stratum corneum barrier properties, thereby promoting 4-HB penetration. These molecules are worthy of further investigation as potential candidates for inclusion in transdermal formulations as penetration enhancers.

KEY WORDS: skin penetration; penetration enhancement; sucrose esters; ATR-FTIR; transepidermal water loss.

INTRODUCTION

Among the most commonly studied enhancers for skin application are surfactants and bile salts. Typically, both cationic and anionic surfactants are more potent enhancers than their nonionic counterparts, but they are also more toxic.

Nonionic surfactants, which are less irritating, have been shown to increase the absorption of numerous drugs (1–6) and are widely used in dermatological products and cosmetics.

Surfactants have been shown to influence skin permeability in a number of ways. Many surfactants penetrate into the skin and act directly on skin components, sometimes inducing a loss of membrane integrity, e.g., by lipid or protein extraction or by protein denaturation. The penetration-enhancing ability of a surfactant is dependent not only on its interaction with membrane components but also on its concentration (7,8). At concentrations below the critical micelle concentration (CMC), higher levels of surfactant monomers are available to penetrate the skin and increase permeability (2,7). In addition, if the drug is solubilized by the surfactant micelle, transport of the active species may be reduced as a result of an unfavorable micelle/vehicle partition coefficient and lower thermodynamic activity. The nature of the vehicle also plays an important role in the interaction between the surfactant, the drug and the skin. Not only may the presence of a cosolvent change the solubility of a solute, altering its activity and consequently the skin/vehicle partition coefficient (1), but it may also promote the absorption of a surfactant into the skin (2), favoring the interaction of the surfactant with the stratum corneum lipids. Sarpotdar and Zatz (2,3) demonstrated that the effect of polysorbates on lidocaine and hydrocortisone penetration through the skin, was significantly enhanced when the content of propylene glycol was increased.

Structural parameters, such as chain length, degree, and position of unsaturation, and the nature of substituents can influence the ability of surfactants to act as skin penetration enhancers. It is well accepted that a linear alkyl chain of 12 carbon atoms maximizes the effect of a surfactant on membrane permeability. The C₁₂ chain has an intermediate oil/water solubility and is able to penetrate the lipid bilayer (1,6,9). Among a series of polyoxyethylene ethers, the lauryl (C₁₂) ether was reported to be the most effective enhancer for ibuprofen, followed by oleyl (C₁₈) ether (6). Although saturated C₁₈ fatty acid analogues (e.g., stearic acid) have been shown to be ineffective, numerous reports agree on the disrupting effect of oleic acid, a monounsaturated C₁₈ fatty acid, particularly on the stratum corneum lipid domains (7,10–13). It has been proposed that oleic acid induces phase separation, thus reducing membrane resistance (14,15).

Sucrose fatty acid esters (SE), which are nonionic surfactants with a sucrose substituent as the polar head group (Fig. 1), have also recently been investigated as enhancers. (Fig. 1) For a series of SE tested, only the sucrose laureate was found to increase the passage of lidocaine hydrochloride through buccal and palatal mucosae (16). SE are nontoxic and biodegradable surfactants approved by FAO/WHO as food additives (5). Because they are nonirritants to skin, they are suitable not only for foods but also for therapeutic and cosmetic applications (5,17). Their application in dermatology has been further accentuated by the ability of some SE, such as laurate and ricinoleate, to form liquid crystals and microemulsions (5,18,19).

Biophysical evidence on the extent and duration of the effect of an enhancer can be provided through measurements

¹ División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan/Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México 54704.

² Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Enseignement, F-74160 Archamps, France.

³ Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Calzada Universidad, Mesa de Otay, 22300, Tijuana B.C., México

⁴ To whom correspondence should be addressed. Av. 1° de Mayo s/n, Infonavit Centro, Cuautitlán Izcalli, Estado de México. (e-mail: quintana@servidor.unam.mx ; ganemq@hotmail.com)

of transepidermal water loss (TEWL) and attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. TEWL has been shown to be useful in assessing macroscopic changes in the functional state of the skin barrier and contributes to the prediction of percutaneous penetration (20,21). However, ATR-FTIR allows conformational changes in stratum corneum lipid and protein domains to be detected, and has proved to be a useful tool for monitoring the percutaneous penetration of drugs or other constituents such as cosolvents and enhancers (11,12,21–24). TEWL and ATR-FTIR share the advantage of being noninvasive and enabling experiments to be conducted *in vivo*, in human subjects.

The aim of this study was to evaluate in human skin *in vivo* 1) the effect of two SEs, sucrose oleate and sucrose laureate, on skin barrier function and 2) to examine the impact of these nonionic surfactants on the percutaneous penetration of 4-hydroxybenzoinitrile (a model penetrant), which was selected on the basis of its intense C≡N stretching absorbance at 2230 cm^{-1} , permitting it to be monitored by ATR-FTIR spectroscopy.

MATERIALS AND METHODS

4-hydroxybenzoinitrile (4-HB) was purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Transcutol® (TC) was a gift from Gattefossé (Saint-Priest, France). Sucrose oleate (O, Ryoto Sugar Ester® O-1570) and sucrose laureate (L, Ryoto Sugar Ester® L-1695) were generously donated by Selectchemie AG (Zürich, Switzerland). Scotch® Book Tape 845 was purchased from 3M (St. Paul, MN, USA). Aqueous solutions were prepared using deionized water supplied by a Milli-Q water purification system (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

Treatment of the Skin

Six healthy adults (female, aged 20–30 years) who were receiving no medication and had no history of skin disease participated in the study (approved by the local ethics committee) after giving their written consent. During the study, volunteers were required to maintain the experimental skin sites on the midventral forearm free from application of any skin care products. The skin sites were gently cleansed with water and dried using a gauze pad. Immediately thereafter, the subjects were dosed topically with the following solutions: 2% w/v or 10% w/v of O or L in water or in TC. Transcutol, a monoethyl ether of diethylene glycol (Fig. 1), was chosen because of its well-known ability to increase drug solubility in the skin (25). A volume of 1.5 mL of the formulations was applied via filter paper (11.5 × 4.5 cm), which was affixed to the skin with an occlusive film. At the end of the application period (1 h), the filter paper was removed and the skin surface was wiped clean with a water-soaked cotton ball and dried gently with a gauze pad. The application site was delineated with a felt-tip marker to allow repositioning of the area for each measurement. Each subject was treated with the complete array of formulations. ATR-FTIR spectra and TEWL measures were recorded before treatment, post-treatment (approx. 5 min after the cleansing) and then periodically (each hour) over the next 4 h.

Effect of SE on the *In Vivo* Penetration of 4-HB

In a separate series of experiments, the application site was pretreated topically with either the L or O solutions, in

water or in TC (2 and 10% w/v), for 1 h (following the procedure described above). After this pretreatment, the skin surface was wiped clean with a water-soaked gauze pad and 1.5 mL of a saturated aqueous solution of 4-HB was applied to the skin via a segment of filter paper (11.5 × 4.5 cm) attached with an occlusive film. After 1 h, the skin surface was cleansed with water and dried. To determine the distribution of 4-HB across the stratum corneum, IR spectra of the dosed site were recorded and 16 sequential tape-strippings were obtained using Scotch® Book Tape No. 845 (3M). An infrared spectrum was obtained for each tape. The amount of 4-HB in each tape-strip was quantified spectroscopically by virtue of the intense C≡N stretching absorbance of 4-HB at 2230 cm^{-1} . A calibration curve was constructed by adding known amounts of 4-HB to tapes (with stratum corneum) before recording a spectrum. Each tape was analyzed 10 times. The penetration depth of 4-HB was calculated assuming a constant tape-stripped area and a density of approximately 1 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ for the stripped stratum corneum. In this way, the mass of stratum corneum removed (determined by weighing the tapes before and after stripping), was converted to the depth of SC sampled (mass of SC = area × depth × density).

ATR-FTIR Spectroscopy

FTIR spectra were recorded using a Shimadzu FTIR-8300 spectrophotometer (Kyoto, Japan) equipped with a trapezoidal ATR crystal (80 × 10 × 4 mm, 45° bevel). Each measurement represented an average of 45 scans with a resolution of 1 cm^{-1} . To determine the effect of the SE, the frequencies and intensities of the peaks assigned to the C-H₂ symmetric and asymmetric stretching vibrations of the stratum corneum lipid alkyl chains (approx. 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} , respectively) were examined in the acquired spectra.

TEWL Measurements

TEWL was measured with a Tewameter TM 210 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany), with a resolution of 0.1 $\text{g}/\text{h}\cdot\text{m}^2$, in accordance with recommended guidelines (26). Measurements were carried out in a ventilated Plexiglas chamber, and volunteers remained undisturbed and relaxed during the experiment to avoid erratic fluctuations in TEWL.

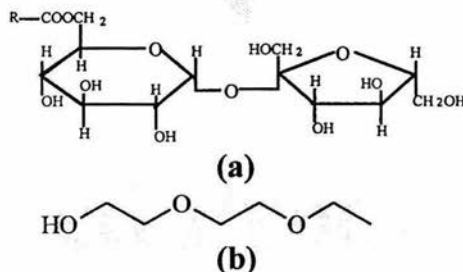


Fig. 1. Chemical structures of (a) sucrose monoester [R = fatty acid] and (b) Transcutol (diethylene glycol monoethyl ether).

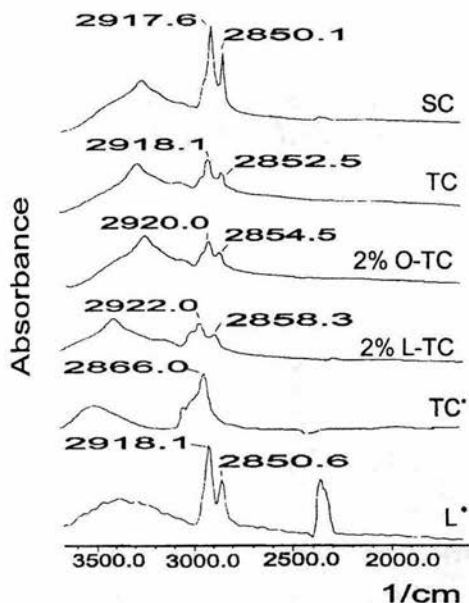


Fig. 2. Representative ATR-FTIR spectra in the spectral range 3500–2000 cm^{-1} for skin treated with Transcutol (TC), 2% O-TC, and 2% L-TC. For comparison, the spectra of untreated stratum corneum (SC), neat TC (TC*) and neat sucrose laurate (L*) are also shown. The IR spectrum of sucrose oleate (not shown) is very similar to that of sucrose laurate.

Surface Tension Measurements

The surface tension of the solutions were determined using the Wilhelmy-Noty method. Distilled water was used as a reference standard.

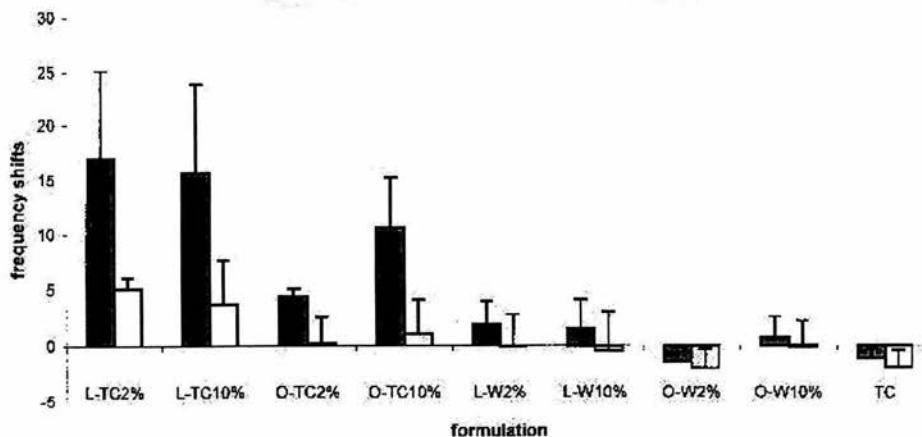


Fig. 3. Frequency shifts of the C-H₂ symmetric (■) and asymmetric (□) stretching vibrations of the stratum corneum lipid acyl chains ($n = 6$). L, laurate; O, oleate; TC, Transcutol; W, water.

Statistics

The results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Student's *t* test or analysis of variance was performed to test the level of significance. Duncan's procedure for the separation of means was used to locate the source of the difference when a significant *F* value was found.

RESULTS AND DISCUSSION

As discussed earlier, surfactants may enhance drug transport by a number of mechanisms. First, they may partition into the intercellular domains and possibly increase fluidity and/or extract barrier lipids. Second, they may penetrate into the corneocytes and disrupt the keratin filament network, thereby rendering the corneocytes more permeable (6). In the case of SE, the potential exists for their long hydrocarbon chain (Fig. 1) to be inserted between the lipophilic tails of the bilayer, allowing the sucrose ring to interact with the polar head groups of the lipids. To probe the effect of SE on the barrier properties of the stratum corneum, treated SC was examined *in vivo* by ATR-FTIR. Of particular interest in lipid studies are the IR absorbances originating from the C-H₂ symmetric and asymmetric stretching vibrations of the stratum corneum lipid alkyl chains (approx. 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} , respectively). The ATR-FTIR spectra of the stratum corneum treated for 1 h with 2% SE in Transcutol are illustrated in Fig. 2. As seen in the spectra, treatment with 2% L-TC and 2% O-TC resulted in a significant decrease in the area and height of these peaks. Indeed, subsequent to treatment with 2% L-TC, the lipid absorbances almost entirely disappear. This observation suggests that the 2% SE/TC formulations are able to interact with the lipid structures, resulting in lipid dissolution and extraction from the SC (21). In contrast, when the skin was treated with aqueous or TC formulations containing 10% SE, this phenomenon was not observed (data not shown). Although treatment with TC alone showed a decrease in the height of these peaks (Fig. 2), the effect was not as marked as with the 2% SE-TC solutions.

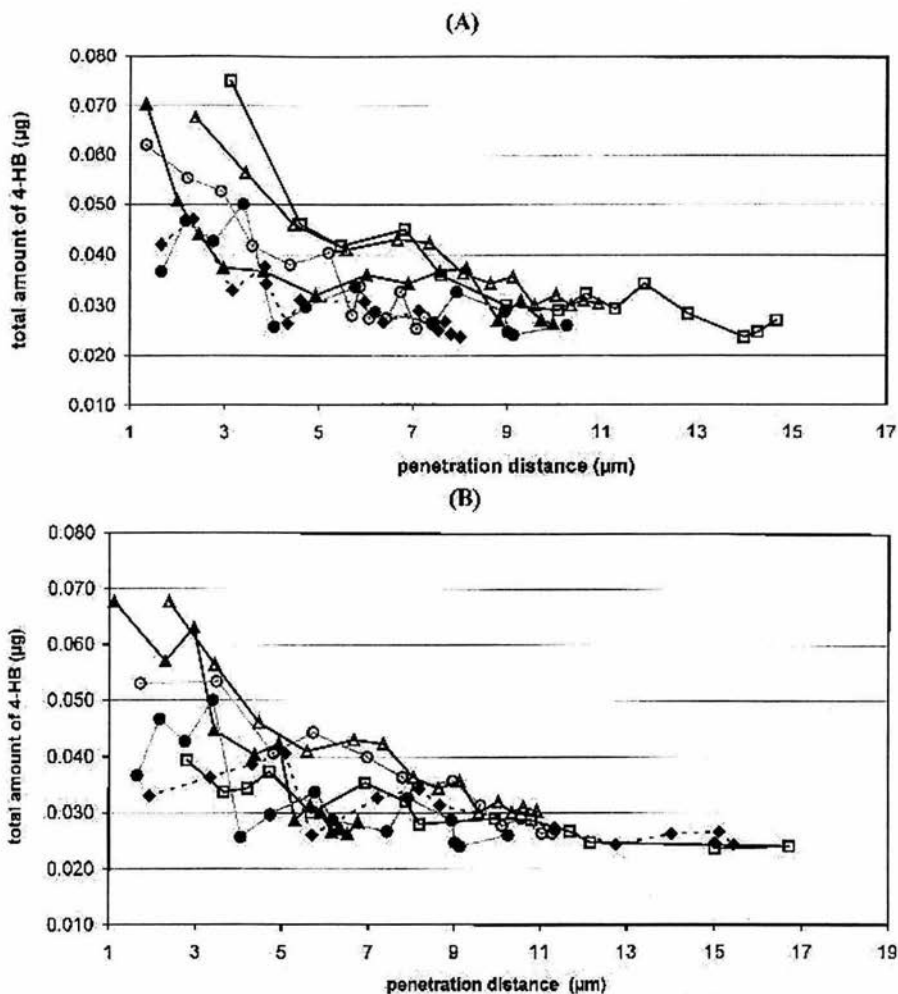


Fig. 4. Distribution profiles of 4-HB as a function of SC depth after treatment with either (A) oleate or (B) laureate: 2% in water (O) or in Transcutol (□); 10% in water (▲) or in Transcutol (◆). Transcutol (Δ); control (•).

Furthermore, treatment with SE-TC formulations caused the C-H₂ symmetric and asymmetric stretching vibrations to shift toward higher wavenumbers, relative to the untreated stratum corneum (Fig. 3). Treatment with 2% L-TC produced a marked shift of the asymmetric stretching frequency compared to the control ($t = 3.876$; $t_{0.05/2.5} = 2.57$), which was not mirrored by the aqueous solutions or TC alone. However, the C-H₂ symmetric stretching frequency demonstrated a blue shift with all the SE-TC solutions, but as shown in Fig. 3, the shift was greater with 2 and 10% L-TC solutions. Indeed, analysis of variance and Duncan's procedure revealed significant differences ($p < 0.05$) between 2 and 10% L-TC formulations when compared with the control, the aqueous solutions, TC alone, and the O-TC formulations. No significant

differences were found when comparisons were made between the control, aqueous solutions, TC, and 2 and 10% O-TC formulations. In some instances, treatment with SE-TC provoked the appearance of a shoulder on the symmetric stretching band at 2850 cm^{-1} , which was probably associated with the incorporation of the SE into the stratum corneum. Although the methylene stretching absorbances of the formulation components themselves are expected to contribute to the total absorbance, and consequently to the measured frequency shifts (particularly to higher wavenumbers), these contributions may be assumed to be negligible based on two observations. First, the C-H₂ stretching frequencies of the excipients are not greater than those of the SC lipids, and second, given that SE solutions of higher concentrations

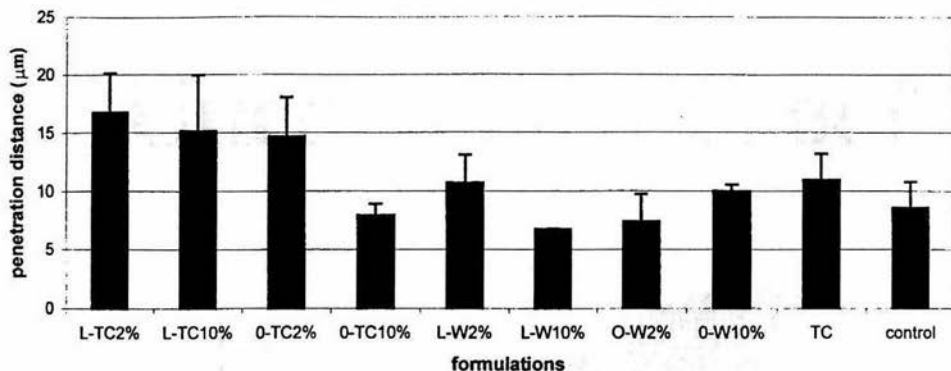


Fig. 5. Effect of SE on the penetration distance of 4-HB ($n = 3$). L, laureate; O, oleate; TC, Transcutol; W, water.

(10% w/v) did not induce a hypsochromic shift, it is extremely unlikely that the marked response at lower concentrations (2% w/v) originates from the intrinsic absorbances of the excipients.

The temporal nature of these frequency shifts was monitored by recording spectra hourly over the subsequent four hours. The results demonstrated that the frequency shifts were reversible, with peaks returning to their original values after 3 h. It has been reported that shifts in these frequencies reflect increased lipid fluidity and an increase in the proportion of *gauche* conformers along the lipid hydrocarbon chains (27).

TEWL increased transiently immediately after removal of the protective film at the end of the application period, an observation which can be attributed to the evaporation of water after occlusion. However, none of the formulations caused a sustained increase in water loss, and no significant difference was found between the control value and that subsequent to treatment with any of the formulations (approx. 9–13 g/hm^2). Despite the alterations observed in the FTIR spectra, TEWL remained unaltered for all the tested formulations.

One objective of our study was to investigate the relationship between the degree of stratum corneum disruption

induced by the SE and permeant (4-HB) penetration. 4-HB distribution profiles as a function of stratum corneum depth are depicted in Fig. 4. As shown, the depth of 4-HB penetration was modest when delivered from aqueous media. However, combination of TC and SE resulted in an increased extent of penetration, particularly at a concentration of 2%. Figure 5 presents the total penetration distance of 4-HB for the skin treated with SE in aqueous solutions and in TC. Analysis of variance of these results followed by Duncan's test revealed significant differences between 2% L-TC and the control ($F = 5.33$; $F_{0.05/2,9,20} = 2.39$). These findings are consistent with the IR spectroscopic data presented earlier, which did not indicate SC lipid modification when the skin was treated with aqueous SE formulations, but a distinct lipid fluidization in the presence of SE-TC. These results are also consistent with previous reports demonstrating that skin penetration was significantly enhanced from solvent-water mixtures (e.g., mixtures of propylene glycol (2,3), isopropyl alcohol; Ref. 28) containing a high proportion of solvent. Ganem-Quintanar *et al.* (25) have previously demonstrated that TC diffuses through the stratum corneum, establishing a constant flux within two hours. The synergistic enhancement observed between SE and TC can therefore probably be attributed to the facilitated surfactant absorption by the stratum corneum

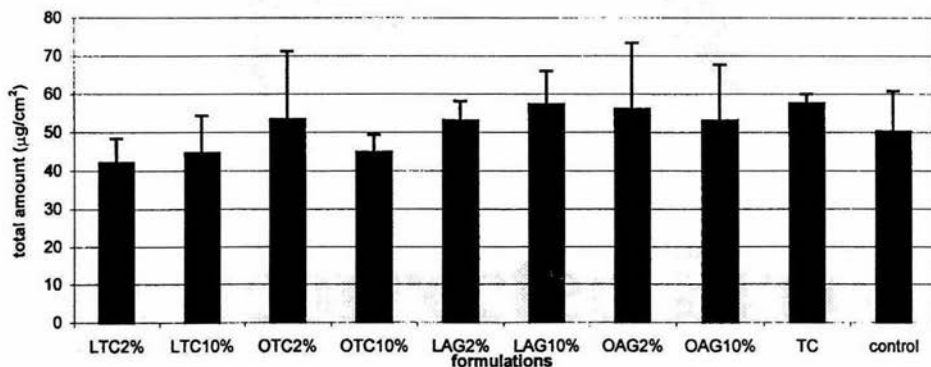


Fig. 6. Total penetrated amount of 4-HB per unit area of stratum corneum ($n = 3$). L, laureate; O, oleate; TC, Transcutol; W, water.

Table I. Critical Micelle Concentration for Sucrose Laureate and Sucrose Oleate in Water and in Transcutol

Sugar ester	Solvent	
	Water	Transcutol
Sucrose laureate	0.05%	3%
Sucrose oleate	0.01%	3%

in the presence of TC. Figure 6 illustrates the total amount of 4-HB determined in the tapes, representing the quantity that penetrated through the stratum corneum. The results suggest that after an application of 1 h, the total amount of 4-HB detected in the SC is independent of the formulation. However, as summarized in Fig. 5, the extent to which the molecule penetrates is clearly influenced by the formulation, being enhanced by the incorporation of SE-TC.

CMC, as determined by surface tension measurements, rose dramatically when TC was used as the solvent. As presented in Table I, whereas in aqueous solution the CMC values were 0.05% and 0.01% for L and O, respectively, in TC the CMC increased to 3% for the two sugar esters. These results are in agreement with previous studies where propylene glycol was shown to increase the CMC of non-ionic surfactants (2,3,29). The ATR-FTIR data presented here are consistent with the concentration-dependent permeation behavior of surfactants and support the assumption that the monomer is preferentially transported across the SC (2,3,30) given that the maximal lipid-disruption was achieved by 2% SE-TC formulations at concentrations below the CMC. Moreover, despite 5-fold higher SE levels, the 10% SE formulations (concentrations above the CMC) did not produce a corresponding increase in 4-HB permeation.

CONCLUSIONS

We have demonstrated that penetration of 4-HB, a model permeant ($M_w = 119.12$; $\text{Log}K_{ow} = 1.56$, water solubility = 10.25 mg/mL) is enhanced in the presence of SE and TC. It is apparent that TC and SE interact synergistically to modify the skin barrier and to promote the penetration of 4-HB. Of the two SEs evaluated, the laureate ester, in combination with TC, was significantly more effective than its oleate analogue. These relatively innocuous nonionic surfactant molecules justify further investigation as potential candidates for inclusion in transdermal formulations as penetration enhancers.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge financial support of this work by CONACYT (Ref. J32593-M) and PAPIIT (Ref. IN214000). We would like to thank Draucin Jiménez-Celi for his skillful technical assistance.

REFERENCES

1. P. Ashton, J. Hadgraft, and K. A. Walters. Effects of surfactants in percutaneous absorption. *Pharm. Acta Helv.* **61**:228-235 (1986).
2. P. P. Sarpotdar and J. L. Zatz. Evaluation of penetration enhancement of lidocaine by nonionic surfactants through hairless mouse skin in vitro. *J. Pharm. Sci.* **75**:176 (1986).
3. P. P. Sarpotdar and J. L. Zatz. Percutaneous absorption enhancement by nonionic surfactants. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **12**:1625-1647 (1986).
4. W. Bialik, K. A. Walters, K. R. Brain, and J. Hadgraft. Some factors affecting the in vitro penetration of ibuprofen through human skin. *Int. J. Pharm.* **92**:219-223 (1993).
5. M. A. Thevenin, J. L. Grossiord, and M. C. Poelman. Sucrose esters/cosurfactant microemulsion systems for transdermal delivery: assessment of bicontinuous structures. *Int. J. Pharm.* **137**:177-186 (1996).
6. E.-S. Park, S.-Y. Chang, M. Hahn, and S.-Ch. Chi. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. *Int. J. Pharm.* **209**:109-119 (2000).
7. S. B. Ruddy. Surfactants. In E. W. Smith and H. I. Maibach (eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers*, CRC Press, Inc., Florida, 1995 pp. 245-257.
8. A. Ganem-Quintanar, Y. N. Kalia, F. Falson-Rieg, and P. Buri. Mechanisms of oral permeation enhancement. *Int. J. Pharm.* **156**:127-142 (1997).
9. K. A. Walters. Surfactants and percutaneous absorption. In R. C. Scott, R. H. Guy and J. Hadgraft (eds.), *Prediction of Percutaneous Penetration*, IBC, London, 1990 pp. 148-162.
10. Y. Takeuchi, H. Yasukawa, Y. Yamaoka, Y. Kato, Y. Morimoto, Y. Fukumori, and T. Fukuda. Effects of fatty acids, fatty amines and propylene glycol on rat stratum corneum lipids and proteins in vitro measured by Fourier transform infrared/attenuated total reflection (FT-IR/ATR) spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.* **40**:1887-1892 (1992).
11. V. H. W. Mak, R. O. Potts, and R. H. Guy. Oleic acid concentration and effect in human stratum corneum: Non-invasive determination by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *J. Control. Release* **12**:67-75 (1990).
12. V. H. W. Mak, R. O. Potts, and R. H. Guy. Percutaneous penetration enhancement in vivo measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Pharm. Res.* **7**:835-841 (1990).
13. B. J. Aungst. Fatty acids as skin permeation enhancers. In E. W. Smith and H. I. Maibach (eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers*, CRC Press, Inc., Florida, 1995 pp. 277-287.
14. B. Ongpipattanakul, M. L. Francoeur, and R. O. Potts. Polymorphism in stratum corneum lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**:115-122 (1994).
15. A. Naik, L. A. R. M. Pechtold, R. O. Potts, and R. H. Guy. Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement in vivo in humans. *J. Control. Release* **37**:299-306 (1995).
16. A. Ganem-Quintanar, D. Quintanar-Guerrero, F. Falson-Rieg, and P. Buri. Ex vivo oral mucosal permeation of lidocaine hydrochloride with sucrose fatty acid esters as absorption enhancers. *Int. J. Pharm.* **173**:203-210 (1998).
17. Mitsubishi-Kasei Food Corporation. Japan, Ryoto Sugar Ester Technical Information, 1987.
18. D. Tambini, M. F. Bobin, and M. C. Martin. Etude physico-chimique des sucroesters. *Essais de valorisation. Pharm. Belg.* **48**:19-26 (1993).
19. L. Lehmann, S. Keipert, and M. Gloor. Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**:129-136 (2001).
20. K. Abrams, J. D. Harvell, D. Shriner, P. Wertz, H. Maibach, H. I. Maibach, and S. J. Rehfeld. Effect of organic solvents on in vitro human skin water barrier function. *J. Invest. Dermatol.* **101**:609-613 (1993).
21. A. K. Levang, K. Zhao, and J. Singh. Effect of ethanol/propylene glycol on the in vitro percutaneous absorption of aspirin, biophysical changes and the macroscopic barrier properties of the skin. *Int. J. Pharm.* **181**:255-263 (1999).
22. M. A. Pellett, A. C. Watkinson, J. Hadgraft, and K. R. Brain. Comparison of permeability data from traditional diffusion cells and ATR-FTIR spectroscopy. Part II. Determination of diffusional pathlengths in synthetic membranes and human stratum corneum. *Int. J. Pharm.* **154**:217-227 (1997).
23. M. Dias, S. L. Raghavan, and J. Hadgraft. ATR-FTIR spectroscopic investigations on the effect of solvents on the permeation of benzoic acid and salicylic acid through silicone membranes. *Int. J. Pharm.* **216**:51-59 (2001).
24. K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y. N. Kalia, and R. H. Guy.

- Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**:103-112 (2001).
25. A. Ganem-Quintanar, C. Lafforgue, F. Falson-Rieg, and P. Buri. Evaluation of the transepidermal permeation of diethylene glycol monoethyl ether and skin water loss. *Int. J. Pharm.* **147**:165-171 (1997).
 26. V. Rogiers and D. Roseeuw. TEWL measurements in patch test assessment: The need for standardisation. *Second International Symposium on Irritant Contact Dermatitis (ISICD)*, Zurich, April 14-16 (1994).
 27. H. L. Casal and H. H. Mantsch. Polymorphic phase behavior of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **779**:381-401 (1984).
 28. V. Shahi and J. L. Zatz. Effect of formulation factors on penetration of hydrocortisone through mouse skin. *J. Pharm. Sci.* **67**:789-792 (1978).
 29. E. J. French, C. W. Pouton, and G. Steele. Fluidisation of distearylphosphatidylcholine bilayers by nonionic surfactants of single ethoxy chain length. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**:38P (1988).
 30. U. G. Dalvi and J. L. Zatz. Effect of nonionic surfactants on penetration of dissolved benzocaine through hairless mouse skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **32**:87-94 (1981).

EFFECTO DEL OLEATO DE SACAROSA Y LAUREATO DE SACAROSA SOBRE LA PERMEABILIDAD DEL ESTRATO CORNEO HUMANO *IN VIVO*.

Hilda A. Ayala-Bravo,¹ David Quintanar-Guerrero,¹ Aarti Naik,² Yogeshvar N. Kalia,² José M. Cornejo-Bravo³ y Adriana Ganem-Quintanar¹

¹ *División de Estudios de Posgrado (Tecnología Farmacéutica), Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan/Universidad Nacional Autónoma de México, Av. 1° de Mayo s/n, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México 54704*

² *Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Enseignement, F-74160 Archamps, France*

³ *Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Calzada Universidad, Mesa de Otay, 22300, Tijuana B.C., México*

Encabezado: Efecto de los ésteres de sacarosa sobre el estrato corneo humano *in vivo*.

Resumen

Propósito. (a) Investigar el efecto de los ésteres de sacarosa (oleato de sacarosa y laureato de sacarosa en agua y en Transcutol sobre las propiedades de barrera del estrato corneo (SC) *in vivo*, (b) examinar el impacto de estos surfactantes sobre la penetración percutánea *in vivo* de 4-hidroxibenzonitrilo (4HB), como modelo de molécula penetrante.

Métodos. Se hicieron medidas *in vivo* por Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier / Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR) y pérdida de agua transepidermal (TEWL) con el fin de evaluar los cambios biofísicos inducidos por el oleato de sacarosa y laureato de sacarosa, en la función de barrera del SC . Además, se monitoreó el efecto de los promotores sobre la penetración *in vivo* del 4-HB, usando espectroscopía FTIR-ATR en combinación con “tape-stripping” del sitio tratado.

Resultados. El tratamiento de la piel con laureato de sacarosa u oleato de sacarosa al 2% en Transcutol (TC) incrementó significativamente el grado de penetración del 4-HB con respecto al control. Además, cuando la piel tratada con estas formulaciones se examinó espectroscópicamente, las bandas de estiramiento asimétricas y simétricas de los grupos C-H de los grupos metileno de lípidos se caracterizaron por (a) disminución de las absorbancias y (b) desplazamiento de las frecuencias hacia números de onda mayores. Estos efectos en los lípidos del SC y la penetración del 4-HB, fueron más pronunciados para laureato de sacarosa cuando se combinó con TC.

Conclusiones. Una combinación de ésteres de sacarosa (oleato o laureato) y TC puede alterar temporalmente las propiedades de barrera del estrato corneo, promoviendo de este modo la penetración del 4-HB. Estas moléculas son dignas de futuras investigaciones como candidatas potenciales para incluirlas como promotores de penetración transdérmica.

Palabras clave: penetración en piel; incremento en la penetración; ésteres de sacarosa; ATR-FTIR; pérdida de agua transepidermal.

Introducción

Entre los promotores más comúnmente estudiados para la aplicación en piel están los surfactantes y sales biliares. Generalmente, los surfactantes catiónicos y aniónicos son promotores más potentes que sus contrapartes no iónicos, aunque son también más tóxicos. Los surfactantes no iónicos, los cuales son menos irritantes han mostrado aumentar la absorción de numerosos fármacos (1-6) y son ampliamente usados en productos dermatológicos y cosméticos.

Los surfactantes han mostrado tener una influencia en la permeabilidad de la piel actuando de diversas formas. Muchos surfactantes penetran en la piel y actúan directamente sobre los componentes de la piel, algunas veces induciendo la pérdida de la integridad de la membrana, por ejemplo por extracción de lípidos o proteínas o por desnaturalización de proteínas.

La habilidad de un surfactante para incrementar la penetración depende no solo de su interacción con los componentes de la membrana, si no también de su concentración (7-8). Con concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica (CMC), se tienen cantidades mayores de monómeros de surfactante disponibles para penetrar en la piel e incrementar la permeabilidad (2,7). Además, si el fármaco se solubiliza por las micelas del surfactante, el transporte de las especies activas pueden reducirse como resultado de un coeficiente de partición micela/vehículo desfavorable y una menor actividad termodinámica. La naturaleza del vehículo también juega un papel importante en la interacción entre el surfactante, el fármaco y la piel. La presencia de un cosolvente puede no sólo cambiar la solubilidad de un soluto, alterando su actividad y consecuentemente el coeficiente de partición piel/vehículo (1) sino que puede también promover la absorción de un surfactante en la piel (2), favoreciendo la interacción del surfactante con los lípidos del estrato córneo. Sarptodar y Zatz (2,3) demostraron que el efecto de los polisorbatos sobre la penetración de lidocaína e hidrocortisona a través de la piel, se incrementó significativamente al aumentar la proporción de propilenglicol.

Parámetros estructurales tales como la longitud de la cadena, grado y posición de las insaturaciones y la naturaleza de los sustituyentes pueden influenciar la habilidad de los surfactantes para actuar como promotores de penetración en piel. Se ha aceptado que una cadena alquílica lineal de 12 átomos de carbono maximiza el efecto de un surfactante sobre la permeabilidad membranal. Las cadenas C_{12} tienen una solubilidad intermedia aceite/agua y son capaces de penetrar la bicapa lipídica. (1,6,9). Entre una serie de éteres de polioxietileno, el éter láurico (C_{12}) fue reportado como el más efectivo promotor para ibuprofeno, seguido por el éter oleico (C_{18}) (6). Aunque los ácidos grasos saturados C_{18} (por ej. Acido esteárico) han mostrado no ser efectivos, numerosos reportes están de acuerdo en el efecto desordenante del ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado C_{18} , particularmente en las regiones lipídicas

del estrato córneo (7,10-13). Se ha propuesto que el ácido oleico induce separación de fases, reduciendo así la resistencia de la membrana (14-15).

Los ésteres de ácido graso y sacarosa (SE) los cuales son surfactantes no iónicos, con sacarosa como grupo polar principal (Figura 1), también están siendo investigados actualmente como promotores. De una serie de SE, solo el laureato de sacarosa fue eficiente para incrementar el paso de clorhidrato de lidocaina a través de mucosa bucal y paladar (16). Los SE son surfactantes no tóxicos y biodegradables, aprobados por la FAO/WHO como aditivos en alimentos (5). Como no son irritantes a la piel, pueden ser usados no solo para alimentos sino también para aplicaciones terapéuticas y cosméticas (5,17). Su aplicación en dermatología se ha visto incrementada por la habilidad de algunos SE, como el laureato y el ricinoleato, para formar cristales líquidos y microemulsiones (5, 18, 19).

La evidencia biofísica sobre la intensidad y duración del efecto de un promotor, puede obtenerse mediante mediciones de Pérdida de Agua Transepidermal (TEWL) y Espectroscopía Infrarroja por Transformadas de Fourier con Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR). El TEWL ha mostrado ser útil para evidenciar cambios macroscópicos en el estado funcional de la barrera de la piel y esto contribuye a la predicción de penetración percutánea (20-21). Por otra parte, el FTIR-ATR permite detectar cambios conformacionales en las regiones de lípidos y proteínas del estrato córneo, y ha probado ser un instrumento útil para monitorear la penetración percutánea de fármacos u otros constituyentes tales como cosolventes y promotores (11-12,21-24). El TEWL y el FTIR-ATR tienen la ventaja de ser no invasivos y permitir el desarrollo de experimentos *in vivo*, en humanos.

El propósito de este estudio fue evaluar en piel humana *in vivo* (a) el efecto de dos SE, oleato y laureato de sacarosa, sobre la función de barrera de la piel, y (b) examinar el impacto de estos surfactantes no iónicos sobre la penetración percutánea del 4-hidroxibenzonitrilo (un penetrante modelo), el cual fue seleccionado considerando la absorbancia a 2230 cm^{-1} , producto del estiramiento del $\text{C}\equiv\text{N}$ permitiendo con esto ser monitoreado por espectroscopía FTIR-ATR.

Materiales y Métodos

El 4-hidroxibenzonitrilo fue comprado a Aldrich (ST. Louis, MO, U.S.A.). El Transcutol fue una donación de Gattefossé (Saint-Priest, France). El oleato de sacarosa (Ryoto Sugar Ester[®] O-1570) y el laureato de sacarosa (Ryoto Sugar Ester[®] L-1695) fueron generosamente donados por Sectchemie AG (Zürich, Switzerland). La cinta Scotch[®] Book Tape 845 fue comprada a 3M (ST. Paul, MN). Se prepararon soluciones acuosas usando agua desionizada surtida por un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore Corp, Bedford, MA).

Tratamiento de la piel

Participaron en el estudio, seis adultos sanos (sexo femenino, edad 20-30 años) quienes no recibieron medicación y no tenían historial de enfermedades en la piel, quienes otorgaron su consentimiento por escrito. Durante el estudio, se requirió que los voluntarios se abstuvieran de aplicar cualquier producto para el cuidado de la piel en la parte interna del antebrazo, destinada a la experimentación. La piel fue limpiada suavemente con agua y secada usando una gasa. Inmediatamente después, se aplicaron a los sujetos las siguientes soluciones: oleato de sacarosa (O) ó laureato de sacarosa (L) al 2 ó al 10% (p/v) en agua ó en Transcutol (TC). El Transcutol, monoetil éter de dietilen glicol (Figura 1), se escogió por su conocida habilidad para incrementar la solubilidad de los fármacos en la piel (25). Un volumen de 1.5ml de las formulaciones fue aplicado mediante una papel filtro (11.5 x 4.5 cm), el cual se fijó a la piel con una película oclusiva. Al final del periodo de aplicación (1h), el papel filtro se removió y la superficie de la piel se limpió con un algodón humedecido y se secó suavemente con una gasa. El sitio de aplicación se delimitó con un marcador para asegurar el reposicionamiento del área en cada medición. A cada sujeto se le aplicaron todas las formulaciones. Se registraron espectros de FTIR-ATR y medidas de TEWL antes del tratamiento, después del tratamiento (~5 min después de limpiado) y después periódicamente (cada hora) durante las siguientes 4 horas.

Efecto de éster de ácido graso de sacarosa (SE) en la penetración in vivo del 4-hidroxibenzonitrilo (4-HB)

En una serie separada de experimentos, el sitio de aplicación fue pretratado tópicamente con cada una de las soluciones de L u O, en agua o en TC (2 y 10% p/v), por 1 h (siguiendo el procedimiento descrito anteriormente). Después de este tratamiento, la superficie de la piel se limpió con una gasa húmeda y 1.5ml de una solución acuosa saturada de 4-HB fue aplicada en la piel mediante un papel filtro (11.5 x 1.0 cm) fijado con una película oclusiva. Después de 1h, la superficie de la piel se limpió con agua y se secó. Con el fin de determinar la distribución del 4-HB a través del estrato corneo, se registraron espectros de IR del sitio dosificado, realizando 16 strippings sucesivos usando cinta Scotch® Book Tape No. 845 (3M, Minnesota, U.S.A.). Se obtuvo un espectro de infrarrojo para cada cinta. La cantidad de 4-HB en cada cinta se determinó espectroscópicamente gracias a la intensidad de la absorbancia del estiramiento del $C\equiv N$ que presenta el 4-HB a 2230 cm^{-1} . Se construyó una curva de calibración registrando un espectro de infrarrojo al adicionar cantidades conocidas de 4-HB a las cintas (con estrato corneo). Cada cinta fue analizada 10 veces. La profundidad de penetración del 4-HB se calculó considerando un área de muestreo constante y una densidad de $\sim 1\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ para el estrato corneo removido. De esta forma, la masa del estrato corneo removido (determinado por el peso de las cintas antes y después del stripping), se convirtió en profundidad de SC (masa del SC = área x profundidad x densidad).

Espectroscopia FTIR-ATR

Se registraron espectros de infrarrojo usando un espectrofotómetro Shimadzu FTIR-8300 (Kyoto, Japan) equipado con un cristal trapezoidal de ATR (80 x 10 x 4 mm, bisel 45°). Cada medida representó un promedio de 45 mediciones con una resolución de 1 cm^{-1} . Con el fin de determinar el efecto de los SE, se examinó la frecuencia e intensidades de los picos asignados a las vibraciones de estiramiento simétricas y asimétricas de las cadenas alquílicas de los lípidos del estrato corneo ($\sim 2850\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 2920\text{ cm}^{-1}$, respectivamente) en los espectros adquiridos.

Mediciones de TEWL

La pérdida de agua transepidérmica se midió con un Tewameter TM 210 (Courage+Khazaka electronic GmbH, Cologne, Germany), con una resolución de 0.1 g/h.m^2 , de acuerdo a las guías recomendadas (26). Las medidas se registraron en una cámara ventilada de Plexiglas, y los voluntarios permanecieron tranquilos y relajados durante el experimento para evitar fluctuaciones en el TEWL.

Medidas de Tensión Superficial

La tensión superficial de las soluciones se determinaron usando el método de Wihelmy-Noüy. Se empleó agua destilada como estándar de referencia.

Estadística

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar (S.D.). Se realizó la prueba-t de Student ó análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas. El procedimiento de Duncan se aplicó para determinar el origen de la diferencia en aquellos casos en que se obtuvo un valor de F significativo.

Resultados y discusión

Como se discutió anteriormente, los surfactantes pueden promover el transporte de fármacos por diversos mecanismos. Primeramente, ellos pueden insertarse en las regiones intercelulares y posiblemente incrementar la fluidez y/o extraer los lípidos de barrera. En segundo lugar, pueden penetrar dentro de los corneocitos, y romper la red de filamentos de queratina y de ese modo aumentar la permeabilidad de los corneocitos (6). En el caso de los SE, existe la posibilidad de que sus largas cadenas hidrocarbonadas (Figura 1) se inserten entre las cadenas lipofílicas de la bicapa permitiendo que el anillo de sacarosa interactúe con las cabezas polares de los lípidos. Para probar el efecto de los SE sobre las propiedades de barrera del

estrato corneo, el SC tratado fue examinado por FTIR-ATR *in vivo*. En los estudios de lípidos por IR, se ha puesto especial interés en las absorbancias originadas por las vibraciones de estiramiento C-H₂ simétricas y asimétricas de la cadena alquílica de los lípidos del estrato corneo (~2850 cm⁻¹ y 2920 cm⁻¹ respectivamente). Los espectros de FTIR-ATR del estrato corneo tratado por 1 hora con los SE al 2% en transcutool se presentan en la Figura 2. Como se ve en el espectro, el tratamiento con L-TC al 2% y O-TC al 2% resultaron en un decremento significativo en las áreas y alturas de estos picos. De hecho, después del tratamiento con L-TC al 2%, las absorbancias de los lípidos casi desaparecieron por entero. Esta observación sugiere que las formulaciones de SE-TC 2% pueden interactuar con las estructuras de lípidos, provocando la disolución y extracción de lípidos del SC (21). En contraste, cuando la piel fue tratada con formulaciones acuosas o formulaciones con TC conteniendo el 10% de SE, este fenómeno no fue observado (los datos no se muestran). Aunque el tratamiento con TC solo mostró un decremento en la altura de estos picos (Figura 2), el efecto no fue tan marcado como con las soluciones de SE-TC 2%. Además, el tratamiento con formulaciones de SE-TC causó un desplazamiento hacia mayores números de onda de las vibraciones simétricas y asimétricas de estiramiento C-H₂ con respecto al estrato corneo no tratado (Figura 3). El tratamiento con L-TC al 2% produjo un marcado cambio en la frecuencia asimétrica de estiramiento comparado con el control ($t=3.876$; $t_{0.05/2,5}=2.57$), el cual no fue igualado por las soluciones acuosas ó por TC solo. Por otra parte, la frecuencia simétrica de estiramiento C-H₂ demostró un leve desplazamiento con todas las soluciones de SE-TC, pero como se muestra en la Figura 3, el cambio fue mayor con las soluciones de L-TC al 2 y 10%.

De hecho, los procedimientos de ANOVA y Duncan revelaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre las formulaciones de L-TC al 2 y 10% cuando se compararon con el control, las soluciones acuosas, TC solo y las formulaciones de O-TC. Las diferencias fueron no significativas cuando las comparaciones se hicieron entre el control, soluciones acuosas, TC y formulaciones O-TC al 2 y 10%. En algunos casos, el tratamiento con SE-TC provocó la aparición de un hombro en la banda simétrica de estiramiento a 2850 cm⁻¹, el cual puede estar probablemente asociado con la incorporación del SE dentro del estrato corneo. Aunque las absorbancias de estiramiento del metileno de los mismos componentes de la formulación contribuyen a la absorbancia total, y consecuentemente a los cambios de frecuencia medidos

(particularmente a mayores números de onda), se puede asumir que estas contribuciones son negligibles en base a dos observaciones. Primero, las frecuencias de estiramiento C-H₂ de los excipientes no son tan grandes como las de los lípidos del SC, y en segundo lugar, dado que las soluciones de SE de mayor concentración (10%) no indujeron un cambio hipsocrómico, es muy improbable que la intensa repuesta observada a bajas concentraciones (2% p/v) se origina de las absorbancias intrínsecas de los excipientes.

La naturaleza temporal de estos cambios de frecuencia se monitoreó mediante espectros registrados cada hora durante cuatro horas. Los resultados demostraron que el cambio de frecuencia fue reversible, con el regreso de las bandas a sus valores originales después de 3h. Se ha reportado que estos cambios de frecuencia reflejan un incremento en la fluidez de lípidos y un incremento en la proporción de los confórmeros *gauche* a lo largo de las cadenas hidrocarbonadas de lípidos (27).

El TEWL se incrementó de manera transitoria inmediatamente después de remover la película protectora al final del periodo de aplicación, esta observación puede ser atribuida a la evaporación del agua después de la oclusión. Sin embargo ninguna de las formulaciones causó un incremento sostenido en la pérdida de agua, y no se encontraron diferencias significativas entre el valor del control y los encontrados después del tratamiento con cualquiera de las formulaciones (~9-13g/h.m²). A pesar de las alteraciones observadas en los espectros de FTIR, la TEWL permaneció inalterada para todas las formulaciones.

Un objetivo de nuestro estudio fue investigar la relación entre el grado de disturbio del estrato corneo inducido por los SE y la penetración de una molécula (4-HB). Los perfiles de distribución del 4-HB en función de la profundidad de estrato corneo están representados en la Fig.4. Como se muestra, la profundidad de penetración del 4-HB fue poca cuando la liberación ocurre a partir de un medio acuoso. Sin embargo, la combinación de TC y SE resultó en un incremento del grado de penetración, particularmente a una concentración del 2%. La Fig. 5 presenta la distancia total de penetración del 4-HB para la piel tratada con SE en solución acuosa y en TC. El ANOVA de estos resultados seguido por la prueba de Duncan revelaron una diferencia significativa entre el L-TC al 2% y el control ($F=5.33$; $F_{0.05/2,9,20}=2.39$). Estos hallazgos son consistentes con los datos de espectroscopía de IR presentados anteriormente, los cuales no indicaron modificación de los lípidos del SC cuando

la piel se trató con soluciones acuosas de SE, pero sí una clara fluidización de lípidos en presencia de SE-TC. Estos resultados son también consistentes con reportes previos que han demostrado que la penetración en piel se ve incrementada significativamente con mezclas solvente-agua (ej. mezclas de propilenglicol (2,3), alcohol isopropílico (28)) conteniendo una alta proporción de solvente. Ganem-Quintanar et al. (25) demostró previamente que el TC difunde a través del estrato corneo estableciendo un flujo constante en dos horas.

La promoción sinérgica observada entre el SE y el TC puede entonces atribuirse probablemente a la absorción facilitada del surfactante por la presencia de TC en el estrato corneo. La Figura 6 ilustra la cantidad total de 4-HB determinada en las cintas, representando la cantidad que penetró a través del estrato corneo. Los resultados sugieren que después de la aplicación de una hora, la cantidad total de 4-HB detectada en el SC es independiente de la formulación. Sin embargo, como se resume en la Figura 5, el grado de penetración de la molécula está influenciado claramente por la formulación, siendo aumentada por la incorporación de SE-TC.

La concentración micelar crítica (CMC), determinada por mediciones de tensión superficial, se incrementó dramáticamente cuando el TC se empleó como solvente. Como se presenta en la Tabla I, mientras en las soluciones acuosas los valores de CMC fueron de 0.05% y 0.01% para L y O, respectivamente, en TC la CMC aumentó a 3% para los dos ésteres de sacarosa. Estos resultados coinciden con estudios anteriores donde el propilenglicol demostró incrementar la CMC de surfactantes no iónicos (2-3, 29). Los datos de ATR-FTIR presentados aquí son consistentes con el comportamiento de permeación dependientes de la concentración de surfactante y apoyan la suposición de que el monómero es transportado preferentemente a través del SC (2-3, 30) dado que el máximo disturbio de lípidos se logró con las formulaciones de SE-TC al 2% a concentraciones por debajo de la CMC. Además, a pesar de los niveles 5 veces mayores de SE, las formulaciones de SE al 10% (concentraciones por arriba de la CMC) no produjeron un aumento correspondiente en la permeación del 4-HB.

Conclusiones

Hemos demostrado que la penetración de 4-HB, una molécula modelo ($M_w=119.12$; $\text{Log}K_{o/w}=1.56$, solubilidad en agua =10.25 mg/ml) se incrementa en presencia de ésteres de sacarosa y Transcutol. Aparentemente el TC y los SE interactúan sinérgicamente para modificar la barrera de la piel y promover la penetración del 4-HB. De los dos ésteres de sacarosa evaluados, el laureato, en combinación con Transcutol, fue significativamente más eficaz que su análogo oleato.

Éstas moléculas de surfactantes no-iónicos relativamente inocuas justifican la investigación más extensa como candidatos potenciales para su inclusión en formulaciones transdérmicas como promotores de penetración.

Abreviaciones

4-HB	4-hidroxibenzonitrilo
L	Laureato de sacarosa
O	Oleato de sacarosa
SC	Estrato corneo
SE	Esteres de ácido graso de sacarosa
TC	Transcutol

Agradecimientos

Los autores deseamos agradecer el apoyo financiero para este trabajo por CONACYT (Ref. J32593-M) y PAPIIT (Ref. IN21400). Damos las gracias al Sr. Draucin Jiménez-Celi por su experta asistencia técnica.

Referencias

1. P. Ashton, J. Hadgraft, and K.A. Walters. Effects of surfactants in percutaneous absorption. *Pharm. Acta Helv.* **61**:228-235 (1986).
2. P.P. Sarpotdar and J.L. Zatz. Evaluation of penetration enhancement of lidocaine by nonionic surfactants through hairless mouse skin *in vitro*. *J. Pharm. Sci.* **75**:176 (1986).
3. P.P. Sarpotdar and J.L. Zatz. Percutaneous absorption enhancement by nonionic surfactants. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **12**: 1625-1647 (1986).
4. W. Bialik, K.A. Walters, K.R. Brain, and J. Hadgraft. Some factors affecting the *in vitro* penetration of ibuprofen through human skin. *Int. J. Pharm.* **92**:219-223 (1993).
5. M.A. Thevenin, J.L. Grossiord and M.C. Poelman. Sucrose esters/cosurfactant microemulsion systems for transdermal delivery: assessment of bicontinuous structures. *Int. J. Pharm.* **137**:177-186 (1996).
6. E.-S. Park, S.-Y. Chang, M. Hahn, and S.-Ch. Chi. Enhancing effect of polyoxyethylene alkyl ethers on the skin permeation of ibuprofen. *Int. J. Pharm.* **209**:109-119 (2000).
7. S.B. Ruddy. Surfactants. In E.W. Smith and H.I. Maibach (eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers*, CRC Press, Inc., Florida, 1995, 245-257.
8. A. Ganem-Quintanar, Y.N. Kalia, F. Falson-Rieg, and P. Buri. Mechanisms of oral permeation enhancement. *Int. J. Pharm.* **156**:127-142 (1997).
9. K.A. Walters. Surfactants and percutaneous absorption. In R.C. Scott, R.H. Guy and J. Hadgraft (eds.), *Prediction of Percutaneous Penetration*, IBC, London, 1990, pp. 148-162.
10. Y. Takeuchi, H. Yasukawa, Y. Yamaoka, Y. Kato, Y. Morimoto, Y. Fukumori and T. Fukuda. Effects of fatty acids, fatty amines and propylene glycol on rat stratum corneum lipids and proteins *in vitro* measured by Fourier transform infrared/attenuated total reflection (FT-IR/ATR) spectroscopy. *Chem. Pharm. Bull.* **40**:1887-1892 (1992).
11. V.H.W. Mak, R.O. Potts, and R.H. Guy. Oleic acid concentration and effect in human stratum corneum: Non-invasive determination by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *J. Control. Rel.* **12**: 67-75 (1990a).
12. V.H.W. Mak, R.O. Potts, and R.H. Guy. Percutaneous penetration enhancement *in vivo* measured by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Pharm. Res.* **7**:835-841 (1990b).

13. B.J. Aungst. Fatty acids as skin permeation enhancers. In E.W. Smith and H.I. Maibach (eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers*, CRC Press, Inc., Florida, 1995, 277-287.
14. B. Ongpipattanakul, M.L. Francoeur, and R.O. Potts. Polymorphism in stratum corneum lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1990**:115-122 (1994).
15. A. Naik, L.A.R.M. Pechtold, R.O. Potts and R.H. Guy. Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement in vivo in humans. *J. Control. Rel.*, **37**: 299-306 (1995).
16. A. Ganem-Quintanar, D. Quintanar-Guerrero, F. Falson-Rieg, and P. Buri. Ex vivo oral mucosal permeation of lidocaine hydrochloride with sucrose fatty acid esters as absorption enhancers. *Int. J. Pharm.* **173**:203-210 (1998).
17. Mitsubishi-Kasei Food Corporation, Japan, Ryoto Sugar Ester Technical Information, 1987.
18. D. Tambini, M.F. Bobin, and M.C. Martín. Etude physico-chimique des sucroesters. Essais de valorisation. *Pharm. Belg.* **48**:19-26 (1993).
19. L. Lehmann, S. Keipert, and M. Gloor. Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**:129-136 (2001).
20. K. Abrams, J.D. Harvell, D. Shriner, P. Wertz, H. Maibach, H.I. Maibach, and S.J. Rehfeld. Effect of organic solvents on in vitro human skin water barrier function. *J. Invest. Dermatol.* **101**:609-613 (1993).
21. A.K. Levang, K. Zhao, and J. Singh. Effect of ethanol/propylene glycol on the in vitro percutaneous absorption of aspirin, biophysical changes and the macroscopic barrier properties of the skin. *Int. J. Pharm.* **181** 255-263 (1999).
22. M.A. Pellett, A.C. Watkinson, J. Hadgraft, and K.R. Brain. Comparison of permeability data from traditional diffusion cells and ATR-FTIR spectroscopy. Part II. Determination of diffusional pathlengths in synthetic membranes and human stratum corneum. *Int. J. Pharm.* **154**: 217-227 (1997).
23. Dias M., S.L. Raghavan, and J. Hadgraft. ATR-FTIR spectroscopic investigations on the effect of solvents on the permeation of benzoic acid and salicylic acid through silicone membranes. *Int. J. Pharm.* **216**: 51-59 (2001).
24. K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y.N. Kalia, and R.H. Guy. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: 103-112 (2001).

25. A. Ganem-Quintanar, C. Lafforgue, F. Falson-Rieg, and P. Buri. Evaluation of the transepidermal permeation of diethylene glycol monoethyl ether and skin water loss. *Int. J. Pharm.* **147**:165-171 (1997).
26. V. Rogiers and D. Roseeuw. TEWL measurements in patch test assessment: The need for standardisation. *Second International Symposium on Irritant Contact Dermatitis (ISICD)*, Zurich, April 14-16 (1994).
27. H.L. Casal and H.H. Mantsch. Polymorphic phase behavior of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **779**:381-401 (1984).
28. V. Shahi and J.L. Zatz. Effect of formulation factors on penetration of hydrocortisone through mouse skin. *J. Pharm. Sci.* **67**:789-792 (1978).
29. E.J. French, C.W. Pouton, and G. Steele. Fluidisation of distearoylphosphatidylcholine bilayers by nonionic surfactants of single ethoxy chain length. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**:38P (1988).
30. U.G. Dalvi and J.L. Zatz. Effect of nonionic surfactants on penetration of dissolved benzocaine through hairless mouse skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **32**:87-94 (1981).

Título de Figuras

Fig. 1. Estructura química de (a) monoéster de sacarosa [R= ácido graso] y (b) Transcutol (monoetil eter de dietilen glicol).

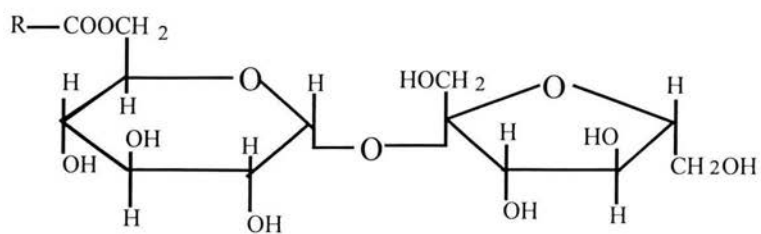
Fig. 2. Espectro representativo de FTIR - ATR en el rango de $3500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ para la piel tratada con Transcutol (TC), 2 % O-TC y 2 % L-TC. Comparando, el espectro del estrato corneo sin tratar (SC), TC (TC*) y laureato de sacarosa (L*) solos son mostrados. Los espectos de IR oleato de sacarosa (no se muestran) es muy similar al laureato de sacarosa.

Fig. 3. Cambios en al frecuencia de las vibraciones C-H₂ simetrica (■) y asimetrica (□) de estiramiento del las cadenas alqulicas de los lípidos del estrato corneo ($n = 6 \pm \text{SD}$). L=laureato; O = oleato; TC = Transcutol; W = water.

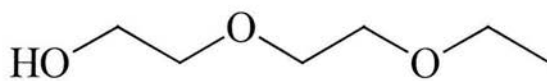
Fig. 4. Perfiles de distribución del 4-HB en función de la profundidad del SC seguida del tratamiento con (A) oleato o (B) laureato: 2 % en agua (○) o en Transcutol (□); 10 % en agua (▲) o en Transcutol (◆). Transcutol (△); control (●).

Fig. 5. Efecto de los SE sobre la distancia de penetración del 4-HB ($n = 3 \pm \text{SD}$). L= laureato; O= oleate; TC = Transcutol; W = agua.

Fig. 6. Cantidad total penetrada de 4-HB por unidad de área del estrato corneo ($n = 3 \pm \text{SD}$). L=laureato; O = oleato; TC = Transcutol; W = agua.



(a)



(b)

Figura 1

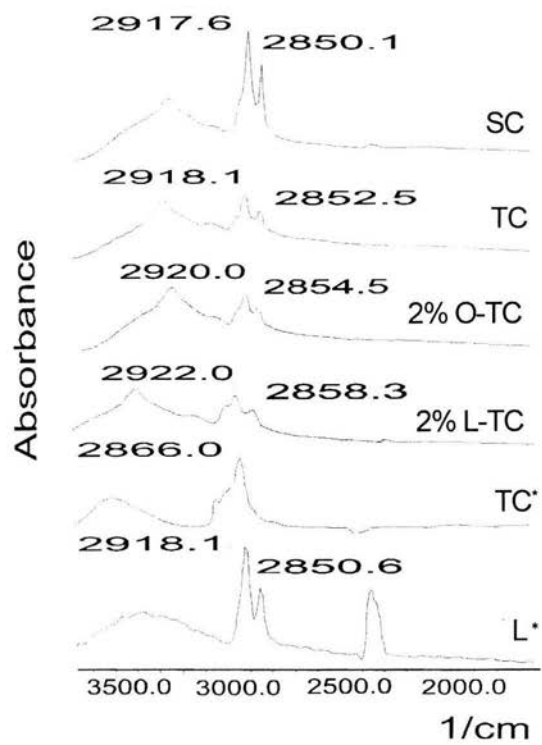


Figura 2

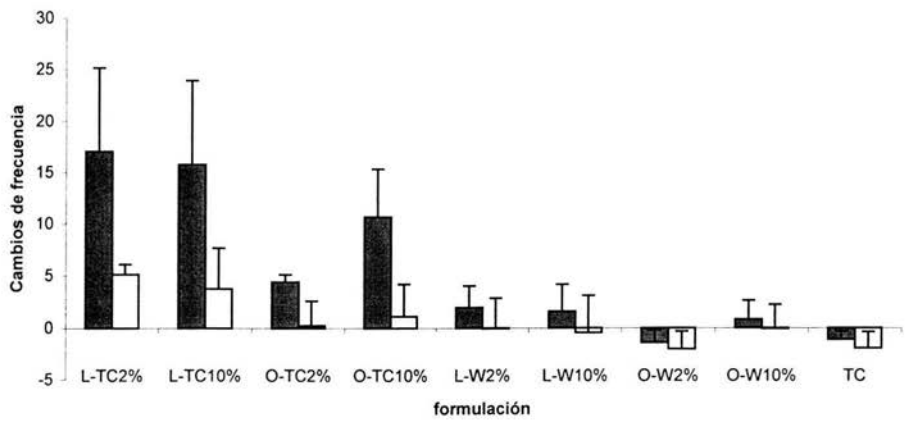
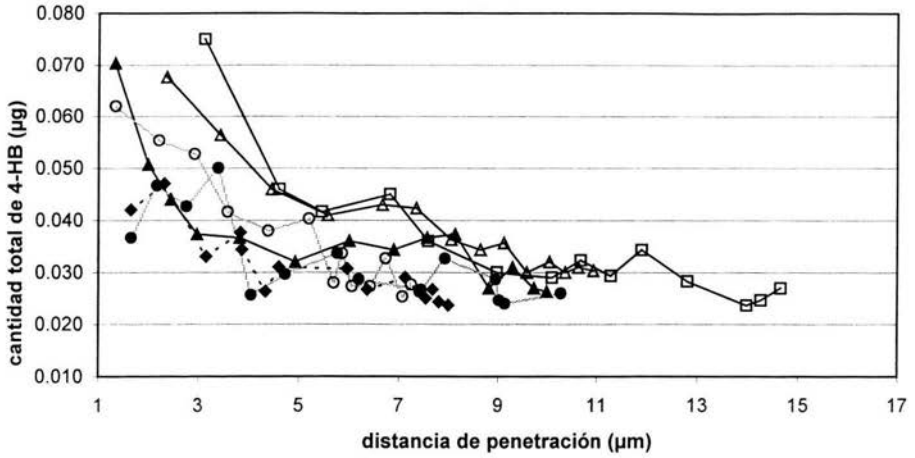


Figura 3

(A)



(B)

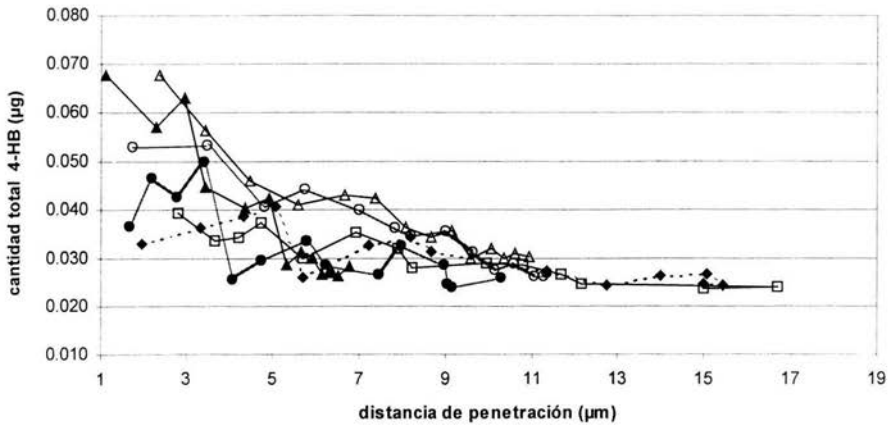


Figura 4

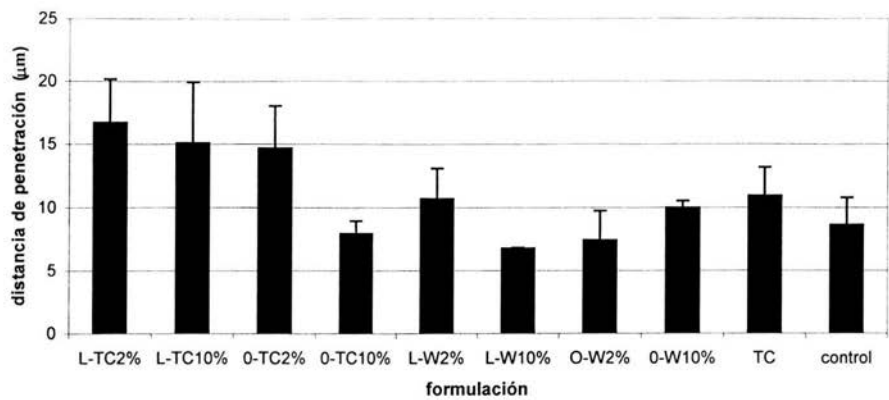


Figura 5

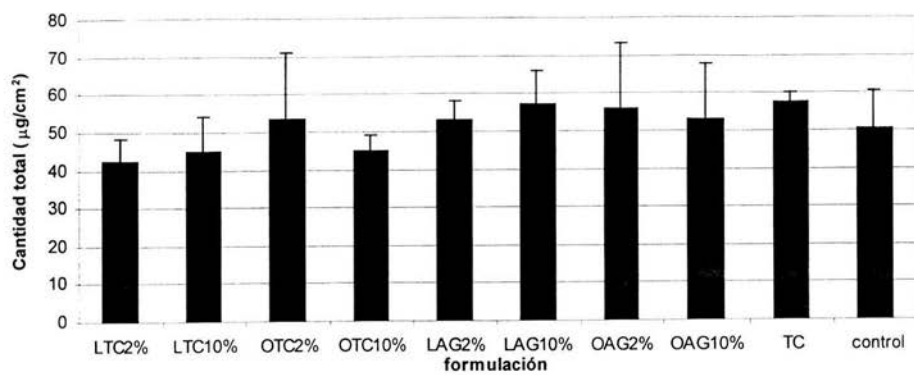


Figura 6

Tabla 1. Concentración Micelar Crítica (CMC) de laureato de sacarosa y oleato de sacarosa en agua y en transcitol.

Ester de sacarosa	Solvente	
	Agua	Transcitol
Laureato de sacarosa	0.05 %	3 %
Oleato de sacarosa	0.01 %	3 %

ANEXOS

**SOLUBILIDAD DE ESTERES DE SACAROSA
EN AGUA Y EN TRANSCUTOL (%)**

	AGUA (%)	TRANSCUTOL (%)
Laureato de Sacarosa L-1695	>50	>50
Oleato de Sacarosa O-1570	<50	>50

**Tensión Superficial vs In Concentración
del Laureato de Sacarosa L-1695 (%p/v) en Transcutol**

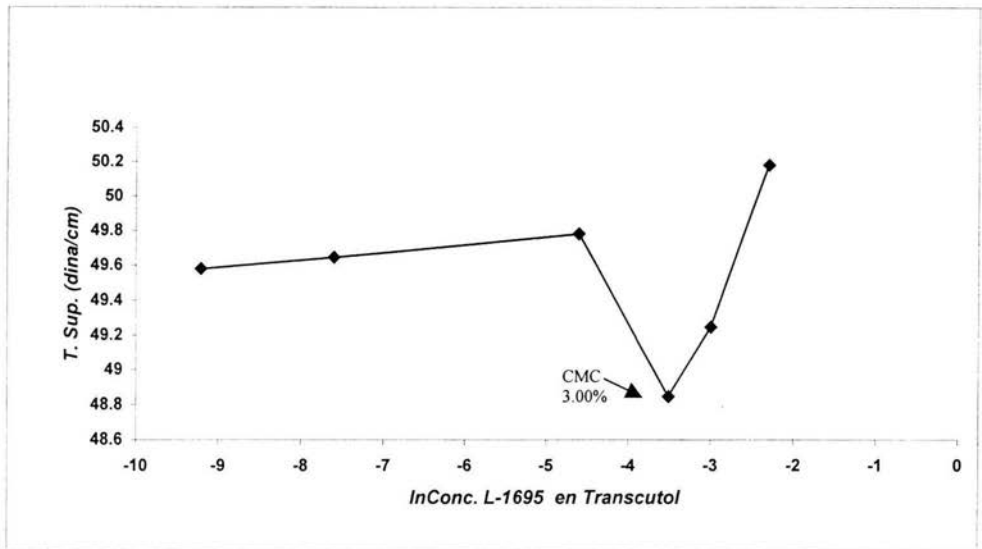


Tabla de Datos

CONCENTRACIÓN % SL-1695	In CONC. SL-1695 EN TRANSCUTOL	TENSIÓN SUP. (din/cm)
0.05	-7.60	49.65
1	-4.61	49.78
3	-3.51	48.84
5	-3.00	49.24
10	-2.30	50.18

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

**Tensión Superficial vs In Concentración
del Oleato de Sacarosa O-1570(%p/v) en Transcutol**

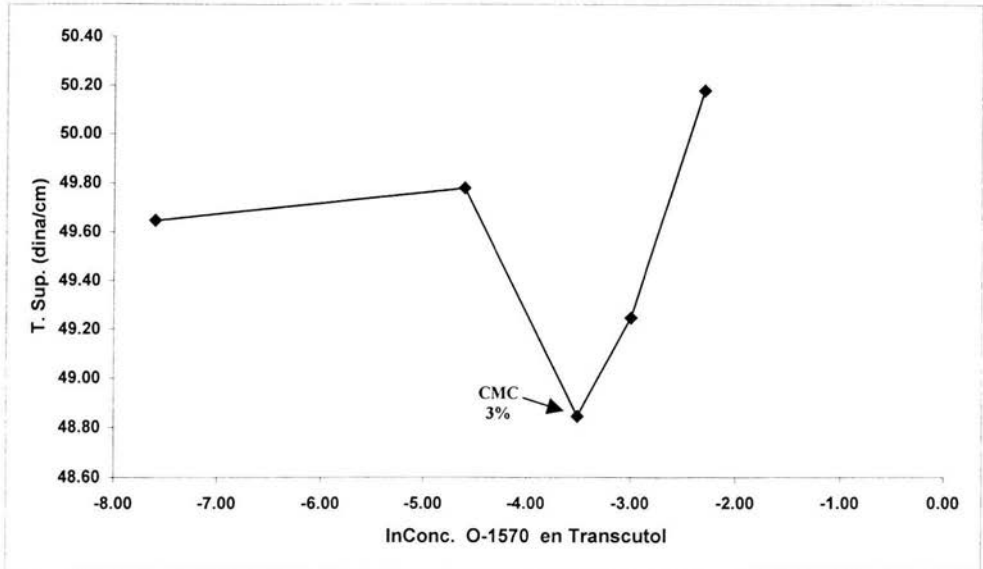


Tabla de Datos

CONCENTRACIÓN % SO-1570	ln CONC. O-1570 EN TRANSCUTOL	TENSIÓN SUP. (din/cm)
0.05	-7.60	50.11
1.00	-4.61	50.31
3.00	-3.51	49.71
5.00	-3.00	50.58
10.00	-2.30	51.18

**Tensión Superficial vs In Concentración de Laureato de Sacarosa
L-1695(% p/v) en Agua.**

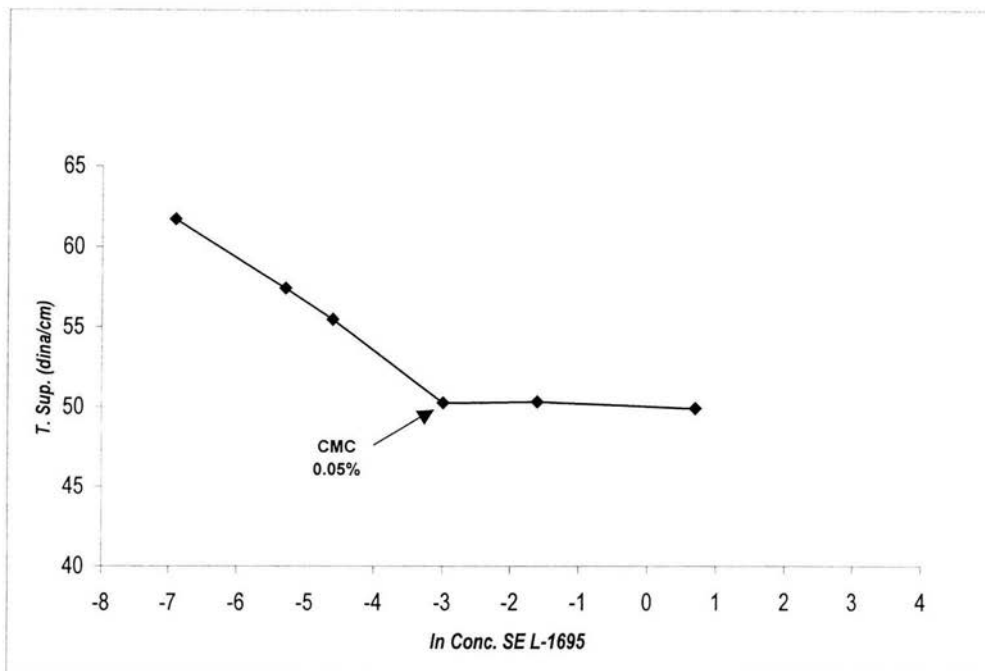


Tabla de Datos

CONCENTRACIÓN % SL-1695	ln CONC. SL-1695 EN AGUA	TENSIÓN . SUP. (din/cm)
0.001	-6.91	61.71
0.005	-5.30	57.39
0.010	-4.61	55.45
0.050	-3.00	50.24
0.200	-1.61	50.31
2.000	0.69	49.89

**Tensión Superficial vs In Concentración de Oleato de Sacarosa
O-1570 (% P/V) en agua.**

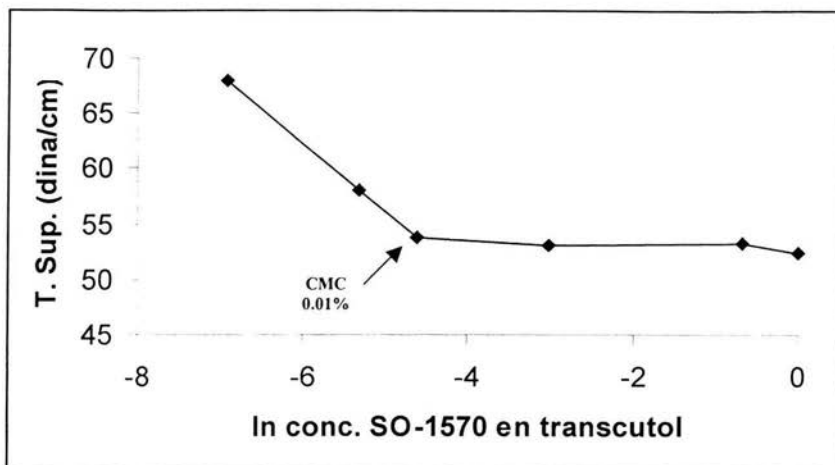
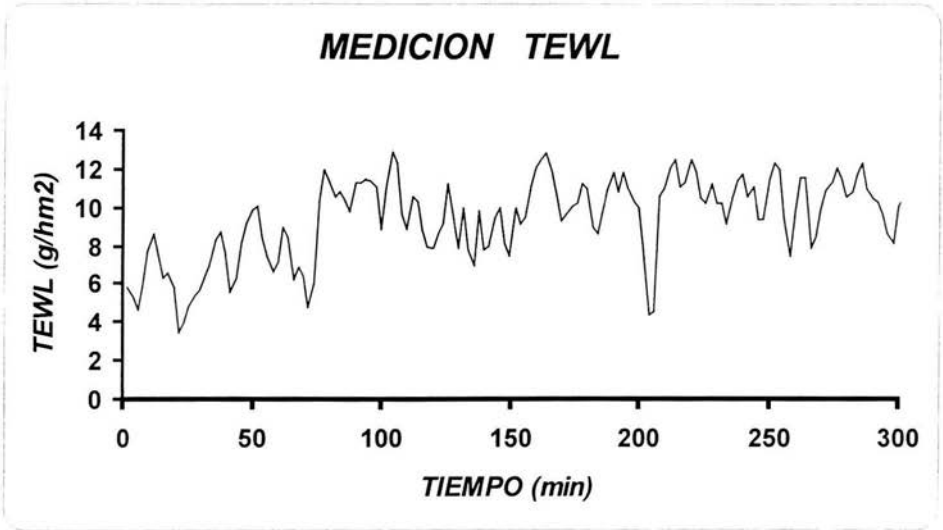
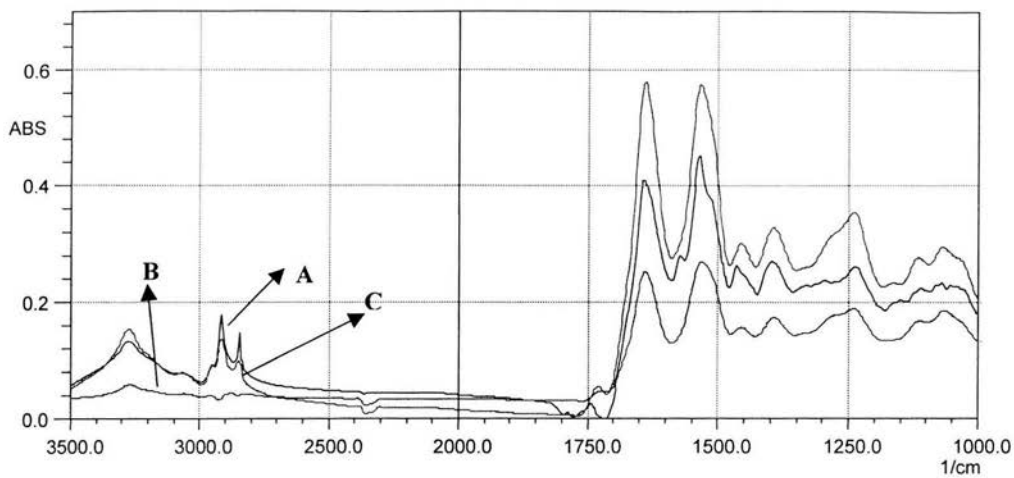


Tabla de Datos

CONCENTRACIÓN % SO-1570	ln CONC. SO-1570 EN AGUA	TENSIÓN. SUP. (din/cm)
0.001	-6.91	68.029
0.005	-5.3	58.092
0.01	-4.61	53.784
0.05	-3	53.089
0.5	-0.69	53.297
1	0	52.394



**Grafico representativo de Perdida de Agua Transepidermal
(TEWL)**



Espectros representativos donde se muestra el efecto reversible de los SE sobre el estrato corneo:

A. Perfil del SC normal

B. Perfil del SC tratado después de 1h

C. Perfil del SC tratado después de 4h

**CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACION DE
4-HIDROXIBENXONITRILO (4-HB)**

