

## INFLUENCIA DE LA ENCAPSULACIÓN EN LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA *IN VITRO* DEL OCTIL METOXICINAMATO.

María Magdalena Jiménez<sup>1,2</sup>, Jocelyne Pelletier<sup>2</sup>, Marie-France Bobin<sup>2</sup>, Marie-Claude Martini<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, E-28871-Alcalá de Henares (Madrid), España.

<sup>2</sup> Laboratorio de Dermofarmacia y Cosmetología, Facultad de Farmacia, Universidad Claude-Bernard-Lyon I, 69373 Lyon Cedex 08, Francia.

### Introducción

La exposición solar puede tener consecuencias serias sobre la piel tales como el daño actínico o algo peor: quemadura solar, fotoenvejecimiento y diferentes tipos de cánceres según la proporción y el tiempo de exposición (1). Por ello, resulta extremadamente importante el uso de filtros solares que protejan la piel de los efectos nocivos de la radiación UV (2).

Los preparados solares se aplican superficialmente y sobre grandes áreas de piel. Su eficacia implica que se adhieran sobre la piel formando una película protectora, tengan una alta afinidad por el estrato córneo, permanezcan sobre las capas superiores de la piel y su penetración a través de la piel sea baja (3).

En la actualidad, la investigación se orienta hacia la concepción de nuevas fórmulas dermocosméticas que presenten una inocuidad total, pequeña capacidad para superar la barrera cutánea, una buena substantividad y una importante remanencia.

Los vectores coloidales - emulsiones submicrónicas, nanosferas, nanocápsulas, liposomas y lípidos complejos -, han experimentado un interés creciente en los últimos años como vehículos para la administración local de activos lipófilos (4). Concretamente, las nanocápsulas se introducen como una nueva generación de transportadores cosméticos, especialmente de filtros solares.

El objetivo del trabajo es la determinación de la penetración percutánea de un filtro solar liposoluble, un derivado del ácido cinámico - octil metoxicinamato (OMC) -, a partir de diferentes

emulsiones: filtro libre y encapsulado en nanocápsulas - NC - de poli-ε-caprolactona - PCL -. Se investiga por tanto, la influencia de la encapsulación sobre la absorción percutánea *in vitro* del OMC en emulsiones O/A y A/O.

### Materiales y Métodos

#### *Preparación y caracterización de NC-OMC*

Las NC de OMC se elaboraron siguiendo el siguiente procedimiento (5): se disuelven 720 mg de PCL en 90 ml de acetona a 50 °C. A continuación, se adiciona Escalol® 557 - OMC - (1500 mg) a la solución cetónica. La solución resultante se inyecta bajo agitación magnética moderada (350 rpm) en 120ml de agua destilada que contiene un tensioactivo no-iónico - Montanox® 80 - como agente estabilizador. La fase acuosa inmediatamente se vuelve lechosa como resultado de la formación de una suspensión de nanocápsulas - S-NC -. La acetona se elimina a presión reducida - 35-40 °C (120 min). Finalmente, la S-NC se concentra hasta el volumen final deseado por evaporación del agua. El tamaño de las NC se determinó con un Coulter Nano-sizer®. El OMC encapsulado se expresó como el porcentaje de filtro incluido en las NC con respecto a la cantidad total de OMC en el medio (6). El rendimiento se expresó como la relación entre el OMC real en la suspensión y la cantidad teórica.

#### *Vehículos*

El OMC - libre y encapsulado - se incorporó en una emulsión O/A - PEG-5 Glyceryl Stearate, Mineral Oil, C12-15 Alkyl Benzoate, Caprylic/Capric Triglyceride, Stearic Acid, Cetyl

## 422 VI Congreso SEFIG y 3<sup>as</sup> Jornadas TF

Alcohol, Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben (and) Butylparaben, Glycerin and Distilled Water - y en una emulsión A/O - Polyglyceryl-4 Isostearate (and) Cetyl Dimethicone Copolyol (and) Hexyl Laurate, Mineral Oil, C12-15 Alkyl Benzoate, Caprylic/Capric Triglyceride, Hydrogenated Castor Oil, Sodium Chloride, Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben (and) Butylparaben, Glycerin and Distilled Water -. Las emulsiones conteniendo la S-NC cargadas con OMC al 5 %, se denominaron O/A-NC y A/O-NC; y O/A y A/O con OMC-libre al 5 %, respectivamente.

### *Preparación de la piel*

La piel de cerdo procedía del flanco de hembras (2 meses y 30 Kg) de las razas Landras y Pietrain. La piel se limpió, y la grasa subcutánea se eliminó. A continuación, las muestras de piel se lavaron con lauril sulfato sódico al 1 % p/p (lado epidérmico) y éter (lado dérmico), y después con agua bidestilada. El espesor de la piel se determinó utilizando un medidor del espesor (Mitutoyo, Japón, 0,01-10 mm). Los discos de piel - 2,54 cm<sup>2</sup> - se almacenaron a 20°C hasta su uso (7).

### *Preparación de las células de difusión*

Las muestras de piel se montaron en células de difusión - 2,54 cm<sup>2</sup> y 10 ml - de forma que el lado dérmico se expuso al fluido receptor - FR - y el estrato córneo - EC - al aire (condiciones no oclusivas).

El - FR - (pH = 7,4) consistió en una solución salina buffer fosfato - cloruro sódico 120 mM/l, cloruro potásico 2,7 mM/l y buffer fosfato 10 mM/l -, conteniendo 4% (p/p) de Oramix® BG 14.

Las emulsiones se aplicaron a una dosis de 8 mg/cm<sup>2</sup> formando una película perfectamente extendida. Las células se llenaron con 10 ml de - FR - y se pusieron en un baño termostatzado de agitación horizontal para asegurar la homogeneidad del - FR - y el mantenimiento de la temperatura de la piel en 32,0 ± 0,1 °C. Los ensayos se realizaron por sextuplicado.

### *Distribución 'in vitro' de OMC en las distintas capas de piel de cerdo*

Después de un tiempo de exposición de 3 y 24 h, el - FR - y la piel se quitaron, y el OMC remanente sobre la superficie de la piel - SP - se

retiró con una espátula de punta redonda. A continuación, las muestras de piel se fijaron en un soporte mecánico y se procedió a separar las capas superficiales del - EC -, mediante el procedimiento de *tape-stripping* (8). Para ello, se aplicó D-Squame™ -  $\phi = 22$  mm - a la superficie de la muestra, quedando adherido parte del - EC - al disco. Este procedimiento se repitió 19 veces. Después de eliminar el - EC -, la epidermis viable - EV - se separó de la dermis - D - de forma mecánica con la ayuda de pinzas, previa inmersión de la muestra en agua a 60 °C durante 45 s.

### *Análisis de OMC*

Para la cuantificación del OMC en la S-NC, las emulsiones, y la piel - EC, EV, D y FR - se desarrolló y validó un método analítico directo y muy sensible - HPLC (Waters, USA) -: columna Xterra RP18 -5 $\mu$ m, 150x3,9 mm-, termostatzada a 30 °C. La fase móvil filtrada - 0,45  $\mu$ m - consistió en una elución en gradiente: 0-5 min acetonitrilo:agua (85:15, v/v); 5-15 min: concentración creciente de acetonitrilo de 85 a 100 a una velocidad de 1 ml/min; detección a 310 nm (Waters 996 Photodiode Array).

### *Análisis estadístico*

Los resultados se analizaron con el software Prismas®. La diferencia en las concentraciones de OMC en el FR, D, EV, EC y superficie de la piel - SP - para cada fórmula se comparó por un t-test. Una P<0,05 se consideró estadísticamente significativa (9).

## **Resultados y Discusión**

### *Nanocápsulas*

Las nanocápsulas de OMC - OMC-NC - se elaboraron mediante una técnica de deposición interfacial. La ventaja de este método es la formación instantánea, simple, eficiente y reproducible de pequeñas NC. La ausencia de cualquier agregado o sedimento de OMC da testimonio de la buena asociación del polímero con el aceite. Las condiciones experimentales seleccionadas permiten obtener NC de OMC de 374 nm con un 97,52 % de encapsulación y un rendimiento del 82,95 %.

### *Ensayos 'in vitro'*

Los perfiles que involucran a las formulaciones de OMC-NC mostraron una moderada liberación

del activo. Esto puede ser explicado por la elevada hidrofobicidad y cristalinidad del polímero y la alta lipofilia del activo, lo que previene la difusión desde las emulsiones OMC-NC a la piel.

Las Tablas 1 y 2 reflejan la absorción percutánea in vitro (%) del - OMC - a los tiempos de 3 y 24 h.

**Tabla 1.-** Distribución in vitro del OMC después de un tiempo de exposición de 3 h (media ± DE, n = 6).

	NC-O/A	NC-A/O	O/A	A/O
SP	89,99±5,11	82,99±1,83	57,83±6,77	50,83±5,00
EC	8,32±4,45	16,34±1,85	40,50±6,55	45,81±4,83
EV	0,79±0,90	0,67±0,47	0,99±0,23	2,47±0,69
E	9,11±5,16	17,01±1,83	41,50±6,74	48,28±5,14
D	0,88±0,62	0,00±0,00	0,67±0,04	0,88±0,27
FR	0,02±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
PT	0,90±0,64	0,00±0,00	0,67±0,04	0,88±0,27
TP	10,01±5,11	17,01±1,83	42,17±6,77	49,16±5,00
Recuperación	89,77±10,66	64,27±10,37	94,16±7,44	89,98±7,92

**Tabla 2.-** Distribución in vitro del OMC después de un tiempo de exposición de 24 h (media ± DE, n = 6).

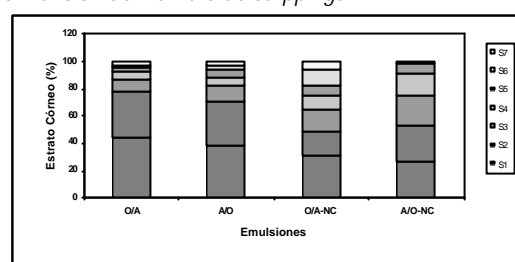
	NC-O/A	NC-A/O	O/A	A/O
SP	83,18±4,12	81,95±3,30	59,98±5,42	48,20±6,80
EC	15,57±4,30	17,55±2,96	36,59±5,25	46,39±6,34
EV	0,27±0,22	0,32±0,32	2,28±0,79	3,72±1,21
E	15,85±4,44	17,87±3,13	38,87±5,41	50,11±6,81
D	0,92±1,19	0,08±0,12	1,15±0,19	1,69±0,28
FR	0,05±0,09	0,09±0,15	0,00±0,00	0,00±0,00
PT	0,98±1,16	0,17±0,27	1,15±0,19	1,69±0,28
TP	16,82±4,12	18,05±3,30	40,02±5,42	51,80±6,80
Recuperación	81,70±12,83	65,37±8,81	81,75±5,00	87,40±7,30

El OMC permanece fundamentalmente sobre la - SP -. Un análisis de la varianza indica diferencias significativas entre las emulsiones (P<0,05).

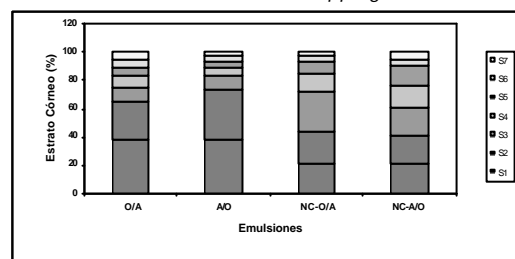
Seguidamente se establece el comportamiento del OMC en el - EC -. Las cantidades recuperadas van desde 27,29 a 163,10 µg/cm<sup>2</sup> de OMC. La mayor concentración de OMC en el EC se obtuvo para las emulsiones O/A y A/O y los niveles más bajos en las emulsiones OMC-NC. Los coeficientes de difusión son mayores en el caso de las emulsiones con el OMC libre: los coeficientes de partición EC/vehículo para el OMC aumentaron (10). El coeficiente de partición octanol-agua (Po/a) para el OMC es 5,96. El octanol se aproxima a las propiedades solventes del EC. Un aumento de Po/a conduce a una mayor permeación del OMC desde el vehículo al EC. Estos resultados confirman que el OMC-libre tiene alta afinidad por el EC debido a su capacidad para formar un depósito dentro de las fases lipídicas del EC. Esta propiedad es especialmente importante para los filtros solares

porque la cantidad de filtro en el EC está directamente relacionada con su protección solar. El análisis estadístico mostró diferencias significativas (P<0,05) entre las medianas a 95 % de nivel de confianza. Las Figuras 1 y 2 muestran la distribución del OMC en el EC en función del número de 'strippings'.

**Figura 1.-** Distribución del OMC en el - EC - a las 3 h en función del número de strippings



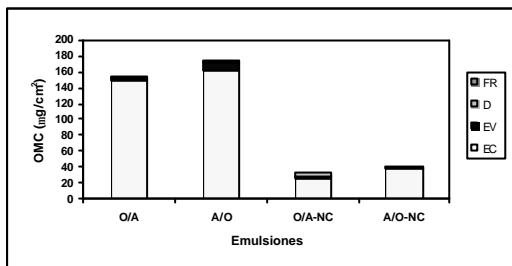
**Figura 2.-** Distribución del OMC en el - EC - a las 24 h en función del número de strippings



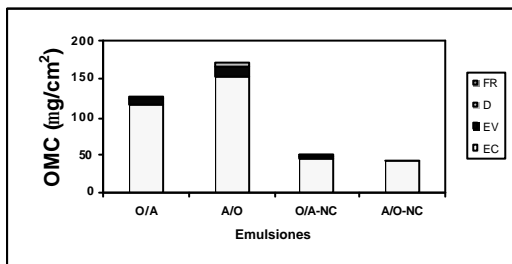
La Figura 1 refleja que para el primer 'stripping', el 44 % y 38 % de OMC permanecieron a nivel del EC para las emulsiones O/A y A/O, y el 30 % y 27 % para las emulsiones NC-O/A y NC-A/O, respectivamente. Después de 24 h (Figura 2), el OMC-libre era todavía más remanente que el OMC-encapsulado (37 y 38% frente a 21 y 20%). En todos los casos, tras la aplicación de las emulsiones O/A - OMC libre y encapsulado - se obtuvieron concentraciones más altas de OMC a nivel del EC comparado con las emulsiones A/O. El contenido de OMC en la piel total - PT - (Tablas 1 y 2) para las emulsiones OMC-libre fue mayor que el que se obtuvo para las emulsiones OMC-encapsulado. La acumulación de OMC-libre fue significativamente mayor (P<0,05) que la del OMC-encapsulado para las fórmulas investigadas. El análisis estadístico de las diferentes capas por separado mostró diferencias importantes (P<0,05) entre la cantidad de OMC en el EC, EV y D para las diferentes formulaciones, y sin embargo, la acumulación a

nivel del FR no resultó significativa ( $P>0,05$ ). Las figuras 3 y 4 muestran la distribución de OMC en los diferentes estratos cutáneos ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

**Figura 3.-** Distribución del OMC en la piel a las 3 h (media  $\pm$  DE,  $n = 6$ ).



**Figura 4.-** Distribución del OMC en la piel a las 24 h (media  $\pm$  DE,  $n = 6$ ).



Después de 3 y 24 h, las concentraciones más altas de OMC se obtuvieron para A/O y O/A y no se encontraron diferencias significativas entre las dos emulsiones-NC. La mayor distribución se da a nivel del EC y EV. A pesar de la naturaleza altamente lipófila del OMC, el EC es la capa limitante para la penetración. La relación del contenido a nivel del EC y la cantidad que penetra es una herramienta útil para evaluar la penetración del filtro solar.

La penetración transepidérmica - PT - representada por el % de OMC en D y FR (Tablas 1 y 2) fue baja para todas las emulsiones. No obstante, en las emulsiones O/A y A/O fue ligeramente más alta que en las emulsiones OMC-NC. Su % en el FR fue cero o muy próximo a cero. No se encontraron diferencias importantes ( $P>0,05$ ) en la PT del OMC. Estos bajos valores pueden explicarse por el hecho de que la dermis es el factor limitante. La difusión del OMC fue similar para las emulsiones OMC-libre y OMC-encapsulado. En consecuencia, el vehículo NC no parece influir mucho en el proceso de - PT - del OMC. Cada estrato de piel (EC, EV y D) presenta una resistencia a la difusión. El vehículo puede

afectar a la difusión en el EC, pero este efecto podría ser insignificante si la resistencia a la difusión en la dermis es muy alta (11).

Las NC son capaces de formar un sistema reservorio y el OMC permanece más tiempo sobre la superficie de la piel. Por tanto, el uso de emulsiones con NC disminuye la penetración del OMC comparado con las mismas emulsiones A/O y O/A. También se observa que la oclusión con vehículos oleosos (A/O) aumenta la penetración del OMC.

La aplicación local de emulsiones OMC-NC puede ser más efectiva (efecto sinérgico) debido probablemente a la formación de una película de NC sobre la superficie de la piel. En conclusión, se enfatiza la potencialidad de las NC de OMC como nuevos sistemas de liberación sobre la piel.

## Bibliografía

1. Vanquerp V, Rodriguez C, Coiffard C, Coiffard LJM, *J Chromatogr A*, 832, 273, (1999).
2. Godwin DA, Kim NH, Felton LA, *Eur J Pharm Biopharm*, 53, 23, (2002).
3. Jiang R, Roberts MS, Prankerd RJ, Benson HA, *J Pharm Sci*, 86, 791, (1997).
4. Santos NS, Fessi H, Puisieux F, Benita S, Seiller M, *J Microencapsulation*, 12, 195, (1995).
5. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S, *Int J Pharm*, 55, R1, (1989).
6. Ferranti V, Marchais H, Chabenat C, Orecchioni AM, Lafont O, *Int J Pharm*, 193, 107, (1999).
7. Kurul E, Hekimoglu S, *Int J Cosmet. Sci*, 23, 211, (2001).
8. Clarys P, Gabard B, Lambrecht R, Barel A, Bieli E, Ludi S, *J Dermatol Sci*, 27, 77, (2001).
9. Brand RM, Mueller C, *Toxicol Sci*, 68, 18, (2002).
10. Treffel P, Gabard B, *Pharm Res*, 13, 770, (1996).
11. Brinon L, Geiger S, Alard V, Doucet J, Tranchant JF, Couarraze G, *J Control Release*, 60, 67, (1999).

### Autor de contacto:

M<sup>a</sup> Magdalena Jiménez Soriano  
 magdalena.jimenez@uah.es  
 Universidad de Alcalá  
 Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33,600  
 Alcalá de Henares  
 Telf.: 91 885 5105  
 Fax: 91 885 4660