

EVALUACIÓN DE DISTINTAS MEMBRANAS PARA LIBERACIÓN *IN VITRO* DE PRINCIPIOS ACTIVOS ANTICELULÍTICOS

EVALUATION OF DIFFERENT MEMBRANES FOR *IN VITRO* RELEASE OF ANTICELLULITIC ACTIVES

María V. Debandi, Nora J. François* y Marta E. Daraio

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ingeniería, Departamento de Química, Grupo de Aplicaciones de Materiales Biocompatibles, Avda. Paseo Colón 850 (C1063 ACV) Ciudad de Buenos Aires - Argentina

*autor de contacto (nfranco@fi.uba.ar)

Recibido: 21/10/2010 - Evaluado: 09/11/2010 - Aceptado: 06/12/2010

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el comportamiento de diferentes membranas de origen comercial o natural en la liberación *in vitro* de principios activos cosméticos de comprobada acción anticelulítica. Los principios activos utilizados fueron cafeína e ioduro de trietanolamonio, incorporados en microesferas porosas dispersas en una emulsión. Las membranas comerciales utilizadas fueron una membrana de celulosa y una de colágeno. La membrana natural se preparó a partir de la piel de oreja de cerdo. Las membranas comerciales se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido ambiental y los ensayos cinéticos se realizaron en una celda de Franz vertical cuantificando simultáneamente la liberación de los dos principios activos anticelulíticos. Los perfiles de liberación obtenidos con las tres membranas, indicaron la posibilidad de usar una membrana comercial de celulosa en reemplazo de membranas preparadas con piel de oreja de cerdo en los estudios *in vitro* de permeación de activos cosméticos.

ABSTRACT

The main purpose of this work was to evaluate different synthetic or natural membranes for *in vitro* release of cosmetic actives with proven anticellulitic activity. Caffeine and triethanolamonium iodide were used incorporated within porous microspheres dispersed in an emulsion. Two commercial membranes were used, one made of cellulose and another of collagen. Skin from pig's ear was used as a natural membrane. Commercial membranes were characterized by environmental scanning electronic microscopy and the kinetics tests were performed using a vertical Franz cell in order to quantify simultaneously the release of both anticellulitic actives. The release profiles obtained using the three different membranes, indicate the possibility of using a commercial cellulose membrane instead of a natural one made of pig's ear skin for *in vitro* cosmetic actives permeation.

Palabras clave: liberación *in vitro*; activos anticelulíticos; membranas; celda de Franz

Keywords: *in vitro* release; anticellulitic actives; membranes; Franz cell

INTRODUCCIÓN

Para optimizar formulaciones cosméticas de uso tópico resulta de gran utilidad realizar estudios de liberación que evalúen el transporte desde una emulsión y recreen las condiciones que presenta la piel como barrera a la difusión.

La parte exterior de la piel se denomina epidermis y está compuesta por varias capas, siendo el estrato córneo la primera de ellas. Esta capa superior está compuesta por 40% de lípidos, 40% de proteínas y sólo 20% de agua. Su composición química dificulta la permeación de drogas hidrofílicas que resultan incorporadas a través de los poros presentes en la piel (Tezel y Mitragotri, 2003). Estos poros representan aproximadamente el 1 % de la superficie total de la misma y resulta ser el factor limitante en la cantidad del activo permeada.

La celulitis, también conocida como adiposis edematosa, es un problema estético que se presenta aproximadamente en el 85 % de las mujeres de más de 20 años. Existen activos cosméticos como los alcaloides de la familia de las metilxantinas (cafeína) y derivados iodados (ioduro de trietanolamonio), que tienen comprobada actividad lipolítica sobre el tejido adiposo (Alcalde, 2009). La cafeína en particular, posee una acción anticelulítica debido a que disminuye el tamaño de los adipocitos que se ubican en la hipodermis y activa la microcirculación cutánea (Lupi et al., 2007; Robles Velasco et al., 2008).

Los ensayos *in vitro* utilizando piel humana como barrera de permeación resultan complicados debido a la dificultad para conseguirla y almacenarla. Una alternativa adecuada es el uso de piel de cerdo que posee un estrato córneo, composición y espesor de la epidermis, contenido de lípidos y morfología general comparables con la piel humana (Gad y Maibach, 2000).

Los ensayos de difusión utilizando membranas naturales son ideales para realizar los estudios *in vitro*, pero debido a las dificultades para obtenerlas y conservarlas en condiciones óptimas, existen numerosos estudios que avalan el uso de membranas sintéticas que no necesitan de un almacenamiento especial, ni requieren pre-tratamientos complicados y su costo es adecuado (Huong et al., 2009).

En este trabajo se utilizó un complejo anticelulítico comercial preparado con ioduro de trietanolamonio (TEAH), cafeína, y extractos de algas, de hiedra y raíz de ruscus, adsorbido en microesferas de sílice de 0,1 μm de diámetro promedio. Este complejo resulta más efectivo que el uso de sus componentes por separado (Arnejo et al., 2009).

Las microesferas actúan como reservorio de activos cosméticos o fármacos y se ha encontrado que la permeación de éstos aumenta de manera inversamente proporcional al diámetro de las microesferas (Shim et al., 2004; Alvarez Román et al., 2001). Rolland y otros estudiaron microesferas de diferente diámetro cargadas con el fármaco adapaleno (Rolland et al., 1993). Estos investigadores encontraron que las esferas de 1 μm se distribuían en el estrato córneo, las de 5 μm de diámetro medio penetraban en los folículos pilosos y las que poseían un diámetro mayor que 10 μm permanecían en la superficie.

La cinética de liberación y permeación de cafeína usando diferentes barreras de permeación está recibiendo amplia atención en la literatura. Nicoli et al. (2005), investigaron *in vitro* la cinética de liberación y permeación de cafeína, a partir de films bioadhesivos transdérmicos. Estos autores usaron piel de oreja de conejo y una membrana de polietileno impregnada con miristato de isopropilo como barreras de permeación. Sus resultados sugieren que la liberación del activo resulta controlada por las características de permeabilidad de la barrera dependiendo del contenido del activo en el film. Cuando el nivel del activo es bajo (cafeína disuelta) el control reside en la membrana, que actúa como barrera de permeación.

En este trabajo se estudió la liberación simultánea de cafeína y de ioduro de trietanolamonio contenidas en microesferas dispersas en una emulsión aceite en agua (O/W). El análisis cinético de la permeación de los

activos anticelulíticos permitió evaluar el comportamiento de dos membranas de origen comercial con respecto a una membrana preparada con piel de cerdo considerada como modelo de piel humana.

Se seleccionaron como membranas comerciales una membrana de celulosa y otra de colágeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Emulsión o/w con activos anticelulíticos en microesferas

La emulsión utilizada se preparó con 3% m/m de ácido esteárico, 1% m/m de trietanolamina, 1% m/m de alcohol cetílico, 4% m/m de vaselina líquida, 3% m/m de propilenglicol y agua en cantidad suficiente.

Las concentraciones iniciales en la emulsión de los activos adsorbidos en las microesferas corresponden a la composición del complejo anticelulítico de origen comercial utilizado y fueron $4,6 \cdot 10^{-3}$ M para la cafeína (CAF) y $1,4 \cdot 10^{-2}$ M para el ioduro de trietanolamonio (TEAH).

Las microesferas son micropartículas esféricas porosas de tamaño promedio de $0,1 \mu\text{m}$ constituidas por material inorgánico. Son químicamente inertes y se comercializan en equilibrio con una solución hidroglicólica. Fueron provistas por Fabriquímica, SRL (Buenos Aires, Argentina).

Membranas

Se utilizaron tres tipos de membranas: una de celulosa marca Arthur Thomas (Philadelphia, USA), una de colágeno marca Membracel provista por Laboratorio Celina (Buenos Aires, Argentina) y una tercera membrana de piel de cerdo obtenida de oreja de cerdo.

La membrana de celulosa cuyo diámetro promedio de poro es 48 \AA , resulta permeable al agua y permite el pasaje de compuestos de baja masa molar pero retiene materiales de masas molares iguales o superiores a 12.000 Da . Antes de colocarla en la celda, se la deja hidratar durante 5 minutos en agua destilada.

La membrana de colágeno se prepara a partir de colágeno bovino purificado y reconstituido. Resulta ser un material biocompatible, transparente, semipermeable, reabsorbible, induce la granulación u osteogénesis y no provoca rechazo o reacciones alérgicas. Estas características permiten su utilización en tratamientos odontológicos y de quemaduras cutáneas (Bernaes et al., 2004).

La membrana de origen animal, compuesta por estrato córneo, epidermis y dermis sin la grasa subcutánea de la piel se almacenó a -20°C hasta su uso. Dos horas antes de utilizarla en el ensayo de liberación, se la colocó en un recipiente con agua destilada a 50°C por 2 minutos para descongelarla. En el arreglo experimental utilizado, la membrana se ubicó de manera que el estrato córneo siempre estuviera en contacto con la emulsión.

Celda de Franz

Se utiliza para realizar los ensayos cinéticos de permeación *in vitro*. Consta de un compartimiento superior (dador), donde se coloca el sistema en estudio (emulsión con microesferas que contienen el complejo anticelulítico) y un compartimiento inferior (receptor) con un líquido, en este caso agua, separados por una membrana, con un área de transferencia de $4,9 \text{ cm}^2$ (Figura 1). El compartimiento inferior posee un brazo de muestreo lateral, por donde se toman alícuotas para analizar la concentración acumulada de los activos liberados. La celda posee una camisa externa que puede conectarse a un baño termostático con recirculación, de manera de asegurar una temperatura constante durante los ensayos de liberación.

La celda se mantuvo a $(32 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ en todos los experimentos debido a que esta temperatura es la aceptada generalmente como la temperatura media de la superficie cutánea.

En todo momento fue necesario mantener un contacto total entre la emulsión, la membrana y la solución contenida en el compartimiento receptor, de manera que el área de transferencia a través de la cual ocurre la permeación sea constante. Es por ello que después de la extracción de la muestra a tiempos prefijados, se repone el volumen tomado.

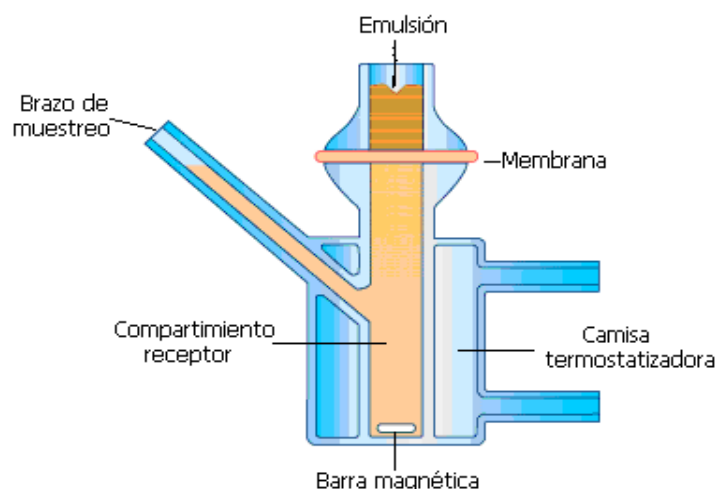


Fig. 1: Representación esquemática de la Celda de Franz

Para mantener la concentración de activos en el compartimiento receptor mucho menor que en el compartimiento donador, de manera de mantener las condiciones de sumidero, se utilizó una celda con un volumen receptor cercano a los 200 mL que resulta un orden de magnitud mayor que el de las celdas disponibles comercialmente. En el compartimiento dador se colocaron 6 mL de emulsión con dermoesferas.

En todo momento se mantuvo una agitación constante para evitar gradientes de concentración.

Ensayos cinéticos

La concentración de los activos se monitoreó en función del tiempo, midiendo sus absorbancias en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401 PC.

En las condiciones experimentales empleadas, TEAH y CAF fueron los componentes del complejo anticelulítico que permitieron explicar la absorción de radiación observada entre 200 y 350 nm. Esto permitió realizar su determinación simultánea por aditividad de absorbancias a 240 nm y 271 nm, midiendo la absorción UV del líquido receptor en función del tiempo cada 10 minutos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Mediante calibraciones previas a partir de soluciones patrón de TEAH y CAF se evaluaron los respectivos coeficientes de absorción molar, a las dos longitudes de onda de medición. En las condiciones experimentales empleadas, para la CAF el rango de linealidad se extiende hasta $3.1 \cdot 10^{-4}$ M mientras que para el TEAH llega a $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Cabe destacar que todas las concentraciones medidas se encuentran dentro del rango de linealidad de cada compuesto.

Tratamiento de datos

A fin de conocer la concentración de activo acumulada a un tiempo determinado en el compartimiento inferior de la celda de Franz, se desarrolló un cálculo que tiene en cuenta las alícuotas de agua agregadas después de

cada extracción de muestra del compartimiento inferior a fin de mantener el volumen del líquido receptor constante y la masa de soluto liberado que se va eliminando del sistema como consecuencia de la extracción de muestra, ya que ésta no se repone.

Las curvas de las concentraciones acumuladas de CAF y TEAH en función del tiempo se analizaron con una ecuación semiempírica del tipo ley de potencia (Ritger y Peppas, 1987):

$$(M_t / M_\infty) = k t^n \quad (1)$$

Aquí M_t / M_∞ es el cociente de las concentraciones molares en el compartimiento receptor a tiempo t e infinito respectivamente y representa la fracción de activo liberado al tiempo t , k es una constante que incorpora la concentración del activo así como características geométricas y estructurales del dispositivo de liberación que incluyen el tipo de membrana utilizada y n es el exponente indicativo del mecanismo de liberación.

Se reagrupó la ecuación 1 de la siguiente manera:

$$C_t = k' t^n \quad (2)$$

Donde C_t es la concentración molar del activo liberado en el compartimiento receptor al tiempo t y $k' = k * M_\infty$. Las limitaciones teóricas de aplicabilidad de la ecuación son las siguientes:

- 1- Se deben cumplir las condiciones de sumidero en el medio donde se está liberando el activo (la concentración final del activo liberado en el medio receptor no debe superar el 10 % de su solubilidad).
- 2- El coeficiente de difusión del activo se considera constante e independiente de la concentración del mismo.
- 3- Solo es válida para una fracción de liberación menor o igual al 60 % del total del activo inicial, cuando la geometría del dispositivo de liberación corresponde a una placa.
- 4- La liberación se produce en una única dimensión y de manera isotérmica.

El ajuste de los datos experimentales obtenidos se realizó utilizando la regresión no lineal de cuadrados mínimos con el método de Levenberg-Marquardt en el modo no robusto (Matlab versión 6.5, MathWorks, Inc., 2002).

Microscopía de barrido electrónico ambiental (ESEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz focalizado de electrones. Se producen imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto analizado. Las principales utilidades del SEM son la alta resolución ($\approx 100 \text{ \AA}$) y la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes.

Cuando se utiliza un microscopio electrónico de barrido, es necesario que el material analizado sea eléctricamente conductor y soporte el elevado vacío sin modificar su estructura (Schalek y Drzal, 2000). Estas condiciones originan en algunos casos, un proceso de preparación de la muestra complicado que finalmente puede alterar el estado original de la superficie modificando drásticamente la imagen real.

Estos inconvenientes se eliminan utilizando SEM en el modo ambiental o húmedo (ESEM). Esta técnica es muy utilizada cuando se quiere estudiar la morfología de especímenes de origen biológico o materiales con un alto contenido de humedad (Micic et al., 2001; Pradny et al., 2003).

La apariencia microestructural de las membranas fue analizada con un microscopio electrónico de barrido ambiental Phillips Electroscan XL-30-ESEM, manteniendo en la cámara una presión de vapor de agua de 0,9 Torr.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 2 y 3 permiten observar las micrografías electrónicas de barrido ambiental (ESEM) de las membranas de celulosa y de colágeno respectivamente.

Se puede apreciar la marcada diferencia en la morfología superficial que presentan ambas membranas comerciales. Teniendo en cuenta que solo se varía la membrana a través de la cual se produce la permeación de los activos, los resultados cinéticos que se muestran en las Figuras 4, 5 y 6 están relacionados con la estructura topológica de dichas membranas que presentan diferentes porosidades.

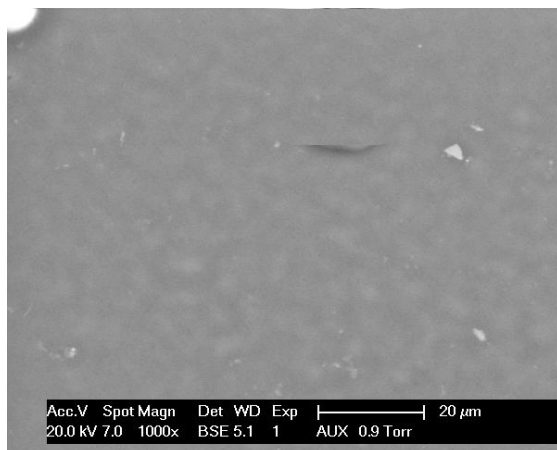


Fig. 2: ESEM de la membrana de celulosa. Magnificación: 1000x

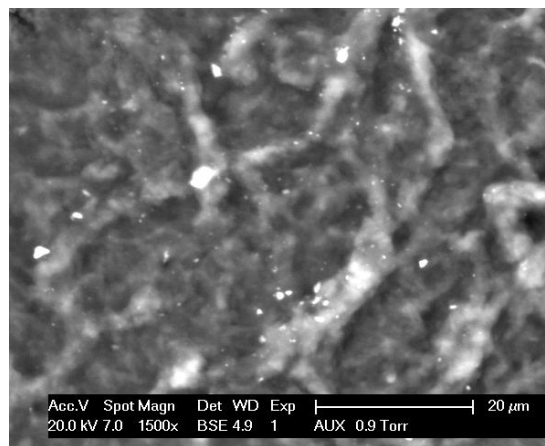


Fig. 3: ESEM de la membrana de colágeno. Magnificación: 1500x

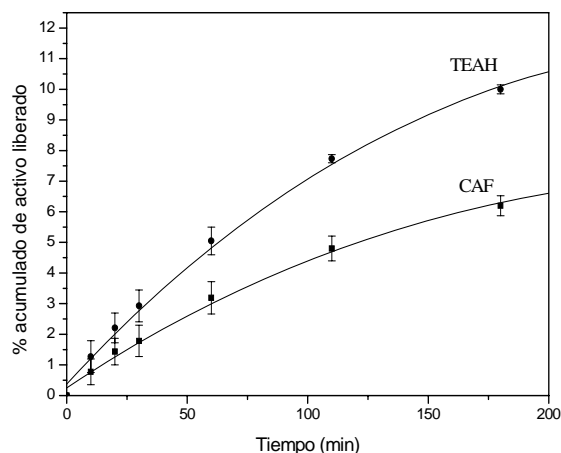


Fig. 4: Liberación a partir de la emulsión usando una membrana de celulosa. Se representan los valores medios \pm desviación estándar con n=3.

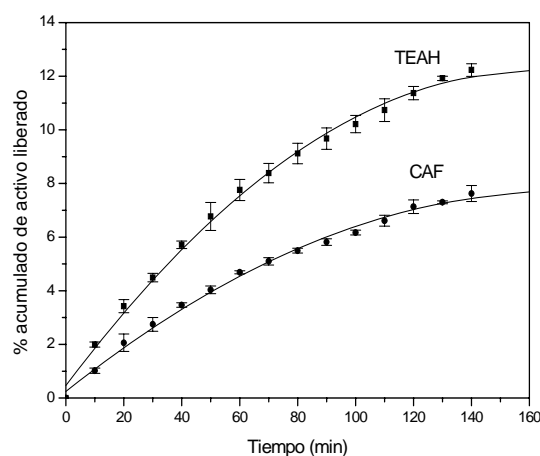


Fig. 5: Liberación a partir de la emulsión usando una membrana de colágeno. Se representan los valores medios \pm desviación estándar con n=3.

En las Figuras 4 y 5 se muestran los perfiles de liberación de los activos, a partir de la emulsión con concentraciones iniciales de TEAH $1,4 \times 10^{-2}$ M y CAF $4,6 \times 10^{-3}$ M en el compartimiento dador.

La Figura 4 representa la concentración acumulada de los activos cuando se utiliza una membrana de celulosa y la Figura 5 corresponde a las experiencias realizadas en las mismas condiciones pero con la membrana de colágeno.

La Figura 6 corresponde a los ensayos de liberación de los activos anticelulíticos utilizando como barrera de permeación una membrana obtenida a partir de la piel de oreja de cerdo que habitualmente se considera como modelo de permeación de piel humana.

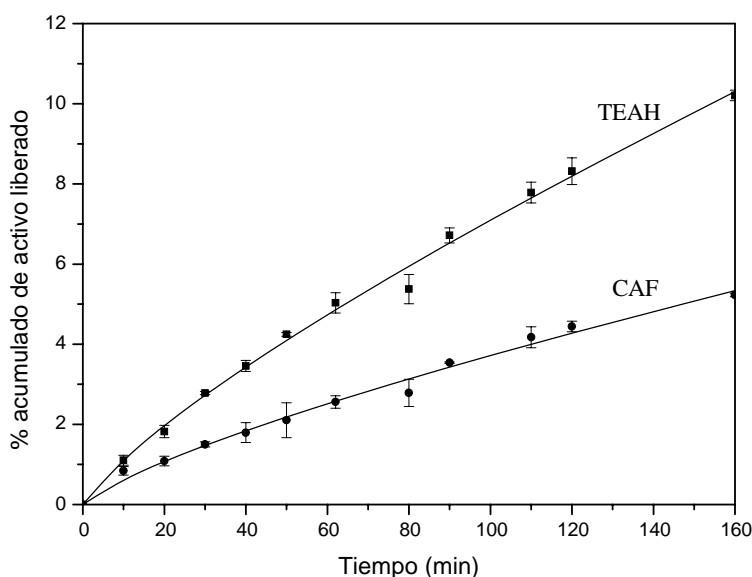


Fig. 6: Porcentaje acumulado de CAF y TEAH a partir de una emulsión utilizando una membrana de piel de cerdo. Se representan los valores medios \pm desviación estándar con $n=3$

Analizando las Figuras 4 y 5 a igual tiempo (160 minutos), la permeación de las drogas es significativamente mayor cuando se utiliza colágeno (CAF liberada $\approx 7\%$ y TEAH liberada $\approx 12\%$) en vez de celulosa (CAF liberada $\approx 5,5\%$ y TEAH liberada $\approx 9,55\%$) como membrana.

En cambio, la comparación de las Figuras 4 y 6 muestra un comportamiento cinético similar de las membranas de celulosa y de piel de cerdo, con porcentajes acumulados de los activos semejantes cuando se comparan las curvas a iguales tiempos. Estos resultados permiten proponer a la membrana comercial de celulosa como sustituto de la piel de cerdo para la realización de ensayos de permeación in vitro.

Utilizando la ecuación 2 para el ajuste no lineal de los datos experimentales, se obtiene para todas las curvas presentadas en las Figuras 4, 5 y 6, un valor del exponente $n = 0.70 \pm 0.05$.

Para el caso de una liberación de activos que esté controlada exclusivamente por un proceso difusivo, donde la liberación se produce debido al gradiente de potencial químico, se puede aplicar la ley de Fick y se obtiene un valor de $n = 0.5$ (Grassi y Grassi, 2005). En el sistema analizado en este trabajo, se verifican varios procesos de transporte de los activos anticelulíticos (entre las microsferas y la emulsión, entre la emulsión y la membrana y entre la membrana y la solución del compartimiento receptor) que producen un apartamiento del comportamiento fickeano independientemente de la membrana que se utilice.

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudió *in vitro*, la permeación simultánea de dos moléculas activas en el tratamiento anticelulítico, la cafeína y el yoduro de trietanolamonio, contenidas en microesferas dispersas en una emulsión de uso cosmético, a través de una membrana de celulosa, otra de colágeno y una preparada a partir de piel de cerdo.

En todos los casos se verificó que la cinética de liberación se aparta del comportamiento difusional.

Teniendo en cuenta que la membrana preparada a partir de la piel de oreja de cerdo suele considerarse como modelo de permeación a través de piel humana, los resultados experimentales presentados indican que la membrana de celulosa se comporta de manera semejante a la piel porcina como barrera de permeación de activos anticelulíticos liberados a partir de una emulsión.

Los resultados obtenidos son alentadores en la búsqueda de membranas sintéticas que permitan evitar el uso de membranas preparadas a partir de piel de animales en los estudios *in vitro* de permeación transdérmica de fármacos y activos cosméticos.

AGRADECIMIENTOS

Investigación financiada por la Universidad de Buenos Aires (Argentina) a través del subsidio UBACyT I013 Programación Científica 2008-2010. Se agradecen los materiales provistos por la empresa Fabriquímica S.R.L. y el Laboratorio Celina de la ciudad de Buenos Aires.

REFERENCIAS

Alcalde, M. (2009); *Celulitis*. *Ámbito Farmacéutico*: 28(5), 107-114.

Alvarez Román, R.; Barré, G.; Guy, R.H.; Fessi, H. (2001); *Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*: 52, 191-195.

Arnejo, N.A.; Carballo, O.P.; Svarc, F.E; Branca, A.L.T.; Groisman, C. (2009); *Evaluación de distintos activos anticelulíticos "in vivo"*, *Cosmética*: 71, 31-38.

Bernales, D.; Caride, F.; Lewis, A.; Lagens, M. (2004); *Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*: 23, 65-74.

Gad, A.S. y Maibach, H.I. (2000); *The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man: Qualitative and Quantitative Observations—An Overview*. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*: 13, 229–234.

Grassi M.; Grassi G. (2005); *Mathematical modeling and controlled drug delivery; matrix systems*; *Current Drug Delivery*: 2, 97-116.

Huong, S.; Bun, H.; Fourneron, J.; Reynier, J.; Andrieu, V. (2009); *Review : Use of various models for in vitro percutaneous absorption studies of ultraviolet filters*; *Skin Research and Technology*: 15, 253-261.

Lupi, O.; Semenovitch, I.J.; Treu, C.; Bottino, D.; Bouskela, E. (2007); *Evaluation of the effects of caffeine in the microcirculation and edema on thighs and buttocks using the orthogonal polarization spectral imaging and clinical parameters*, *Journal of Cosmetic Dermatology*: 6, 102–107.

- Micic, M.; Radotic, K.; Benitez, I.; Ruano, M.; Jeremic, M.; Moy, V.; Mabrouki, M.; Leblanc, R. (2001); *Topographical characterization and surface force spectroscopy of the photochemical lignin model compound*, Biophysical Chemistry: 94, 257-263.
- Nicoli, S.; Colombo, C.; Santi, P. (2005); *Release and Permeation Kinetics of Caffeine From Bioadhesive Transdermal Films*. AAPS Journal: 7(1), Article 20 (<http://www.aapsj.org>).
- Pradny, M.; Lesny, P.; Fiala, J.; Vasic, J.; Slouf, M.; Michálek, J.; Sykova, E. (2003); *Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate with methacrylic acid*. Collect. Czech. Chem. Commun.: 68, 812-822.
- Ritger, P.L.; Peppas, N.A. (1987); *A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs*. Journal of Controlled Release: 5, 23-36.
- Robles Velasco, M.V.; Tsugmi Nakamura Tano; C., Machado-Santell; G.M., Consiglieri, V.O.; Kaneko, T.M.; Rolim Baby, A. (2008); *Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: histological evaluation*. Journal of Cosmetic Dermatology: 7, 23-29.
- Rolland, A.; Wagner, N.; Chatelus, A.; Shroot, B.; Schaefer, H. (1993); *Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres*, Pharm. Res.: 10, 1738-1744.
- Schalek, R.; Drzal, L. (2000); *Characterization of advanced materials using an environmental SEM*. Journal of Advanced Materials: 32, 32-38.
- Shim J.; Kang H.S.; Park W.S.; Han S.H.; Kim J.; Chang I.S. (2004); *Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles*. J. Contr. Rel.: 97, 477-484.
- Tezel, A.; Mitragotri, S. (2003); *On the origin of size-dependent tortuosity for permeation of hydrophilic solutes across the stratum corneum*. J. Controll. Rel.: 86, 183-186.

